

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Kryštof Knapp

**Vliv  $17\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu cytochromů P450  
podrodiny 2B a 2C**

Inhibitory effect of  $17\alpha$ -ethinylestradiol on the activity of  
cytochrome P450 subfamilies 2B and 2C

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: RNDr. Helena Dračínská, Ph.D.

Praha 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 15. června 2020

.....

## **Abstrakt:**

17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) je syntetickým derivátem endogenního estrogenu 17 $\beta$ -estradiolu široce rozšířeným ve zdravotnictví jednak jako složka ženské hormonální antikoncepce a jednak jako léčivo v postmenopauzální hormonální terapii. Díky své značné chemické odolnosti, schopnosti bioakumulace a silné estrogenicitě se jedná o významnou perzistentní organickou látku.

V organismech podléhá oxidačnímu metabolismu katalyzovanému enzymy z rodiny cytochromů P450. Je známo, že se EE2 chová jako účinný inhibitor některých isoformů cytochromů P450. Cílem této práce bylo studium vlivu EE2 na aktivitu lidských isoformů CYP2B6, CYP2C9 a jejich potkaních orthologů CYP2B1 respektive CYP2C6.

U všech zkoumaných reakcí byla pozorována snížená aktivita enzymu při expozici EE2 *in vitro*. Největší pokles aktivity byl pozorován u reakce *O*-depentylace resorufinu katalyzované CYP2B1 s hodnotou  $IC_{50} = 9,6 \mu\text{M}$ . Pro hydroxylaci bupropionu, selektivní reakci isoformů CYP2B1 a CYP2B6, se EE2 jevil jako účinnější inhibitor CYP2B6 s hodnotou  $IC_{50} = 60 \mu\text{M}$ . Inhibice stejné reakce katalyzované CYP2B1 způsobená EE2 byla výrazně slabší. Při 200 $\mu\text{M}$  koncentraci EE2 tvořila aktivita CYP2B1 oproti kontrolní aktivitě enzymu stále více než 50 %.

Pro určení inhibičního vlivu EE2 na CYP z podrodiny 2C byla použita markerová reakce 4'-hydroxylace diklofenaku. Stanovena byla orientační hodnota  $IC_{50}$  pro CYP2C9, která činila  $\approx 40 \mu\text{M}$ . U reakce katalyzované CYP 2C6 byla již při 25 $\mu\text{M}$  koncentraci EE2 aktivita téměř nedetekovatelná.

**Klíčová slova:** endokrinní disruptory, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, cytochromy P450, CYP2B1, CYP2B6, CYP2C6, CYP2C9, inhibice

## **Abstract:**

17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) is a synthetic derivative of endogenous estrogen 17 $\beta$ -estradiol. It is widely used in pharmaceuticals as a ingredient of female oral contraceptives and also in hormone replacement therapy for women with postmenopausal syndrome. Due to its high estrogenic potential together with resistance to the chemical degradation and tendency to bioaccumulate in environment it is considered as an important persistent organic pollutant.

In organisms, EE2 is oxidatively metabolised by enzymes from a family of cytochromes P450. Some studies show that EE2 is also a potent inhibitor of some isoforms from cytochrome P450 family. In this work, we studied inhibitory effect of EE2 on two human isoforms CYP2B6, CYP2C9 and their rat orthologs CYP2B1 and 2C6, respectively.

All studied isoforms exhibited reduced enzyme activity in the presence of EE2. The greatest decrease of enzyme activity was observed with CYP2B1 catalyzing pentoxyresorufin *O*-deventylation with value of  $IC_{50} = 9,6 \mu\text{M}$ . For hydroxylation of bupropion, selective reaction of CYP2B1 and CYP2B6, EE2 behaved as a more potent inhibitor of CYP2B6 with  $IC_{50} = 60 \mu\text{M}$ . The inhibitory effect of EE2 on rat CYP2B1 for similar reaction conditions was significantly lower. With  $200\mu\text{M}$  concentration of EE2, CYP2B1 exhibited still more than 50 % of control activity.

Enzymes from 2C subfamily were studied with specific reaction of 4'-hydroxylation of diclofenac. We found the value for  $IC_{50}$  for CYP2C9 to be approximately  $40 \mu\text{M}$ . EE2 exhibited much stronger inhibitory effect on rat isoform CYP2C6. With concentrations of EE2 around  $25 \mu\text{M}$ , catalytic activity of CYP2C6 was nearly undetectable.

[In Czech]

**Key words:** endocrine disruptors, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, cytochrome P450, CYP2B1, CYP2B6, CYP2C6, CYP2C9, inhibition

## **Poděkování:**

Rád bych poděkoval své vedoucí práce RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D. za ochotu a čas, který mi při řešení problémů věnovala. Dále bych rád poděkoval kolegům z biochemické laboratoře a zejména Bc. Barboře Otáhalové za velkou psychickou i materiální podporu při práci v laboratoři. Nakonec bych rád poděkoval svým sourozencům za konzultace ohledně jazykové stránky práce.

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk a symbolů</b>	<b>8</b>
<b>1 Úvod</b>	<b>10</b>
<b>2 Literární přehled</b>	<b>11</b>
2.1 Endokrinní disruptory . . . . .	11
2.1.1 Estrogenní látky . . . . .	11
2.1.2 Steroidní estrogenní látky . . . . .	14
2.1.3 17 $\alpha$ -ethinylestradiol . . . . .	14
2.1.4 Mechanismus účinku 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu . . . . .	15
2.1.5 Estrogenní receptor . . . . .	16
2.1.6 Metabolismus 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu . . . . .	17
2.2 Cytochromy P450 . . . . .	19
2.2.1 Názvosloví cytochromů P450 . . . . .	21
2.2.2 Struktura cytochromů P450 . . . . .	21
2.2.3 Inhibice cytochromů P450 . . . . .	22
2.3 Lidské a potkaní isoformy cytochromů P450 . . . . .	24
2.3.1 Cytochrom P450 2B6 . . . . .	24
2.3.1.1 Inhibice cytochromu 2B6 . . . . .	25
2.3.2 Cytochrom P450 2B1 . . . . .	25
2.3.3 Cytochrom P450 2C9 . . . . .	26
2.3.3.1 Inhibice cytochromu 2C9 . . . . .	27
2.3.4 Cytochrom P450 2C6 . . . . .	28
2.4 Vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu cytochromů P450 . . . . .	28
2.4.1 Vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu cytochromů P450 2C9 a 2C6 . . . . .	29
2.4.2 Vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu cytochromů P450 2B6 a 2B1 . . . . .	29
<b>3 Cíl práce</b>	<b>31</b>

<b>4</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>32</b>
4.1	Použité chemikálie . . . . .	32
4.2	Použité přístroje . . . . .	33
4.3	Použité metody . . . . .	34
4.3.1	Stanovení aktivity cytochromů P450 2C6 a 2C9 - 4'-hydroxylace diklofenaku . . . . .	34
4.3.1.1	Separace metabolitů vysokoúčinnou kapalinovou chroma- tografií a analýza získaných dat . . . . .	35
4.3.2	Stanovení aktivity cytochromů P450 2B1 a 2B6 - hydroxylace bupropionu . . . . .	36
4.3.2.1	Separace metabolitů vysokoúčinnou kapalinovou chroma- tografií a analýza získaných dat . . . . .	37
4.3.3	Stanovení aktivity cytochromu P450 2B1 - O-depentylace 7-pentoxyresorufinu . . . . .	38
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>40</b>
5.1	Vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu CYP2C6 a 2C9 . . . . .	40
5.2	Vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu CYP2B1 a 2B6 . . . . .	43
5.3	Specifické aktivity neinhibovaných reakcí . . . . .	47
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>52</b>
	<b>Seznam použité literatury</b>	<b>53</b>

## Seznam použitých zkratk a symbolů

- **7-EFC** 7-ethoxy-4-(trifluormethyl)kumarin
- **BBP** butylbenzyl ftalát
- **CYP** cytochrom P450
- **DBD** DNA vázající doména
- **DBP** dibutyl ftalát
- **DDT** p,p'-dichlorofenyltrichlorethan
- **DHE1** D-homoestron
- **DMSO** dimethylsulfoxid
- **DNA** deoxyribonukleová kyselina
- **E1** estron
- **E2** 17 $\beta$ -estradiol
- **E3** estriol
- **EC** estrogenní látky
- **EC<sub>50</sub>** koncentrace při které dochází k 50 % maximální odezvy receptoru
- **EDC** endokrinní disruptory
- **EE2** 17 $\alpha$ -ethinylestradiol
- **ER** estrogenní receptor
- **HPLC** vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- **IC<sub>50</sub>** koncentrace inhibitoru snižující činnost enzymu o 50 %



- **LBD** ligand vázající doména
- **MDMA** N-methyl-3,4-dioxymethylenamfetamin
- **NADPH** nikotinamidadeninukleotidfosfát
- **PAH** polyaromatické uhlovodíky
- **POP** perzistentní organické látky
- **RPM** otáčky za minutu
- **SULT** sulfotransferasa
- **UGT** uridin 5'-difosfo-glukuronosyltransferasa
- **thioTEPA** N,N',N''-triethylenfosfoamid

# 1. Úvod

$17\alpha$ -ethinylestradiol je syntetickým derivátem endogenního steroidního hormonu  $17\beta$ -estradiolu, který je hlavním ženským pohlavním hormonem. Zejména díky své vysoké účinnosti při perorálním podání se poměrně rychle rozšířilo jeho využití v postmenopausální terapii a jako účinné složky hormonální antikoncepce [1]. Tato jeho vlastnost však také zapříčiňuje jeho škodlivost pro životní prostředí a to zejména v povrchových vodách, do kterých se dostává z čistíren odpadních vod při jeho nedokonalém odstranění [2]. U vodních organismů pak dochází k narušení hormonální rovnováhy, které může vést například až k feminizaci ryb, čímž dochází k snižování jejich populace a narušení stability ekosystémů [3].

Dalším nežádoucím vlivem  $17\alpha$ -ethinylestradiolu (dále jen EE2) jsou jeho interakce s jinými léčivy v lidském organismu a to zejména skrze ovlivňování exprese a aktivity enzymů z rodiny cytochromů P450 (CYP), které se podílejí na biotransformaci většiny xenobiotik. EE2 je známým induktorem či inhibítorem některých isoformů CYP, čímž může docházet k modulaci farmakokinetických vlastností širokého spektra látek [4, 5]. Ke studiu těchto interakcí se často používají modelové organismy jako je potkan či laboratorní myš. Vzhledem k mezidruhovým rozdílům není ovšem možné jednoduše přenášet poznatky z experimentů s těmito modelovými organismy na organismus lidský. CYP2B6 a 2C9 jsou lidskými hepatálními isoformami, které metabolizují řadu xenobiotik i endogenních látek. Jejich potkaní orthology CYP2B1 a 2C6 jsou potenciálními modelovými enzymy ke zkoumání vlivu EE2 na jejich lidské protějšky. Tato práce porovnává inhibiční vliv  $17\alpha$ -ethinylestradiolu na tyto enzymy.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Endokrinní disruptory

Endokrinní disruptory (EDC – z angl.: Endocrine disruptor compounds/chemicals) jsou podle definice exogenní či endogenní látky, které narušují produkci, vnitřní sekreci, transport, metabolismus, vazbu, účinek nebo eliminaci přirozených hormonů v organismu. Ty jsou zodpovědné za udržování homeostáze a regulace vývojových procesů a narušení jejich rovnováhy v organismu tak může zapříčinit vývojové, reprodukční, ale také neurologické či imunitní poruchy [6–10]. EDC mohou být jak přírodní, tak syntetické povahy.

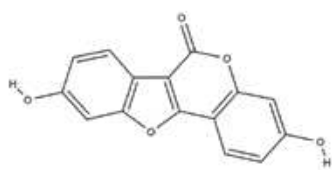
#### 2.1.1 Estrogenní látky

Velkou skupinou endokrinních disruptorů jsou estrogenní látky (EC – z angl.: Estrogenic chemicals/compounds), což jsou látky definované jejich schopností se vázat a aktivovat, případně deaktivovat, tzv. estrogenní receptory (ER) uvnitř buňky [11]. Mezi EC přírodního exogenního původu řadíme fytoestrogeny (např.: indol-3-karbinol,  $\beta$ -sitosterol či kumestrol) (obr. 2.1, str. 13) a mykoestrogeny (zearalenon) [12, 13].

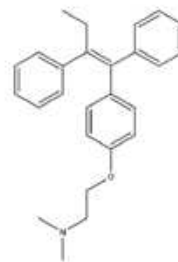
Skupina syntetických EC je velmi široká a obsahuje celou řadu sloučenin od farmak přes pesticidy po těžké kovy. Z farmak jde například o protinádorové léčivo tamoxifen [13] (obr. 2.1, str. 13) nebo derivát přírodního hormonu  $17\beta$ -estradiolu (dále jen E2),  $17\alpha$ -ethinylestradiol [14], který je hojně využíván jako aktivní látka v lécích regulujících menstruační cyklus. Dále se jedná o některá aditiva, jako jsou například parabeny (obr. 2.1, str. 13) [15]. Ty jsou díky svým baktericidním a fungicidním účinkům nejčastěji příměsí různých kosmetických výrobků (šampony, krémy, zubní pasty), ale používají se i v potravinářském průmyslu jako konzervanty. Ze skupiny pesticidů byla estrogenicita prokázána například u herbicidů atrazinu, alachloru, nonachloru a glyfosátu (obr. 2.1, str. 13), který je aktivní látkou přípravku Roundup, dále u fungicidů dodemorphu (obr. 2.1, str. 13), triadimefonu a bifenyly a jeho hydroxyderivátů [16–18]. Nejpočetněji je však zastoupena podskupina insekticidů, do které patří například dnes již zakázané DDT (*p,p'*-dichlordifenyltrichlorethan) (obr. 2.1,

str. 13), jeho isomer o,p'-DDT a vedlejší produkty vznikající při jeho výrobě nebo jiné již také zakázané insekticidy jako toxofen a methoxychlor [13, 19]. Další obsáhlou skupinou jsou látky používané v průmyslové výrobě, to jsou například ftaláty DBP a BBP (z angl.: dibutyl phtalate a butylbenzyl phtalate) nebo alkylfenoly nonylfenol, bisfenol A (obr. 2.1, str. 13) a oktylfenol, používané pro výrobu plastů a detergentů [12, 20]. Významnou skupinou EC jsou také některé perzistentní organické látky (zkr.: POP z angl.: Persistent organic pollutants), což jsou organické látky s vysokou odolností vůči fotolytické, biologické a chemické degradaci, díky níž může docházet k bioakumulaci v organismech a životním prostředí. Jedním ze známých POP je již výše zmíněné DDT. Dalšími POP jsou například některé polychlorované bifenyly, jejich hydroxyderiváty nebo polyaromatické uhlovodíky (zkr.: PAH z angl.: Polyaromatic hydrocarbons) jako jsou benzo[a]pyren (obr. 2.1, str. 13), 2,3-benzofluoren nebo 6-hydroxychrysen [21, 22]. Jistou formu estrogenicity můžeme pozorovat také u některých těžkých kovů, například mědi, kobaltu, niklu, olova, rtuti, cínu, chromu či vanadu [23].

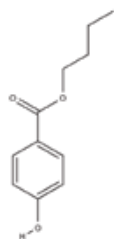
Důležitou skupinu EC ale dnes představují také steroidní estrogení sloučeniny endogenního původu, které se do prostředí dostávají především z výpustí čistíren odpadních vod, nemocničního odpadu a chovu hospodářských zvířat [24]. Díky jejich vysoké potenci pro aktivaci ER ( $EC_{50}(E2) = 30 - 50 \text{ pM}$ ) [25] jsou dnes společně s EE2 sledovány jejich koncentrace v pitné vodě, kde ale až na výjimky [26, 27] nedosahují hodnot, které mohou vyvolávat v lidském organismu sledovatelnou odezvu [28–30].



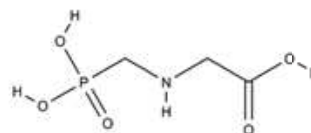
a) Kumestrol



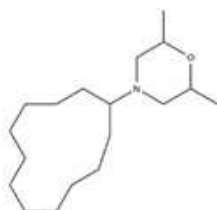
b) Tamoxifen



c) Benzylparaben



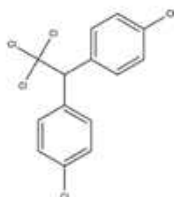
d) Glyfosát



e) Dodemorf



f) Bisfenol A



g) DDT

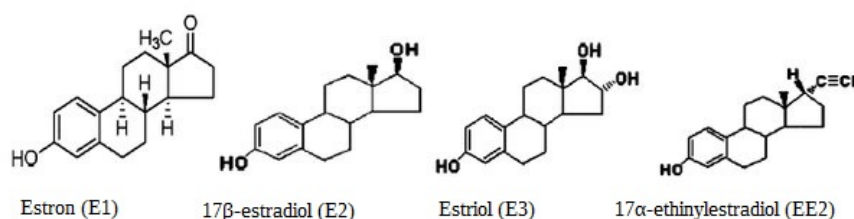


h) Benzo[a]pyren

**Obrázek 2.1: Chemické struktury zástupců jednotlivých skupin estrogenních látek**  
**a)** fytoestrogeny **b)** farmaka **c)** parabeny **d)** pesticidy **e)** fungicidy **f)** průmyslové látky  
**g)** insekticidy **h)** polutanty

### 2.1.2 Steroidní estrogení látky

Steroidní estrogení látky jsou tetracyklické sloučeniny odvozené od cholesterolu. Všechny mají společnou jednu fenolovou (A), dvě cyklohexanové (B, C) a jednu cyklopentanovou (D) skupinu (nazýváme též kruhy). Přírodní estrogény se liší pouze v konfiguraci na cyklopentanovém kruhu, a to konkrétně na uhlíku číslo 16 a 17 (dále jen C16 a C17) (obr. 2.2). Estron (E1) má na C17 karbonylovou skupinu,  $17\beta$ -estradiol (E2) hydroxylovou skupinu (řecké písmeno  $\beta$  zde označuje směřování hydroxylové skupiny nad rovinu molekuly, v organismech se vyskytuje i jeho epimer  $17\alpha$ -estradiol), zatímco estriol (E3) má na D kruhu hydroxylové skupiny dvě, a to na C16 a C17. Kromě těchto základních forem řadíme mezi steroidní estrogení látky i jejich glukuronidové a sulfátové konjugáty, které vznikají jako produkty metabolismu estrogenů, a také jejich syntetické deriváty jako je  $17\alpha$ -ethinylestradiol, mestranol (ethinylestradiol-3-methylether) a estradiolvalerát, které jsou hojně využívány ve zdravotnictví.



**Obrázek 2.2: Strukturní vzorce steroidních estrogeních látek**

*Převzato a upraveno z [31].*

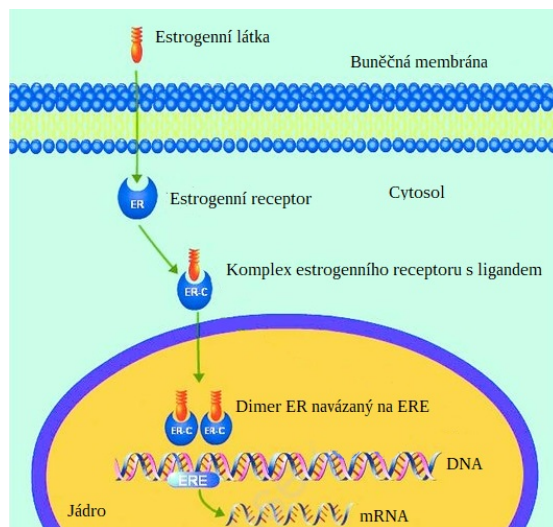
### 2.1.3 $17\alpha$ -ethinylestradiol

$17\alpha$ -ethinylestradiol, jehož inhibičním vlivem na cytochromy P450 se tato práce zabývá, byl poprvé připraven v laboratořích německé farmaceutické firmy AG Schering okolo roku 1935 [1]. Ačkoliv již v roce 1938 byla ve výzkumu vedeném Howlegem a Innhofenem zjištěna vysoká odezva organismu při perorálním podání ethinylestradiolu [32], která byla klíčová pro rozšíření terapeutického využití, protože do té doby byla léčba estrogény omezena na subkutánní aplikaci, na jeho širší použití došlo až s nástupem hormonální antikoncepce na konci 60. let 20. století. V roce 1957 byl v USA do prodeje uveden první přípravek na bázi ethiny-

lestradiolu Envoid, který obsahoval směs mestranolu a norethynodrelu, používaný jako léčivo při poruchách menstruace [1]. Mestranol je methoxyderivát EE2, který je následně v těle demethylován na EE2. V dnešní době je na ethinylestradiolu založená velká část hormonální antikoncepce a v rámci farmaceutického průmyslu se ho ve světě ročně vyrábějí desítky tun [2]. V Evropské unii se jeho denní spotřeba pohybuje okolo 1-2  $\mu\text{g}/\text{osoba}/\text{den}$  (v ČR 1,18  $\mu\text{g}/\text{osoba}/\text{den}$ ) [33].

#### 2.1.4 Mechanismus účinku $17\alpha$ -ethinylestradiolu

EE2 je stejně jako E2 agonista estrogenního receptoru. ER patří do rodiny steroid/thyroidních hormonálních receptorů, které fungují jako transkripční faktory. Neaktivní receptory se nacházejí v cytosolu, po navázání ligandu (E2, EE2 atd.) dochází k dimerizaci a přesunu do jádra, kde se váží na estrogenní responzivní elementy, což jsou úseky na DNA (obr. 2.3). Po navázání dochází k transkripci regulovaného genu [34]. ER však nacházíme také na buněčné membráně, kde umožňují rychlou odezvu buňky (tzv. nengenomickým mechanismem) na přítomnost ligandu [35].

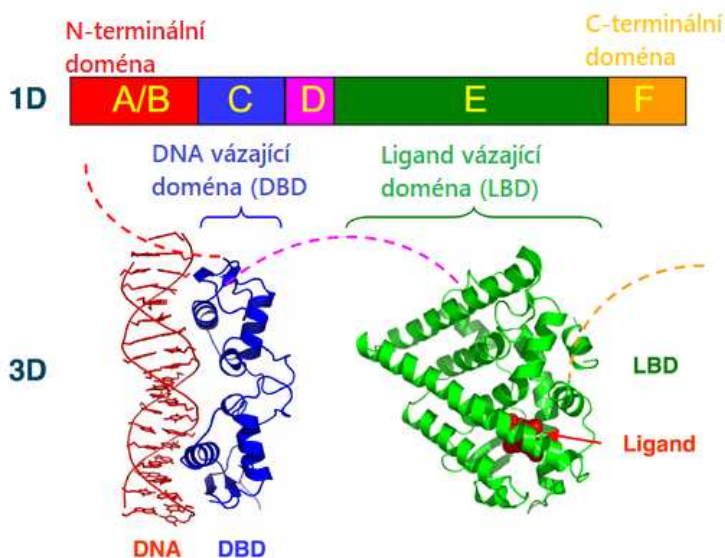


**Obrázek 2.3: Zjednodušené schéma mechanismu účinku estrogenních látek**

Po přechodu přes buněčnou membránu se estrogenní látky váží na estrogenní receptory přítomné v cytosolu. Následně jsou transportovány do jádra buňky, kde dochází k dimerizaci a aktivaci transkripce skrze interakci s estrogenními responzivními elementy (ERE). Převzato a upraveno z [36].

### 2.1.5 Estrogenní receptor

ER se skládá ze tří domén, N-terminální domény, DNA vázající domény (DBD – DNA binding domain) a ligand vázající domény (LBD) (obr. 2.4). DBD patří mezi nejvíce geneticky konzervované části mezi ER a jinými nukleárními receptory. Skládá se zhruba ze 100 aminokyselin, které vytváří dva tzv. „zinc fingers“, z nichž každý váže jeden zinkový atom a jsou zodpovědné za interakci s DNA. LBD obsahuje okolo 250 aminokyselin, které se skládají do 12 antiparalelních vláken  $\alpha$ -helixů a vytváří hydrofobní kavitu o přibližně dvojnásobném objemu, než je objem E2, do které se vážou agonisté ER. Velikost této kavity a rozložení aminokyselinových residuů v ní je pravděpodobně příčinou pozorované tolerance velmi širokého spektra ligandů [37, 38].



**Obrázek 2.4: Model struktury estrogenního receptoru**

*Nahoře*- Schematický náčrt primární struktury estrogenního receptoru s vyznačenými doménami a spojovacími úseky mezi nimi.

*Dole*- 3D struktury DNA vázající domény (navázané na DNA) a ligand vázající domény (s navázaným ligandem) estrogenního receptoru. Zbylé části estrogenního receptoru jsou pouze schematicky znázorněny. Převzato a upraveno z [39].

ER se v buňkách objevuje ve dvou isotypech  $\alpha$  a  $\beta$ . Oba jsou kódovány pouze jedním genem, ty se ale nachází na jiných chromosomech. Gen pro ER $\alpha$  se u lidí nalézá na šestém



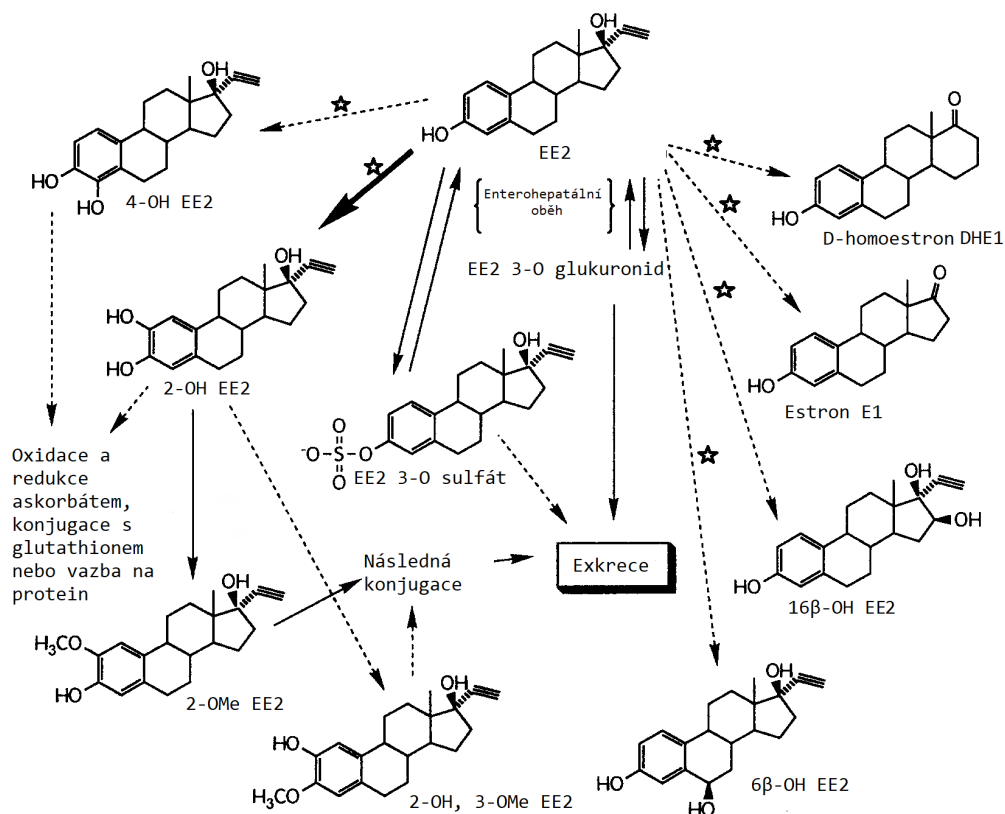
chromosomu, zatímco pro ER $\beta$  na chromosomu čtrnáctém [40, 41]. Oba isotypy vykazují poměrně výraznou homologii v DBD a LBD (98 % a 58 %), ale ne v N-terminální doméně, která je u ER $\beta$  výrazně redukována [42]. Nižší homologie v LBD vysvětluje rozdílnou afinitu obou receptorů k některým látkám, jako jsou například EE2, kumestrol či 4-OH-tamoxifen, u kterých se afinita liší i o stovky procent [25, 43]. Bylo dokázáno, že estrogenní receptory jsou aktivní pouze jako dimery [44]. Pozorovány byly jak homodimery jednotlivých isotypů, tak heterodimery  $\alpha/\beta$  [45].

### 2.1.6 Metabolismus 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu

17 $\alpha$ -ethinylestradiol je v těle metabolizován třemi cestami (obr. 2.5, str. 18). Jedná se o glukuronidaci, sulfataci nebo oxidační přeměny. K metabolickým procesům dochází zejména v játrech, část konjugátů může ale vznikat také ve střevech [46]. Podíl jednotlivých procesů na eliminaci EE2 z organismu se výrazně liší podle způsobu podání. Při intravenózním může být i více než 30 % dávky vylučováno jako 2-hydroxy derivát, který je nejvýznamnějším metabolitem vznikajícím oxidační cestou, avšak při perorálním podání převažují glukuronidové a sulfátové konjugáty, a to jak samotného EE2, tak jeho oxidovaných metabolitů (zejména 2-hydroxy a 2-methoxy derivátů) [47]. Metabolity jsou dále odváděny do žluči a moči. Během prvních 24 hodin odchází z organismu zhruba 35 % EE2 žlučí a okolo 20 % močí [48], z toho v moči nacházíme až 85 % ve formě glukuronidů a 12 % ve formě sulfátů, zbytek tvoří produkty vzniklé oxidačními cestami a nemetabolizovaný EE2 [48, 49].

Za sulfataci jsou zodpovědné sulfotransferasy (SULT), které obecně produkují především konjugáty na 3-O a 17-O. U EE2 je však pravděpodobně kvůli sterickému vlivu ethinylové skupiny hydroxylová skupina na 17C výrazně nepřístupnější a vznikají tak zejména konjugáty na 3-O [50]. Nejvýznamněji se na procesu podílí isoformy SULT1E1 a 1A3, a to díky své vysoké afinitě k EE2 a jeho derivátům, která jim oproti ostatním isoformám umožňuje katalyzovat reakci i při velmi nízkých koncentracích substrátu v řádech stovek pmol/l, které odpovídají koncentracím vyskytujícím se v organismu při denním užívání hormonální antikoncepce, která obsahuje pouze desítky  $\mu\text{g}$  EE2 [51, 52].

Glukuronosyltransferasy (Uridin-5'-difosfo-glukuronosyltransferázy-UGT) vykazují podobnou regioselektivitu jako sulfotransferasy. V produktech také výrazně převažuje 3-O-glukuronid nad konjugátem na 17-O [47]. Na glukuronidaci se největší měrou podílí isoformy UGT1A1 a 1A8, které mají nejvyšší enzymovou aktivitu, přičemž 1A1 zhruba osmkrát vyšší než 1A8 [47, 53].



**Obrázek 2.5: Schéma lidského metabolismu 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu**

Nejvýznamější metabolické přeměny jsou značeny plnou šipkou. Reakce označené hvězdičkou jsou katalyzovány cytochromy P450. Převzato a upraveno z [54].

EE2 podléhá třem typům reakcí oxidačního metabolismu. Jimi jsou hydroxylace, D-homoannulace a odstranění ethinylové skupiny. Všechny reakce, nebo alespoň jejich první kroky, jsou katalyzovány enzymy cytochromy P450 (CYP) z rodiny monooxygenas. Při D-homoannulaci dochází k přesunutí jednoho uhlíku z ethinylové skupiny do D kruhu a vzniká D-homoestron (DHE1) a oxid uhličitý, přičemž první krok je analogický s prvním krokem při odstranění ethinylové skupiny, oba jsou katalyzovány právě CYP [55, 56]. Hydroxylace je z oxidačních přeměn nejčastější a dochází k ní na pozicích 2, 4, 6 a 16 $\beta$  [57]. Výrazně ale

převažuje hydroxylace do polohy 2, která tvoří až 90 % produktů. Na té se podílejí především isoformy CYP3A4 a 2C9, v menší míře také CYP2C8, 2C19, 1A2 a 3A5. Enzymy CYP3A4 a 3A5 katalyzují také přeměnu na 4-hydroxy derivát, rychlost těchto reakcí je ale až desetkrát pomalejší [58].

V metabolismu potkana také převažuje hydroxylace do polohy 2, která je zprostředkována CYP2C6 a 2C11, nad minoritní  $\alpha$ -hydroxylací do zatím neznámé polohy katalyzované zejména podrodinami 2A a 3A, ale také 2B, 2D a 2E [59, 60].

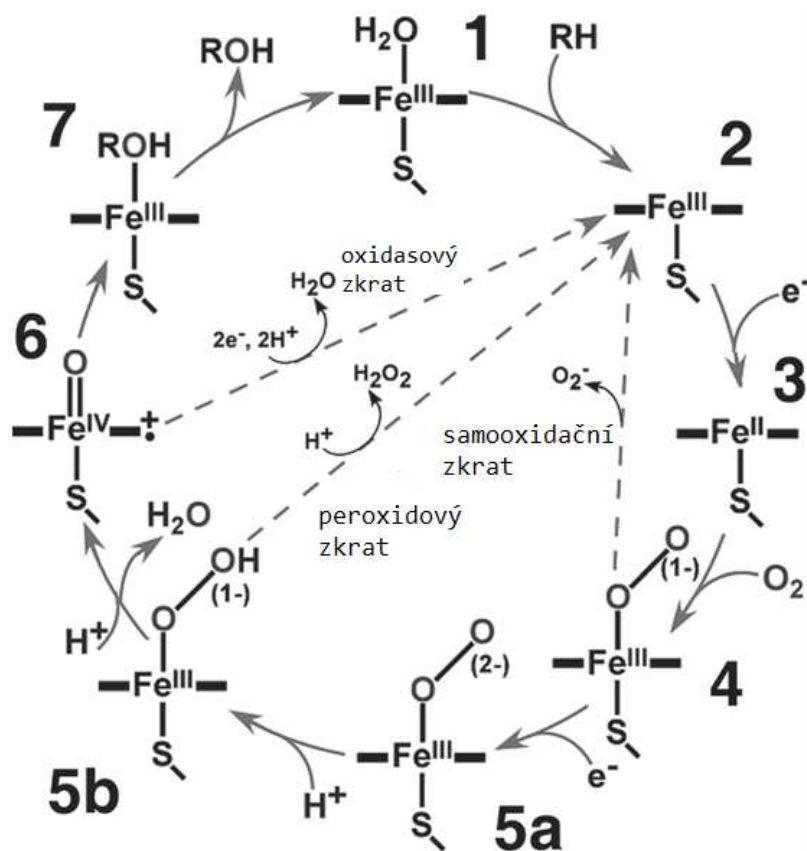
## 2.2 Cytochromy P450

Cytochromy P450 jsou skupina proteinů fungujících jako monooxygenasy. Jako nezbytný kofaktor umožňující průběh reakce jim slouží molekula hemu s koordinovaným atomem železa. Nacházíme je v živočiších, rostlinách, bakteriích ale také houbách. V lidském organismu je můžeme najít ve všech tkáních, největší koncentrace jsou však v játrech a tenkém střevě [61]. Až na výjimky se jedná o membránové vnitrobuněčné proteiny. Jsou přítomny buď na endoplazmatickém retikulu nebo na vnitřní mitochondriální membráně směrem do matrixu [62].

Jako monooxygenasy se smíšenou funkcí katalyzují hydroxylace uhlovodíků, oxidace heteroatomů, alkylační reakce, dimerizace, ale i katabolické reakce dealkylace či dekarboxylace. Všechny tyto reakce začínají stejným krokem, při kterém dochází k navázání kyslíku na substrát. Kofaktory pro tuto reakci jsou prostetický hem a dvě molekuly NADPH (případně NADH), které skrze sdružené proteiny, jako jsou reduktasa a cytochrom  $b_5$ , dodávají do cyklu potřebné elektrony. Schéma katalytického cyklu je zobrazeno na obr. 2.6 (str. 20) [63].

V dnešní době je největší pozornost věnována roli CYP v biotransformačních přeměnách xenobiotik, a to v zejména v tzv. první fázi biotransformace. Tou prochází většina cizorodých látek vstupujících do organismu za účelem zvýšení polaritity těchto látek, což má následně usnadnit jejich vyloučení z organismu. U některých látek může docházet k takovým změnám, které mají za následek zvýšení jejich biologické aktivity. Tohoto mechanismu využívají některá léčiva jako tamoxifen či losartan, jejichž metabolity vykazují výrazně vyšší potenci [64]. Z některých xenobiotik však touto cestou vznikají vysoce reaktivní sloučeniny,

kteří jsou schopné kovalentní vazby na DNA a mohou tak být příčinou vzniku nádorových onemocnění [65]. CYP transformují až 75 % všech používaných léčiv [62], ale jsou také nedílnou součástí přirozeného metabolismu a biosyntézy velkého množství endogenních látek, jako jsou žlučové kyseliny, cholesterol, steroidy, vitamin D3 a jiné [66].



**Obrázek 2.6:** Schéma katalytického cyklu cytochromů P450

2 Molekula vody je vytlačena z reakčního místa molekulou substrátu

3 Hemové železo je redukováno molekulou NADPH skrze asociovanou reduktasu

4 Na atom železa se váže molekula kyslíku

5 **a**-Atom kyslíku, jež není navázán přímo na hemové železo, je dále redukován reduktasou či cytochromem  $b_5$  a **b**-váže se na něj proton

6 Připojení druhého protonu vede k uvolnění molekuly vody a vzniku radikálového kationtu hemu s železem v oxidačním stavu +IV

7 Atom kyslíku atakuje substrát a vzniká oxidovaný produkt

1 Vazebné místo na železu obsazuje molekula vody.

V schématu jsou také vyznačeny cesty možných zkratů, při kterých dochází k uvolnění kyslíku předčasně. Převzato a upraveno z [67].

### 2.2.1 Názvosloví cytochromů P450

Cytochromy P450 řadíme do rodin a podrodin na základě jejich genetické podobnosti. Příslušnost k rodině se značí arabskou číslicí a členové vykazují alespoň 40 % homologii. Podrodina se značí velkým písmenem a zahrnuje proteiny s alespoň 55 % homologií [68]. Poslední číslo vyjadřuje, o který konkrétní protein z této podrodiny se jedná, např.: CYP1A2. U některých cytochromů P450 se používají zažité názvy většinou odkazující na specifický substrát, jehož přeměnu katalyzují, jako je například P450cam, který katalyzuje přeměnu kafru (anglicky camphor).

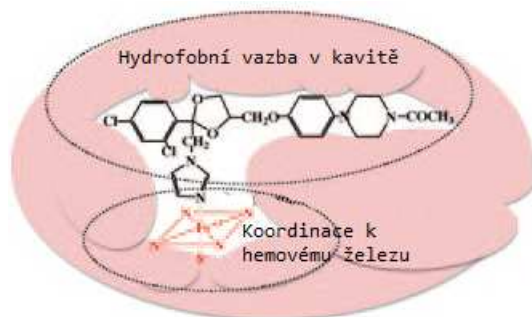
### 2.2.2 Struktura cytochromů P450

Ačkoliv jsou cytochromy P450 velmi širokou skupinou proteinů, existují mezi nimi podstatné strukturální podobnosti. Základní kostru tvoří 12  $\alpha$ -helixů, které označujeme písmeny A-L a struktura  $\beta$ -skládaného listu u N-konce řetězce [69]. V některých částech můžeme pozorovat poměrně vysokou zakonzervovanost a to zejména v oblasti aktivního centra, kde je lokalizován porfyrinový skelet. Ten je stabilizován hydrofobními silami v kavitě, ale také vazbou thiolátové síry z cysteinu na koordinovaný atom železa. Molekula cysteinu je zde „nepřirozeně“ vázána dvěma vodíkovými můstky, jedním z atomu kyslíku a jedním z thiolátové síry, čímž vytváří strukturu  $\beta$ -výdutě. Udržení této pozice thiolátové síry je esenciální pro katalytickou funkci proteinu [62, 65]. Další zachovaná struktura se nachází na  $\alpha$ -helixu I v blízkosti hemového železa. Pomocí systému vodíkových vazeb zde vytváří vhodné prostředí pro organizovaný přístup molekulám vody, které fungují jako donor protonů, čímž umožňuje štěpení O-O vazby molekuly kyslíku, tento krok je kritickým pro aktivaci molekulárního kyslíku [70, 71]. U eukaryotních cytochromů P450 je podstatné zmínit, že obsahují také membránovou kotvu v podobě transmembránového helixu, tu však na strukturálních modelech většinou nenacházíme, protože jednak nemá vliv na funkčnost enzymu [72] a jednak je nevhodná ke krystalizaci proteinu [73].

### 2.2.3 Inhibice cytochromů P450

K inhibici cytochromů P450 může docházet přímo nebo nepřímo. Nepřímá inhibice spočívá ve většině případů na zastavení elektronového řetězce vyřazením jednoho z článků. Inhibici přímou můžeme na základě jejího mechanismu dělit na tři typy: (a) tvorba reverzibilních komplexů, (b) tvorba „kvazi-ireverzibilních“ komplexů s hemovým železem a (c) ireverzibilní vazba s proteinem, hemovou skupinou, degradace proteinu či hemové skupiny. Reverzibilní inhibice probíhá skrze koordinaci k atomu železa v hemové skupině nebo hydrofobní vazbou do kavity enzymu. Jednoznačně historicky nejvýznamnějším reverzibilním inhibitorům je oxid uhelnatý, který se váže na atom železa v oxidačním stavu +II, díky čemuž dochází k posunu absorpčního maxima hemové skupiny na 450 nm [74]. Detekce tohoto posunu vedla k odhalení hemové podstaty proteinu a číslo 450 v názvu této skupiny enzymů se odkazuje právě k tomuto maximu absorpčního pásu, který je pro ni typický. Pro nejúčinnější reverzibilní inhibitory platí, že se do aktivního místa uchycují, jak pomocí koordinace k hemovému železu, tak hydrofobními silami v kavitě. Tohoto principu využívá například látka ketokonazol (obr. 2.7, str. 23), která účinně inhibuje nejen kvasinkový CYP51 [75] a slouží tak jako širokospektrální antimykotikum, ale také CYP17 [76], který se účastní syntézy mužských pohlavních hormonů, a tudíž je využívána také při léčbě rakoviny prostaty.

Pro inhibitory typu (b) a (c) je signifikantní, že vykazují oproti reverzibilním inhibitorům poměrně vysokou specifitu ke konkrétním isoformám CYP. To je důsledkem jejich závislosti na samotném katalytickém cyklu. Aby mohlo dojít ke vzniku reaktivního meziproduktu musí být inhibitor pro daný enzym substrátem a zároveň plnit všechny předpoklady pro reverzibilní inhibitory. Intermediát vznikající aktivací musí následně najít vhodné vazebné místo na apoenzymu, porfyrinovém skeletu, či se vázat přímo na hemové železo [77]. Mezi látky tvořící kvazi-ireverzibilní komplexy s atomem železa patří methylenedioxyfenylové sloučeniny jako je například sesamin, který je součástí sezamového oleje a inhibuje CYP2C9 [78] nebo MDMA (N-methyl-3,4-dioxymethylenamfetamin), látka, která je používána jako rekreační droga známá pod názvem „extáze“ [79]. Další skupinou jsou alkyl- a arylaminy, mezi které patří i makrolidová antibiotika erythromycin, troleandomycin či clarithromycin [80].



**Obrázek 2.7: Ilustrace uchycení ketokonazolu do aktivního místa cytochromu P450 17**

Molekula ketokonazolu se váže do aktivního místa CYP17 a CYP51 dvěma způsoby. Jednak hydrofobní vazbou a jednak koordinací k atomu železa. Převzato a upraveno z [77].

Tvorba kovalentních aduktů s hemem nebo apoproteinem je inaktivačním mechanismem pro velmi široké spektrum látek. V některých případech dominuje tvorba vazby na porfyrinový kruh, což platí pro terminální alkeny (vinyl fluorid [81], okt-1-en7 [82]) či alkylarylhdyrazíny jako je antidepresivum a anxiolytikum fenelzin [83], v jiných převažuje kovalentní navázání na samotný řetězec proteinu. Inaktivace CYP3A4 mifepristonem [84], aktivní látkou prostředků pro chemickou interrupci, vede zejména ke tvorbě aduktů s apoproteinem, stejně tak inaktivace CYP2B1 1-ethynylpyrenem [85]. Ve většině případů tedy pravděpodobně dochází ke vzniku směsi těchto aduktů. To můžeme pozorovat například u epoxidace sekobarbitalu katalyzované CYP2B1, kde krom tvorby produktu dochází také k úplné inaktivaci enzymu. N-alkylace hemu zde převažuje nad alkylací proteinu v poměru 0,8 : 0,2 [86]. Vzniknuvší adukty s hemem mohou být také značně labilní, což znesnadňuje jejich izolaci a následně kvantitativní vyhodnocení jejich významu na inaktivaci CYP oproti jiným mechanismům inhibice [87].

## 2.3 Lidské a potkaní isoformy cytochromů P450

V souvislosti s hledáním kvalitních modelů lidského organismu je cytochromům P450, vzhledem k jejich významu v metabolismu léků a xenobiotik, věnována velká pozornost. Potkan je jedno z nejvyužívanějších laboratorních zvířat s vysokou genetickou i metabolickou příbuzností k člověku [88]. Potkaní CYP2B1 a 2C6 jsou orthology lidských isoform CYP2B6 a 2C9, které jsou důležitými enzymy jednak v metabolických drahách endogenních látek, ale také v procesu biotransformace xenobiotik.

### 2.3.1 Cytochrom P450 2B6

Cytochrom P450 2B6 je lidskou isoformou CYP. Je exprimován primárně v játrech [89], ale také v plicích [90]. Význam jeho role v procesu biotransformace je po kvantitativní stránce značně nejasný z důvodu velkého množství protichůdných výsledků výzkumů určujících jeho mikrozomální koncentraci. V některých studiích nebyl u části testovaných subjektů vůbec identifikován [89, 91] a v některých případech naopak zjištěná koncentrace dosahovala až 82 nmol/mg proteinu [92]. Tento rozptyl způsobuje jednak jeho nízká stabilita spojená s nedostatečnou specifitou protilátek používaných při imunodetekci, ale zejména jeho inducibilita určitými látkami [93]. Současné výzkumy ukazují, že podíl CYP2B6 v mikrozomech tvoří v průměru asi 1-2 % z celkového množství mikrozomálních CYP [93, 94]. K výrazným odchylkám může docházet, jak již bylo řečeno, pokud je organismus vystaven induktorům. Mezi ně patří například blokátory kalciových kanálů nifedipin či israpidine, používané k léčbě anginy pectoris a jiných srdečních onemocnění, antidiabetika ze skupiny thiazolidinedionů troglitazon, pioglitazon a rosiglitazon, statiny lovastatin, simvastatin, fluvastatin a atorvastatin, ale také řada typických induktorů dominantní hepatální monooxygenasy CYP3A4, jako jsou syntetický glukokortikoid dexamethazon, cytostatikum cyklofosamid, barbiturát fenobarbital či antibiotikum rifampicin [95–99].

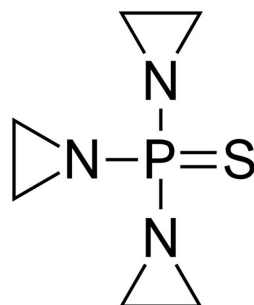
Substrátem pro CYP2B6 je celá řada léčiv, z nichž nejvýznamnějšími jsou dnes bupropion a efavirenz, která slouží také jako diagnostické substráty *in vitro* a *in vivo* [100]. Další důležité látky, jejichž přeměnu katalyzuje, jsou například methadon [101], sloužící jako náhražka heroinu při odvykací léčbě, antimalarikum artemisinin [102] nebo protinádorové



léčivo tamoxifen [103]. Mezi endogenní substráty patří například testosteron, arachidonová kyselina nebo  $17\beta$ -estradiol [104].

### 2.3.1.1 Inhibice cytochromu 2B6

CYP2B6 je inhibován celou řadou organických látek a to od jednoduchých nespecifických inhibitorů jako je acetonitril nebo ethanol [105] až po strukturně komplikované jako jsou antivirotika efavirenz či ritonavir [106]. Na základě porovnání struktur a inhibiční potence 25 známých inhibitorů byly Korhonenem jako „ideální“ inhibitory vyhodnoceny benzylpyridin a jeho deriváty 4-(4-chlorobenzyl)pyridin a 4-(4-aminobenzyl)-pyridin, které nejlépe vyhovují sterickým a elektrostatickým vlastnostem aktivního místa enzymu. Jedná se o reverzibilní inhibitory a jejich  $IC_{50}$  pro reakci hydroxylace bupropionu se pohybují okolo  $0,02 \mu\text{M}$  [107]. Z ireverzibilních inhibitorů je nejúčinnější ticlopidin ( $IC_{50} = 0,2 - 0,8 \mu\text{M}$ ) [108], který inhibuje také CYP1A1/2, 2D6 a zejména 2C19 [109]. Pro selektivní ireverzibilní inhibici CYP2B6 *in vitro* se tak jeví lépe chemoterapeutikum thioTEPA (N,N',N''-triethylenfosforamid; obr. 2.8), které vykazuje až 10x nižší inhibiční účinnost, ale výrazně vyšší selektivitu [109–111].



**Obrázek 2.8: Ireverzibilní selektivní inhibitor cytochromu P450 2B6**  
*N,N',N''-triethylenfosforamid alias thioTEPA* Převzato z [107].

### 2.3.2 Cytochrom P450 2B1

CYP2B1 je potkaní ortholog lidského CYP2B6 se 74% homologií aminokyselinové sekvence [112]. Společně s isoformou 2B2 s 97 % homologií jej nacházíme zejména v potkaních plicích a v menší míře hepatálních mikrozomech. Při ošetření potkanů fenobarbitalem, tradič-

ním induktorem CYP2B rodiny, se hepatální koncentrace zvyšuje až padesátkrát [113, 114]. I přes vysokou míru homologie nemůže CYP2B1 plně sloužit jako kvalitní model pro lidský CYP2B6. Jeho afinita k některým diagnostickým či endogenním substrátům CYP2B6, jako je například 7-ethoxy-4-(trifluormethyl)kumarin (dále jen 7-EFC) [115], kyselina arachidonová [113], kyselina laurová [116], testosteron, 7-benzyloxyresoru-fin a 7-pentoxyresorufin [117] je výrazně odlišná. To je zapříčiněno rozdílnými aminokyselinovými sekvencemi enzymu odpovědnými za rozpoznávání substrátu. Naopak u 4'-hydroxylace bupropionu můžeme pozorovat výraznou korelaci mezi aktivitami obou isoform [117, 118]. U hydroxylace bupropionu vykazují také velmi podobnou afinitu k substrátu. Pro CYP2B1 z potkaních hepatálních mikrozomů byla určena  $K_m = 158,5 \mu\text{M}$  [118] a pro CYP2B6 z lidských hepatálních mikrozomů  $K_m = 130 \mu\text{M}$  [119].

### 2.3.3 Cytochrom P450 2C9

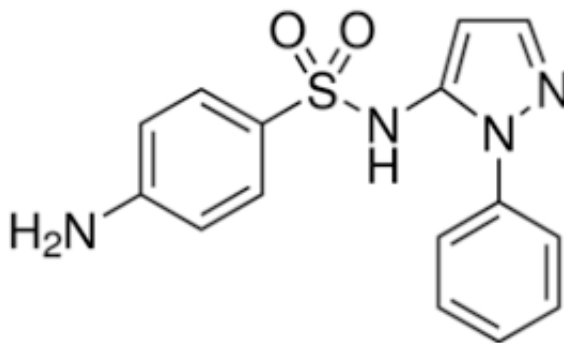
Jedná se o jednu z nejvýznamnějších lidských isoform CYP. V průměru tvoří okolo 25 % jaterní zásoby CYP [120]. O jeho významu pro lidský organismus svědčí také to, že biotransformuje zhruba 16 % dostupných léčiv [121]. Kromě jater nacházíme jeho mRNA také v ledvinách, nadledvinách, varlately, prostatě, vaječnicích [122] a srdeční tkáni [123]. Jeho aktivita byla pozorována také v tenkém střevě [124]. Induktorům CYP2C9 je věnována velká pozornost, protože je hlavním enzymem metabolizujícím masově používaný antikoagulant warfarin respektive jeho účinnější stereoisomer S-warfarin, jehož koncentrace v krvi je kvůli nežádoucím účinkům nadměrných i nedostatečných dávek nutno kontrolovat. Expres CYP2C9 je podobně jako CYP2B6 a 3A4 indukována fenobarbitalem, dexamethazonem a rifampicinem [125].

Kromě warfarinu metabolizuje CYP2C9 další významná léčiva jako protinádorová léčiva tamoxifen a cyklofosfamid, nesteroidní protizánětlivá léčiva ibuprofen, diklofenak nebo celekoxib, antihypertenziva losartan a irbesartan, statin fluvastatin, antidiabetika tolbutamid, glipizid, glimepirid a glibenklamid a antiepileptikum fenytoin [126]. Jsou také společně s isoformou 2C8 hlavními enzymy hepatálního metabolismu důležitých endogenních látek kyseliny arachidonové a kyseliny retinové [127, 128]. Dalším specifikem CYP2C9 je jeho výrazný polymorfismus, který má podstatný farmakogenetický dopad. Ve světové populaci nacházíme

zejména tři varianty, a to divoký typ označovaný \*1 a dvě polymorfní alely s aminokyselinovou mutací R144C a I359L, které označujeme \*2 a \*3 [126]. Tyto varianty mají podstatně vyšší zastoupení v bělošské populaci, kde je jejich výskyt alespoň v jedné alele u 35 % jedinců [129]. Oproti divokému typu vykazují výrazně nižší aktivitu pro některé substráty a proto je s nimi spojeno množství zdravotních rizik jako jsou komplikace s krvácením při léčbou warfarinem [130], vyšší riziko předávkování fenytoinem [131] nebo velmi nízké hodnoty glykemie při podávání tolbutamidu nebo glipizidu [132].

### 2.3.3.1 Inhibice cytochromu 2C9

Inhibice CYP2C9 je z medicínského hlediska také velmi významná z výše uvedených důvodů. Například antiarytmický lék amiodaron při podání 400 mg denně zvyšuje poločas S-warfarinu v organismu o 66% [133]. Jiný velmi potentní inhibitor sulfafenazol (obr. 2.9) inhibuje CYP2C9 s  $IC_{50} = 0,5 \mu\text{M}$ , jedná se o současně nejselektivnější známý inhibitor CYP2C9 [134]. Dalšími inhibitory CYP2C9 jsou antibiotikum chloramfenikol, antimykotikum flukonazol a mikonazol, nesteroidní analgetikum fenybutazon nebo statin fluvastatin [135–139].



**Obrázek 2.9:** Účinný selektivní inhibitor obou isoform cytochromu P450 2C9 a 2C6  
Sulfafenazol

### 2.3.4 Cytochrom P450 2C6

CYP2C6 tvoří asi 20 % z CYP v potkaních jaterních mikrozomech a dále se nachází také silně zastoupen v tenkém střevě [140, 141]. V mnoha ohledech je možno jej považovat za protějšek lidského CYP2C9. Jejich aminokyselinové sekvence vykazují 75% homologii [142], stejně jako on selektivně katalyzuje 4'-hydroxylaci diklofenaku [143] a také 7-hydroxylaci warfarinu [144]. Dále také sdílejí schopnost 21-hydroxylace progesteronu [145] a oba jsou selektivně inhibovány sulfafenazolem [146]. Společně mají i některé induktory jako dexame-thazon a fenobarbital [147]. Dalším společným rysem je katalýza hydroxylace arachidonové kyseliny, přirozeného endogenního substrátu CYP2C9, ačkoliv oproti jiné potkaní isoformě 2C11 je jeho podíl méně významný [116].

## 2.4 Vliv $17\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu cytochromů P450

$17\alpha$ -ethinylestradiol je známý jako ireverzibilní na mechanismus vázaný inhibitor některých CYP, což znamená že při jeho přeměně těmito enzymy dochází k jeho aktivaci a vzniku reaktivních meziproductů, které jsou poté schopny inaktivovat enzym. O navázání inhibice na mechanismus svědčí také pozorovaná snížená aktivita enzymu při preinkubaci s EE2 a NADPH kofaktorem CYP [4]. K inhibici dochází po aktivaci jeho acetylenové skupiny na 17C, která je oxidována. Vzniklý reaktivní meziproduct byl dříve považován za oxiren. Oxiren je však velice nestabilní a jedná se tedy pravděpodobně o přechodné meziproducty příbuzné s oxirenem [148]. Tyto reaktivní meziproducty mohou dále vést k D-homoanulaci a tvorbě stabilního D-homoestronu, ale také se mohou kovalentně vázat na apoprotein nebo prostetický hem, čímž dochází k inaktivaci enzymu [149, 150]. Inhibice EE2 byla sledována u CYP1A1, 1A2, 2B1, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2J2, 3A4 a 3A5 [4, 47, 149–151]. U potkanů byl pozorován také indukční vliv na expresi CYP a to u isoform CYP3A9 [5], 2B1 a 2B2 [152] a 2C11 společně se zvýšenou mikrosomální aktivitou CYP2C6 [153].

### 2.4.1 Vliv $17\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu cytochromů P450 2C9 a 2C6

Cytochrom P450 2C9 je (viz výše) společně s CYP3A4 nejdůležitějším CYP metabolizujícím EE2 v lidském organismu a stejně tak CYP2C6 v organismu potkaním. U obou enzymů byl prokázán inhibiční vliv EE2, ačkoliv u CYP2C6 pouze nepřímo jako snížení aktivity 21-hydroxylace progesteronu v potkaních hepatálních mikrozomech [59]. Hodnota  $IC_{50}$  pro CYP2C9 pro reakci 4'-hydroxylace diklofenaku bez preinkubace s NADPH činila  $13 \mu\text{M}$  (při koncentraci enzymu  $0,15 \text{ mg/ml}$  a koncentraci substrátu  $10 \mu\text{M}$ ) [4]. Hodnota  $IC_{50}$  pro CYP2C6 zatím stanovena nebyla. Jaký souhrnný vliv má EE2 na aktivitu CYP2C6 a 2C9 v živém organismu je však nejasné. V potkaním organismu dochází k indukci exprese CYP2C6, a ta může vyrovnávat inhibiční vliv EE2. Ve studii od Shelepopové, kdy bylo 10 ženám denně podávána směs látek (kofein, dextrometorfan, omeprazole, midazolam, warfarin, vitamin K a norgestimat) společně s  $35 \mu\text{g}$  EE2, byla pozorována dokonce zvýšená clearance S-warfarinu, způsobená zvýšením aktivity CYP2C9 [154].

### 2.4.2 Vliv $17\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu cytochromů P450 2B6 a 2B1

Stejně jako CYP2C6 a 2C9 jsou CYP2B1 a 2B6 součástí metabolismu EE2, ačkoliv v mnohem menší míře. U obou byl prokázán inhibiční vliv EE2 na 7-deethylaci 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)kumarinu [151] a u CYP 2B6 také na hydroxylaci bupropiou [4, 155]. Bylo pozorováno že inhibice deethylace 7-EFC EE2 je závislá na preinkubaci EE2 s enzymem a NADPH, z čehož vyplývá, že je vázána na mechanismus katalýzy [151, 156]. Naopak u hydroxylace bupropionu CYP2B6 tato závislost pozorována nebyla [4]. Z dostupných dat se EE2 jeví jako účinnější inhibitor CYP2B6 než 2B1. To je pravděpodobně způsobeno rozdílnou katalytickou specifičností obou enzymů. Zatímco CYP2B1 katalyzuje nejrychleji hydroxylaci EE2 do polohy 2, u CYP2B6 je upřednostňována oxidace ethinylové skupiny, která vede k tvorbě reaktivního meziprojektu, který je na rozdíl od dihydrodiolu schopen vazby na apoprotein

[60]. O silnější inhibici CYP2B6 vypovídají i hodnoty inhibiční konstanty. U deethylace 7-EFC odpovídají  $0,8 \mu\text{M}$  pro CYP2B6 a  $11 \mu\text{M}$  pro 2B1 [151] (pro CYP2B1 z jiné studie  $9 \mu\text{M}$  [156]). Pro hydroxylaci bupropionu jsou známy hodnoty  $IC_{50}$  a to  $41 \mu\text{M}$  (při koncentraci enzymu  $5 \text{ pmol/ml}$  koncentraci substrátu  $80 \mu\text{M}$ ) [4] a  $17,6 \mu\text{M}$  (při koncentraci enzymu  $1,8 \text{ pmol/ml}$  a koncentraci substrátu  $82 \mu\text{M} = K_m$ ) [155]. Inhibiční vliv EE2 na hydroxylaci bupropionu katalyzovanou CYP2B1 znám není.

### 3. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je studium vlivu endokrinního disruptoru  $17\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu potkaních a lidských isoform CYP podrodin 2B a 2C.

Hlavní cíl této práce byl:

- Potvrzení inhibičního vlivu  $17\alpha$ -ethinylestradiolu na lidské a potkaní isoformy CYP (CYP2B1, CYP2B6, CYP2C6, CYP2C9).
- V případě inhibice aktivity cytochromů P450 určení  $IC_{50}$  pro příslušné isoformy.
- Porovnání inhibičního vlivu EE2 na lidské isoformy CYP a jejich potkaní orthology.

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Použité chemikálie

**4'-hydroxydiklofenak** Sigma-Aldrich, USA

**7-pentoxyresorufin** Sigma-Aldrich, USA

**17 $\alpha$ -ethinylestradiol** Sigma-Aldrich, USA

**Acetonitril pro HPLC** VWR Chemicals, USA

**Bupropion** Sigma-Aldrich, USA

**Dihydrogenfosforečnan draselný** Lach:Ner, ČR

**Diklofenak, sodná sůl** Sigma-Aldrich, USA

**Dimethylsulfoxid** Lach:Ner, ČR

**Ethylacetát** Lach:Ner, ČR

**Chlorid hořečnatý** Lach:Ner, ČR

**Kapalný dusík** Linde, ČR

**Kyselina chlorovodíková 35 %** Lach:Ner, ČR

**Kyselina octová 99%** Lach:Ner, ČR

**N-fenylanthranilová kyselina** Sigma-Aldrich, USA

**NADPH, sodná sůl** Roche, Švýcarsko

**Resorufin** Sigma-Aldrich, USA

**Supersomy<sup>TM</sup> CYP2B1, CYP2B6, CYP2C6, CYP2C9** Corning, USA

**Tripolidin** Sigma-Aldrich, USA



## 4.2 Použité přístroje

**Analytické váhy Discovery DV215CD** OHAUS, USA

**Automatické pipety Research plus** Eppendorf, Německo

**Centrifuga Centrifuge 5148** Eppendorf, Německo

**HPLC kolona Nucleosil C18, 100-5, 25 cm x 4,6 mm** Macherey-Nagel, Německo

**HPLC předkolona Nucleosil C18 100-5** Macherey-Nagel, Německo

**HPLC systém Agilent Technologies 1200 series** Agilent Technologies, USA

**Mini centrifuga Spectrafuge C1301** Labnet, USA

**pH metr HI2211** Hanna instruments, USA

**Předvážka 440-35A** Kern & Sohn GmbH, Německo

**Rotační odparka Centrivap concentrator** Labconco, USA

**Spektrofotometr Tecan Infinite M200 Pro microplate reader** Tecan, Švýcarsko

**Termoblok Thermomixer compact** Eppendorf, Německo

**Třepačka MS1-minishaker** IKA, Německo

**Třepačka GV lab** Gilson, USA

## 4.3 Použité metody

### 4.3.1 Stanovení aktivity cytochromů P450 2C6 a 2C9 -

#### 4'-hydroxylace diklofenaku

Pro zkoumání inhibičního vlivu EE2 na CYP2C6 a 2C9 byla použita markerová reakce 4'-hydroxylace diklofenaku [143, 157]. Byly použity rekombinantní CYP exprimované v Supersomech<sup>TM</sup> (Corning), což jsou CYP exprimované v hmyzích buňkách infikovaných bakulovirem s rekombinantní DNA. Reakce byla inhibována EE2 v koncentracích v rozmezí od 0,1x  $c_s$  do 10x  $c_s$ , kde  $c_s$  je koncentrace substrátu. Inkubační směsi byly připravovány v tripletech pro CYP2C9 a v dubletech pro CYP2C6.

Složení inkubační směsi o celkovém objemu 500  $\mu$ l:

- 30 pmol/ml CYP2C9 nebo 80 pmol/ml pro CYP2C6 (1 nmol/ml v Supersomech<sup>TM</sup>)
- 50  $\mu$ M diklofenak (zásobní roztok v DMSO o koncentraci 10 mM)
- EE2 v odpovídajících koncentracích (zásobní roztoky v DMSO o dvousetnásobné koncentraci než výsledná koncentrace v inkubační směsi)/DMSO pro neinhibovaný vzorek
- 100 mM fosfátový pufr -  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH=7,4
- 1mM NADPH generující systém (zásobní roztok: 10mM NADP<sup>+</sup>, 100mM  $\text{MgCl}_2$ , 100mM glukosa-6-fosfát, 10 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa)

Nejdříve byly připraveny preinkubační směsi pro jednotlivé triplety/dublety s příslušnými koncentracemi inhibitoru, které obsahovaly všechny složky kromě generujícího systému. Preinkubace probíhala po dobu 8 minut při 37 °C za třepání 400 RPM (Thermomixer compact-Eppendorf). Množství DMSO v inkubační směsi nepřesáhlo 1 % jejího objemu. Následně byla přidáním generujícího systému zahájena reakce. Po 15 minutách byla zastavena přidáním 100  $\mu$ l ledového acetonitrilu a 20vteřinovým mícháním na vortexu. Reakce v jednotlivých vzorcích byly zahajovány a následně ukončovány v pravidelných dvacetivteřinových intervalech, aby byla dodržena přesná doba inkubace ( $T_0$ , že reakce probíhá při této koncentraci enzymu

a substrátu po celou dobu podle kinetiky 0. řádu, bylo ověřeno v předchozím zde neuvedeném experimentu pro CYP2C9.) Po přidání 10  $\mu$ l 10 mM N-fenylanthranilové kyseliny jako vnitřního standardu do všech vzorků byly metabolity extrahovány 1 ml ethylacetátu. Reakční směs byla po přidání ethylacetátu třepána 3 minuty při 1400 RPM na třepačce (Thermomixer compact-Eppendorf) za laboratorní teploty a poté centrifugována 5 minut (16 000 g). Následně byla odebrána organická fáze a extrakce byla provedena znovu. Získaná organická fáze byla poté odpařena na odparce. Před měřením byly odpařené vzorky rozpuštěny v 40  $\mu$ l methanolu. Za stejných podmínek byly připraveny ještě dva slepé referenční vzorky, z nichž jeden neobsahoval NADPH generující systém a druhý neobsahoval Supersomy<sup>TM</sup>. Chybějící složky byly nahrazeny pufrem.

#### **4.3.1.1 Separace metabolitů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a analýza získaných dat**

Vzniklé metabolity byly separovány na kapalinovém chromatografu metodou HPLC podle Kaphalia [158] a s pomocí kalibrační křivky byla kvantifikována koncentrace 4'-hydroxydiklofenaku v jednotlivých vzorcích. Eluce probíhala izokraticky při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min po dobu 17 minut. Mobilní fáze sestávala ze směsi acetonitrilu a acetátového pufru (75mM; pH=5) v poměru 51:49. K separaci byla použita kolona Macherey-Nagel NUCLEOSIL C18 temperována na teplotu 35 °C. Nástřík na kolonu činil 20  $\mu$ l. Detekce probíhala spektrofotometricky v UV oblasti při 272 nm. 4'-hydroxydiklofenak byl eluován v čase 6,3 minuty.

Koncentrace metabolitu v reakčních směsích byla stanovena na základě kalibrační křivky s koncentracemi 4'-OH-diklofenaku v rozmezí od 10 do 500  $\mu$ M. Plochy píků 4'-hydroxydiklofenaku byly vztaženy k plochám píků vnitřního standardu v příslušných vzorcích. Ze zjištěné koncentrace byla následně vypočtena specifická aktivita CYP2C6 a 2C9. Aktivity inhibovaných reakcí byly porovnány s neinhibovanou aktivitou enzymu, do jehož reakční směsi byl namísto roztoku EE2 přidán DMSO v odpovídajícím objemu. Výsledkem bylo obdržení logaritmické křivky, vyjadřující závislost inhibice proteinu (v procentech relativní aktivity) na koncentraci inhibitoru, z níž byla určena hodnota  $IC_{50}$ .

### 4.3.2 Stanovení aktivity cytochromů P450 2B1 a 2B6 - hydroxylace bupropionu

Hydroxylace bupropionu (3-chloro-N-tercbutyl- $\beta$ -keto- $\alpha$ -methylfenethylamin) je selektivní *in vitro* reakce pro CYP2B1 a 2B6 [118, 119]. Byly použity rekombinantní CYP v Supersomech<sup>TM</sup>. Reakce byla inhibována EE2 v koncentracích násobků koncentrace substrátu v rozmezí od 0,01x  $c_s$  do 1x  $c_s$  a pro každou koncentraci byla prováděna v tripletech.

Složení reakční směsi o celkovém objemu 250  $\mu$ l:

- 60 pmol/ml CYP2B1 nebo 2B6 (1 nmol/ml v Supersomech<sup>TM</sup>)
- 200  $\mu$ M bupropion (zásobní roztok v destilované vodě o koncentraci 20 mM)
- EE2 v odpovídajících koncentracích (zásobní roztoky v DMSO o stonásobné koncentraci než výsledná koncentrace v inkubační směsi)/DMSO pro neinhibovaný vzorek
- 50mM fosfátový pufr -  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH=7,4
- 1mM NADPH generující systém (zásobní roztok: 10mM NADP<sup>+</sup>, 100mM  $\text{MgCl}_2$ , 100mM glukosa-6-fosfát, 10 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa)

Jako první byly připraveny preinkubační směsi pro jednotlivé koncentrace EE2 bez generujícího systému. Preinkubace probíhala 5 minut za třepání na třepačce 400 RPM (Thermomixer compact-Eppendorf) při 37 °C. Množství DMSO v inkubační směsi nepřesáhlo 1 % jejího objemu. Reakce byla spuštěna přidáním 25  $\mu$ l generujícího systému a probíhala po dobu 15 minut za stejných podmínek jako preinkubace. (Ověření, že reakce běží celou dobou podle kinetiky 0. řádu, bylo provedeno v předchozím zde neuvedeném experimentu pro CYP2B6.) Přidáním 50  $\mu$ l 1M HCl a důkladným zamícháním na vortexu byla reakce zastavena a poté bylo do směsi přidáno 10  $\mu$ l vnitřního standardu 1,25mM triprolidinu. Vzorky byly následně třepány 3 minuty při 1400 RPM (Thermomixer compact-Eppendorf) za laboratorní teploty na třepačce a poté centrifugovány 10 minut při 16 000 g. Byl odebrán supernatant, který byl dále použit k vyhodnocení. Za stejných podmínek byly připraveny ještě dva slepé referenční vzorky, z nichž jeden neobsahoval NADPH generující systém a druhý neobsahoval Supersomy<sup>TM</sup>.

#### 4.3.2.1 Separace metabolitů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a analýza získaných dat

Produkty reakce byly separovány na zařízení pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií podle upravené metody [159]. Separace probíhala na koloně Nucleosil 250x4 mm, C18, 100-5, HD (Macharey-Nagel), isokraticky, za laboratorní teploty po dobu 20 minut. Mobilní fáze sestávala ze směsi 50 mM fosfátového pufru (pH= 2,8, upraveno 1M HCl) a 100% acetonitrilu v poměru 79:21. Nástřik na kolonu činil 100  $\mu$ l a průtoková rychlost byla 1,5 ml/min. Látky byly detekovány spektrofotometricky v oblasti UV při 214 nm. Metabolit bupropionu hydroxybupropion byl eluován v čase 5,5 minuty.

Na základě sestrojené kalibrační křivky pro koncentrace hydroxybupropionu 0,5-200  $\mu$ M byla určena koncentrace metabolitu v reakčních směsích. Ze zjištěné koncentrace byla následně vypočtena specifická aktivita CYP2B6 a 2B1. Aktivity inhibovaných reakcí byly porovnány s neinhibovanou aktivitou enzymu, do jehož reakční směsi bylo namísto roz-  
toku EE2 přidáno DMSO v odpovídajícím objemu. Výsledkem bylo obdržení logaritmické křivky, vyjadřující závislost inhibice proteinu (v procentech relativní aktivity) na koncentraci inhibitoru, z níž byla určena hodnota  $IC_{50}$ .

### 4.3.3 Stanovení aktivity cytochromu P450 2B1 -

#### *O*-depentylace 7-pentoxyresorufinu

Depentylace 7-pentoxyresorufinu je rychlou selektivní metodou k stanovení aktivity CYP2B1 [143, 160]. Produkt reakce resorufin na rozdíl od 7-pentoxyresorufinu vykazuje fluorescenční vlastnosti. Při excitaci při vlnové délce 530 nm (excitační maximum je 563 nm) emituje záření s maximem okolo 585 nm. Intenzita fluorescenčního záření je přímo úměrná látkovému množství produktu v reakční směsi. Takto lze bezprostředně pozorovat průběh tvorby resorufinu.

Reakční směs o celkovém objemu 200  $\mu$  obsahovala:

- 20 pmol/ml CYP2B1 (1 nmol/ml v Supersomech<sup>TM</sup>)
- 2  $\mu$ M 7-pentoxyresorufin (zásobní roztok v DMSO o koncentraci 0,8 mM)
- EE2 v odpovídajících koncentracích (zásobní roztoky v DMSO o čtyřnásobné koncentraci než výsledná koncentrace v inkubační směsi)/DMSO pro neinhibovaný vzorek - Množství DMSO v inkubační směsi nepřesáhlo 1 % jejího objemu
- 100mM fosfátový pufr -  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH=7,4
- 0,5mM NADPH (zásobní roztok v pufru o koncentraci 5 mM)

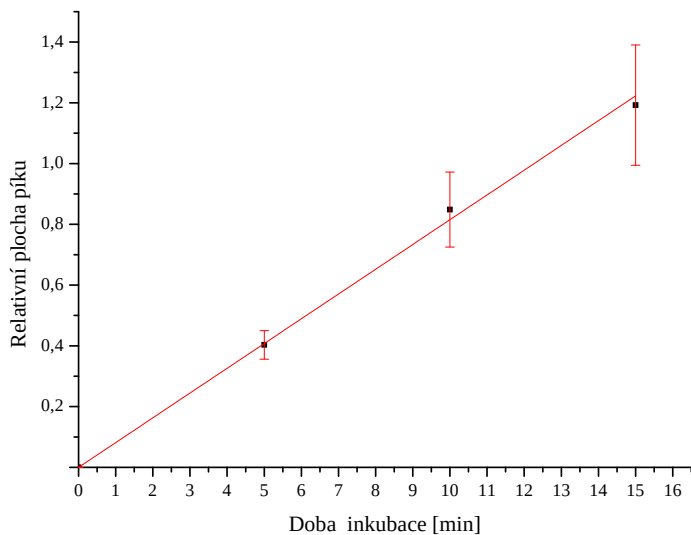
Reakční směsi byly připravovány vždy ve dvou kvadrupletech z nichž jeden obsahoval inhibitor o příslušné koncentraci a druhý pouze odpovídající množství DMSO. Nejprve byla připravena preinkubační směs pro čtyři vzorky najednou bez roztoku NADPH, která byla 10 minut preinkubována na třepačce při 400 RPM (Thermomixer compact-Eppendorf) a teplotě 37 °C. Následně byla tato směs rozpipetována po 180  $\mu$ l do mikrotitrační destičky. Poté byla zahájena reakce přidáním 20  $\mu$ l 5mM roztoku NADPH, který byl v rychlém sledu přidáván do jednotlivých jamek, krom prvních jamek kvadrupletů, které sloužili jako slepé vzorky a namísto roztoku NADPH tam byl přidán pouze pufr o stejném objemu. Bezprostředně poté byla destička umístěna do spektrofotometru a měřena fluorescence v půlminutových intervalech po dobu 8 minut (excitace 530 nm; emise 585 nm; teplota 37 °C). Získané hodnoty fluorescence byly pomocí sestavené kalibrační křivky v rozsahu od 0 do 160 pmol resorufinu

převedeny na odpovídající látková množství produktu. Z těch byla poté vypočtena specifická aktivita inhibovaných a neinhibovaných reakcí jejichž poměr vyjadřuje relativní specifickou aktivitu enzymu. Ta byla následně vynesena do grafu jako funkce logaritmu koncentrace EE2 v jednotlivých vzorcích a z proložené křivky určena hodnota  $IC_{50}$ .

## 5. Výsledky

### 5.1 Vliv $17\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu CYP2C6 a 2C9

Změna specifické aktivity rekombinantních CYP2C6 a 2C9 při vystavení EE2 byla pozorována na reakci 4'-hydroxylace diklofenaku. Pro pozdější vyhodnocení dat byla nejprve sestrojena kalibrační křivka pro různé koncentrace produktu (10; 20; 50; 100; 200 a 500  $\mu\text{M}$ ). Plochy píků 4'-hydroxydiklofenaku byly vztaženy na plochy píků standardu. Následně bylo, pro optimalizaci použitého množství enzymu a délky času inkubace reakce, provedeno měření ověřující, zda při koncentraci CYP2C9 40 pmol/ml probíhá reakce kinetikou 0. řádu. Tento předpoklad byl potvrzen (obr. 5.1) a na jeho základě byl stanoven inkubační čas na 15 minut a výsledná koncentrace enzymu 30 pmol/ml v hlavním experimentu. Koncentrace 80 pmol/ml pro CYP2C6 byla zvolena z důvodu jeho velmi nízké specifické aktivity, která byla pozorována v neuvedeném experimentu.

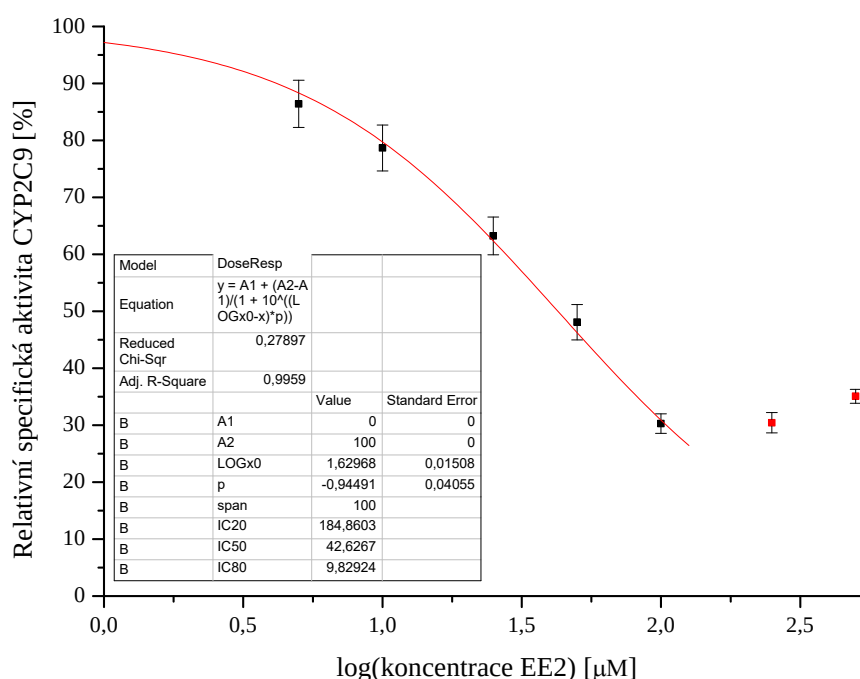


**Obrázek 5.1:** Závislost tvorby 4'-hydroxydiklofenaku katalyzované CYP2C9 na čase

Koncentrace CYP2C9 činila 40 pmol/ml. Plocha píku 4'-hydroxydiklofenaku byla vztažena k ploše píku vnitřního standardu *N*-fenylanthranilové kyseliny.



Inhibiční vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na CYP2C9 byl měřen pro koncentrace 0 (vzorek s DMSO); 5; 10; 25; 50; 100; 250 a 500  $\mu$ M EE2 a koncentraci substrátu 50  $\mu$ M. Po vyhodnocení koncentrace metabolitu vzniklého v reakčních směsích byla vypočtena specifická aktivita. Hodnoty inhibovaných specifických aktivit byly převedeny na relativní specifickou aktivitu vztaženou k neinhibovanému vzorku. Ty byly následně vyneseny do grafu v závislosti na logaritmu koncentrace EE2 (obr. 5.2). Nejvyšší koncentrace 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu 250 a 500  $\mu$ M se nepodařilo v reakční směsi plně rozpustit. Z tohoto důvodu nebylo možné zjištěné relativní specifické aktivity použít k vyhodnocení hodnoty  $IC_{50}$  a křivka je tak pouze částečná. Z proložené křivky byla pro CYP2C9 určena orientační hodnota  $IC_{50} \approx 40 \mu$ M (při koncentraci enzymu 30 pmol/l a koncentraci substrátu 50  $\mu$ M).

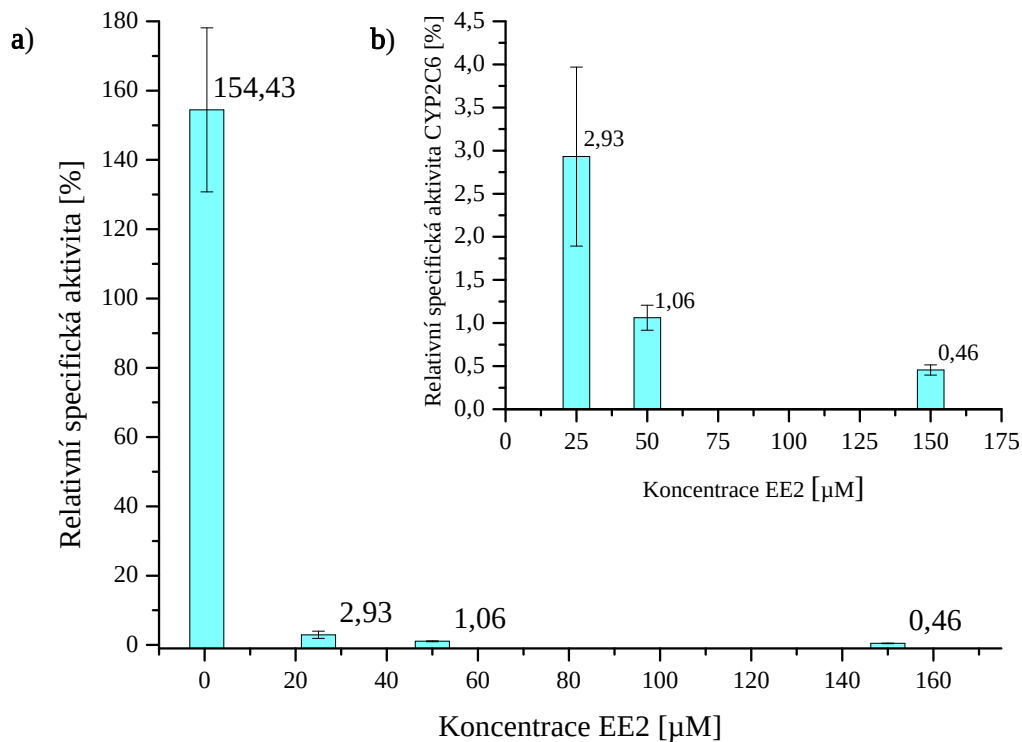


**Obrázek 5.2: Závislost relativní specifické aktivity CYP2C9 na logaritmu koncentrace EE2**

Aktivita CYP2C9 byla stanovena selektivní reakcí 4'-hydroxylací diklofenaku. Nejvyšší koncentrace 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu 250 a 500  $\mu$ M se nepodařilo v reakční směsi plně rozpustit. Body představující tyto vzorky v grafu jsou označeny červeně.

Cytochrom P450 2C6 vykazoval výrazně vyšší inhibiční vlivem EE2 oproti lidské isoformě 2C9. Inhibiční vliv byl zkoumán pro koncentrace inhibitoru 0 (vzorek s DMSO);

0,5; 25; 50 a  $150 \mu\text{M}^1$ . Vyhodnocení dat bylo provedeno analogicky jako pro CYP2C9. Při použití koncentrací EE2 25; 50 a  $150 \mu\text{M}$  byla již aktivita enzymu takřka nulová. Naopak u koncentrace  $0,5 \mu\text{M}$  byla překvapivě pozorována dokonce zvýšená aktivita (obr. 5.3). Tato byla pravděpodobně zapříčiněna nižším podílem DMSO v reakční směsi (viz oddíl 6).



**Obrázek 5.3: a) Závislost relativní specifické aktivity CYP2C6 na logaritmu koncentrace EE2**

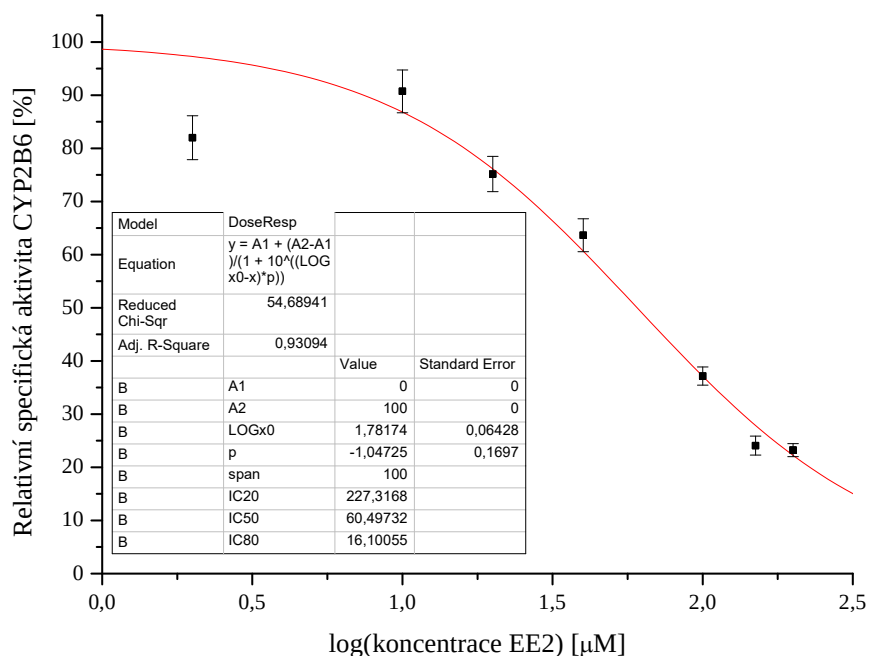
**b) Detail grafu a) pro vyšší koncentrace EE2 ve směsi**

Aktivita byla měřena selektivní reakcí 4'-hydroxylací diklofenaku.

<sup>1</sup>Omezení počtu koncentrací bylo z důvodu nedostatečné zásoby dostupného cytochromu P450 2C6.

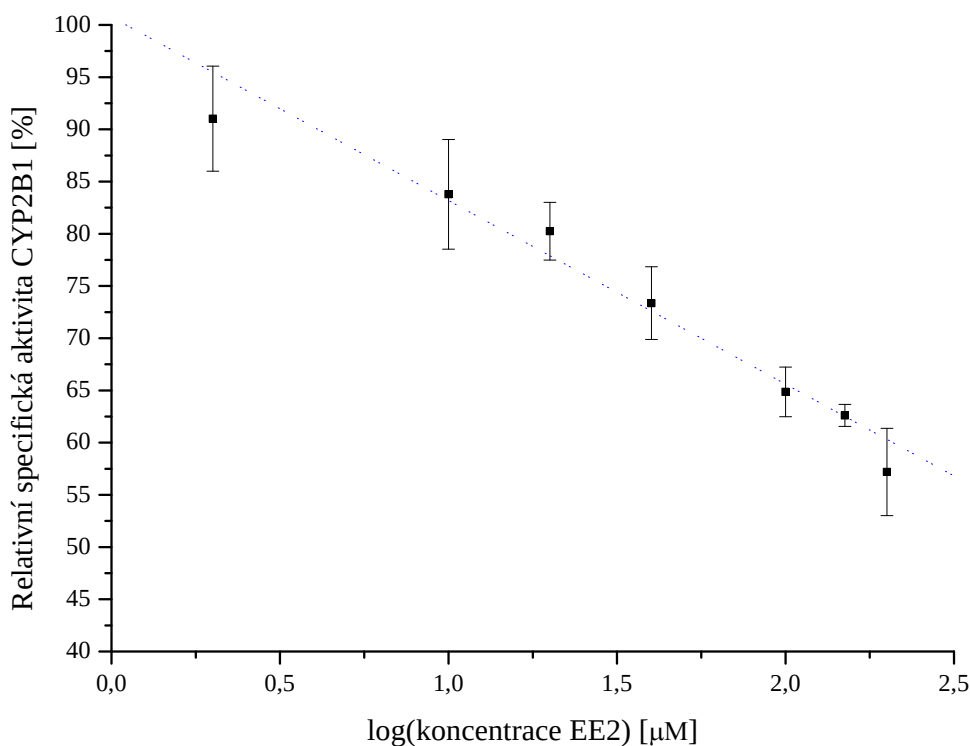
## 5.2 Vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu CYP2B1 a 2B6

Kalibrační křivka pro vyhodnocení hydroxylace bupropionu byla sestrojena s koncentracemi hydroxybupropionu v rozmezí od 0,2 do 200  $\mu\text{M}$ . Podmínky pro reakci, jako je vhodný poměr koncentrací substrátu a enzymu k zajištění průběhu reakce kinetikou 0. řádu, byly zvoleny na základě zatím nepublikovaných dat Bc. Barbory Otáhalové. Z důvodu nízké, již výše zmíněné (kapitola 5.1, str. 41), rozpustnosti EE2 byla maximální možná koncentrace inhibitoru v roztoku rovna koncentraci substrátu. U obou enzymů se jednalo o koncentrace 0 (vzorek s DMSO); 2; 10; 20; 40; 100; 150 a 200  $\mu\text{M}$ . Zjištěné koncentrace metabolitu v jednotlivých vzorcích byly vyhodnoceny obdobně jako u CYP2C (kapitola 5.1, str. 40). Hodnota  $IC_{50}$  EE2 pro hydroxylaci bupropionu CYP2B6 odpovídá 60  $\mu\text{M}$  (obr. 5.4) (při koncentraci enzymu 60 pmol/ml a koncentraci substrátu 200  $\mu\text{M}$ ).



**Obrázek 5.4:** Závislost relativní specifické aktivity CYP2B6 na logaritmu koncentrace EE2  
Aktivita CYP2B6 byla stanovena selektivní reakcí hydroxylací bupropionu.

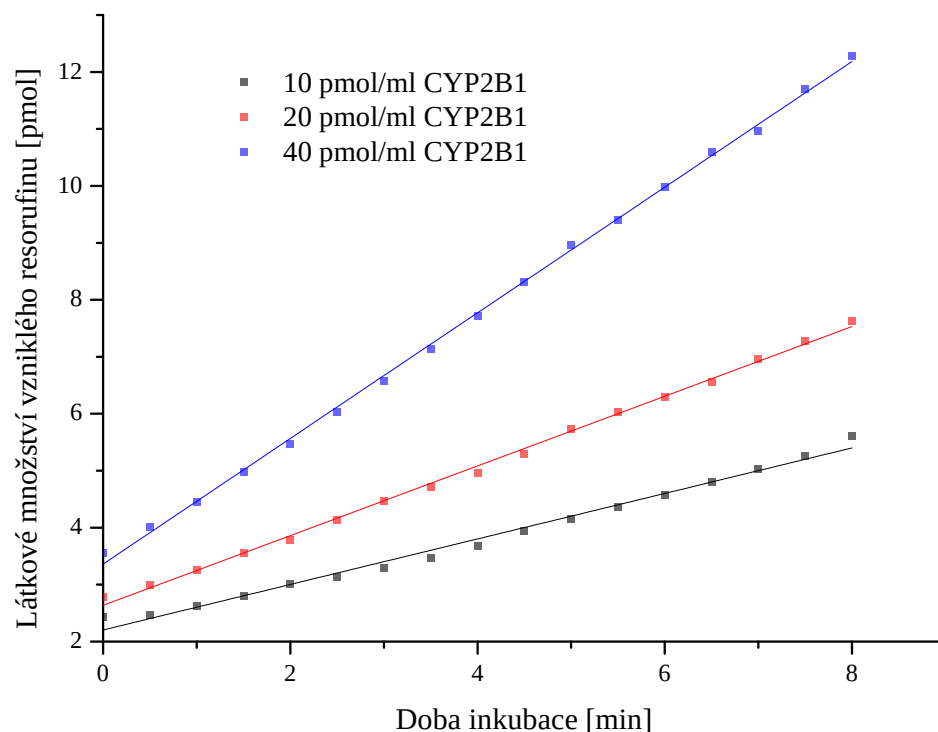
Pro CYP2B1 nebyla hodnota  $IC_{50}$  EE2 určena, jelikož nebylo možné v reakční směsi dosáhnout dostatečně vysokých koncentrací EE2 k identifikaci spodní asymptoty inhibice. Ze získaných dat je nicméně zřejmé (obr. 5.5), že EE2 inhibuje potkaní CYP2B1 podstatně méně, než CYP2B6.



**Obrázek 5.5: Závislost relativní specifické aktivity CYP2B1 na logaritmu koncentrace EE2**

*Aktivita CYP2B1 byla stanovena selektivní reakcí hydroxylací bupropionu. (Hodnoty byly pro zvýraznění atypického průběhu inhibiční křivky proloženy lineární funkcí.)*

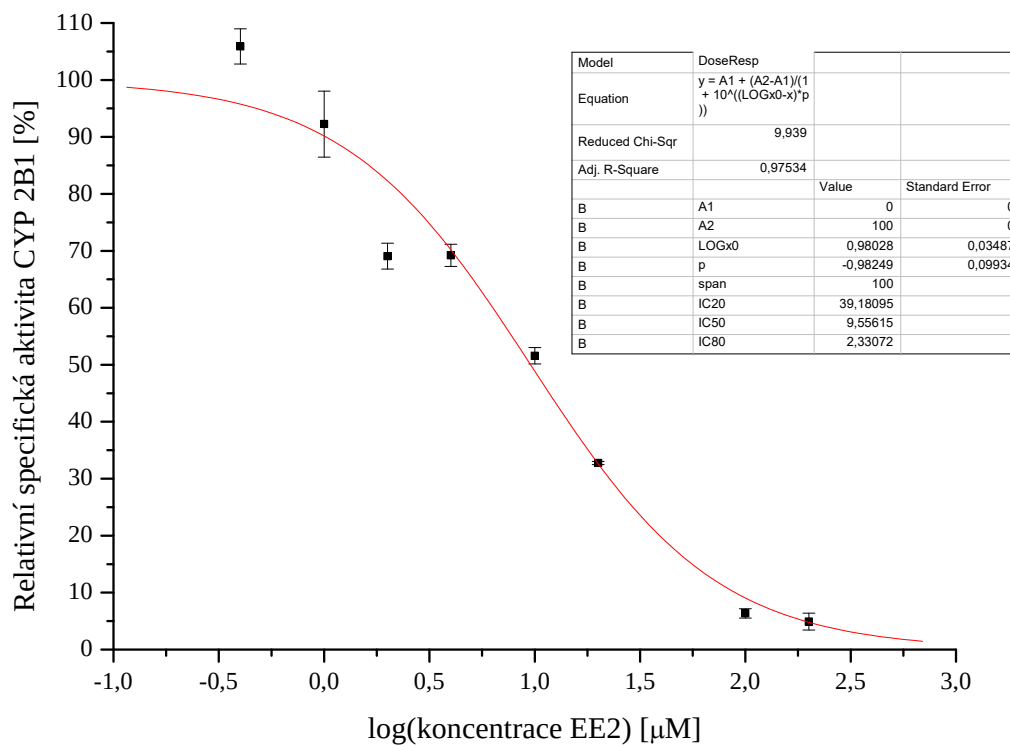
Inhibice CYP2B1 EE2 byla zkoumána také na markerové reakci *O*-depentylace 7-pentoxyresorufinu. Zde bylo díky výrazně nižší koncentraci substrátu ( $2 \mu$ M) možno použít inhibitor až ve stonásobné koncentraci. Naměřená fluorescence byla přepočtena na látkové množství vzniklého produktu za pomoci kalibrační křivky v rozmezí 0 až 160 pmol. Koncentrace proteinu 20 pmol/ml byla zvolena na základě měření s různými koncentracemi CYP2B1 (obr. 5.6, str. 45), tak aby reakce probíhala po celou dobu kinetikou 0. řádu, byla zajištěna dostatečná tvorba produktu k vyhodnocení a také minimalizována spotřeba proteinu.



**Obrázek 5.6: Závislost tvorby resorufinu na době inkubace a koncentraci CYP2B1**

Závislost byla zkoumána pro tři koncentrace CYP2B1 10, 20 a 40 pmol/ml.

V samotném inhibičním experimentu byl pozorován vliv EE2 v koncentracích v rozmezí od  $0,2x c_s$  až  $100x c_s$ , kde  $c_s$  značí koncentraci substrátu. A to konkrétně 0,4; 1; 2; 4; 10; 20; 100 a 200  $\mu\text{M}$ . Pozorovaná fluorescence byla s pomocí kalibrační křivky převedena na látkové množství produktu a to na specifickou aktivitu enzymu. Ta byla porovnána se specifickou aktivitou příslušných neinhibovaných enzymů a přepočtena na relativní specifickou aktivitu. V obr. 5.7 (str. 46) vidíme vynesenu závislost na logaritmu koncentrace EE2. Hodnota  $IC_{50}$  byla určena jako 9,6  $\mu\text{M}$  (při koncentraci enzymu 20 pmol/ml a koncentraci substrátu 2  $\mu\text{M}$ ).



**Obrázek 5.7: Závislost relativní specifické aktivity CYP2B1 na logaritmu koncentrace EE2**  
Aktivita CYP2B1 byla stanovena reakcí O-depetylací 7-pentoxyresorufinu.

### 5.3 Specifické aktivity neinhibovaných reakcí

Hodnoty specifické aktivity enzymů v reakčních směsích bez přítomnosti inhibitoru, které sloužili k určení relativní aktivity, jsou uvedeny v tab. 1.

**Tabulka 1: Hodnoty specifických aktivit použitých supersomálních enzymů CYP2B1, 2B6, 2C6 a 2C9 pro reakce O-depentylace pentoxyresorufinu, hydroxylace bupropionu a 4'-hydroxylace diklofenaku.**

Isoforma CYP	Specifická aktivita enzymu <sup>a</sup>
	$\frac{\text{pmol}_{\text{produktu}}}{\text{pmol}_{\text{enzymu}} \cdot \text{min}}$
2B1	0,24 ± 0,03 <sup>b</sup>
2B1	1,73 ± 0,01 <sup>c</sup>
2B6	14,64 ± 0,63 <sup>c</sup>
2C6	1,98 ± 0,18 <sup>d</sup>
2C9	22,09 ± 2,26 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Hodnoty odpovídají průměrům (± směrodatné odchylky) ze tří paralelních měření

<sup>b</sup> Pro reakci O-depentylace pentoxyresorufinu, <sup>c</sup> Pro reakci hydroxylace bupropionu

<sup>d</sup> Pro reakci 4'-hydroxylace diklofenaku

## 6. Diskuze

17 $\alpha$ -ethinylestradiol je významný endokrinní disruptor. I ve velmi nízkých koncentracích (ng/l) je schopen aktivovat estrogenní receptor ve vodních organismech a výrazně tak ovlivňovat jejich hormonální rovnováhu [161]. Vzhledem k jeho rozšíření v léčích a farmaceutických přípravcích užívaných k regulaci menstruačního cyklu, menopauzální hormonové terapii či léčbě osteoporózy je nutné, kromě monitorování jeho nežádoucího působení skrze primární mechanismus účinku - regulaci transkripce, sledovat také jeho potenciální úlohu v interakcích s jinými cizorodými látkami. Cytochromy P450 jsou s ohledem na jejich význam v I. fázi biotransformace xenobiotik nedílnou součástí těchto interakcí. Jakákoliv látka se schopností ovlivňovat jejich aktivitu či expresi v buňkách může modulovat farmakokinetické vlastnosti ostatních xenobiotik. K sledování těchto vlivů jsou často využívány zvířecí modely. Vyhodnocování získaných dat a analogické přenášení poznatků na lidský organismus je však kvůli mezidruhovým rozdílům značně komplikované. CYP2C9 je významnou lidskou isoformou, která tvoří zhruba 25 % jaterních CYP a podílí se na biotransformaci až 16 % dostupných léčiv [120, 121]. Se svým potkaním protějškem CYP2C6 sdílejí afinitu k některým typickým substrátům jako je s-warfarin či diklofenak. Oba dva se také účastní metabolismu EE2 [58, 59]. CYP2B6 je v lidských játrech zastoupen méně než CYP2C9 (v průměru okolo 2 %) [94], avšak díky své silné inducibilitě může jeho množství v játrech u některých jedinců činit až desítky procent všech hepatálních CYP a jeho vliv na farmakokinetiku některých léčiv tak může být značný [98]. Na rozdíl od potkaního orthologu CYP2B1 nebyla pozorována jeho přímá účast na metabolismu EE2 [58]. V reakcích s některými substráty však byla pozorována na mechanismus vázaná inhibice EE2, což nasvědčuje tomu, že se na jeho metabolismu do jisté míry také podílí [151].

Evaluace dvou potkaních enzymů cytochromů P450 2B1 a 2C6, jako modelových enzymů k jejich lidským orthologům CYP2B6 respektive 2C9 v rámci vlivu 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu, bylo předmětem této práce. Ta porovnává vliv EE2 na tyto isoformy CYP.

Pro lidské a potkaní isoformy z podrodiny 2C byla jako markerová reakce zvolena 4'-hydroxylace diklofenaku. Pro lidský CYP2C9 se hodnota  $IC_{50}$  pohybovala okolo 40  $\mu$ M. Tato hodnota se na první pohled výrazně liší od závěru studie vlivu EE2 na lidské isoformy



CYP Chang et al. [4], ve které byla hodnota  $IC_{50}$  pro hydroxylaci diklofenaku CYP2C9 stanovena jako  $13,0 \pm 3,2 \mu\text{M}$  (koncentrace proteinu 0,15 mg/ml, koncentrace substrátu 10  $\mu\text{M}$ ). Nicméně, zde je nutné si uvědomit, že v této studii byly k analýze vlivu EE2 na CYP2C9 použity pouze lidské hepatální mikrozomy, tudíž není možné koncentrace enzymu porovnávat. V obou porovnávaných pracích probíhala preinkubace bez jedné složky reakční směsi, aby se předešlo inaktivaci části enzymu vznikuvšími reaktivními meziprodukty EE2 před samotným zahájením reakce, což hodnotu  $IC_{50}$ , za předpokladu, že se jedná o na mechanismus vázanou inhibici, mění. Na aktivitu enzymu mohou mít také vliv rozdílné koncentrace organického rozpouštědla (DMSO) v reakčních směsích. Zatímco ve zmíněné studii dosahovaly maximální koncentrace DMSO v inkubační směsi 0,2 % (V/V), v našem případě se jednalo o 1 %. Z různých studií vyplývá, že DMSO se může chovat jako inhibitor některých CYP [105, 162, 163]. Tento vliv je však velmi vázaný na používaný substrát a koncentraci rozpouštědla. Při velmi nízkých koncentracích DMSO (okolo 0,1 %) byla v některých pokusech pozorována dokonce mírně zvýšená aktivita hydroxylace tolbutamidu CYP2C9 [163], ačkoliv se jednalo pouze o část vzorků. Při zohlednění všech výše uvedených faktorů ovlivňujících aktivitu enzymu či afinitu enzymu k substrátu můžeme tvrdit, že výsledky mé práce jsou v souladu s daty studie Chang et al. [4].

Pro CYP2C6 bohužel nebylo možné hodnotu  $IC_{50}$  EE2 ze získaných dat určit. Je z nich však patrné, že se bude pohybovat v řádu jednotek  $\mu\text{M}$  a tedy že jeho inhibice EE2 je podstatně vyšší než u CYP2C9. Toto tvrzení dokládá také fakt, že už při 25  $\mu\text{M}$  koncentraci EE2 odpovídající poloviční koncentraci substrátu je relativní specifická aktivita CYP2C6 pouhá dvě procenta oproti 63 % u CYP2C9 při totožné koncentraci inhibitoru (obr. 5.3, str. 42). Relativní specifická aktivita u inkubační směsi s koncentrací inhibitoru 0,5  $\mu\text{M}$ , jejíž průměr činil přes 150 % kontrolní specifické aktivity vzorku s DMSO (1 % V/V), byla pravděpodobně zapříčiněna nízkou koncentrací DMSO ve směsi (0,1 %). Ta vznikla nedopatřením použitím nesprávného roztoku EE2. Tato vysoká aktivita naznačuje, že by DMSO v nízkých koncentracích (okolo desetin % V/V) mohlo zvyšovat aktivitu CYP2C6. To může být zapříčiněno zvýšením stability proteinu nebo stabilizací substrátu v aktivním místě enzymu ovlivněním jeho polarizace [164, 165]. Vzhledem k rozdílným specifickým aktivitám CYP2C6 a 2C9 hydroxylace diklofenaku (tab. 1, str. 47) a také poměrně výraznému rozdílu

v hodnotách  $IC_{50}$  lze vyvozovat, že pro studium inhibičního vlivu EE2 na hydroxylaci diklofenaku CYP2C9 není CYP2C6 vhodným modelovým enzymem. Pro odlišné substráty, ke kterým vykazují tyto enzymy podobnější afinitu, toto však platit nemusí.

Vliv EE2 na aktivitu CYP2B6 byl zkoumán na reakci hydroxylace bupropionu. Hodnota  $IC_{50}$  EE2 byla stanovena jako  $60 \mu\text{M}$ . Tato hodnota se v zásadě shoduje se závěry studií Chang et al. a Walsky et al., zkoumajícími vliv EE2 na hydroxylaci bupropionu katalyzovanou CYP2B6 [4, 155]. Jimi stanovené hodnoty  $IC_{50}$  činily  $41 \mu\text{M}$  (bez preinkubace s NADPH při koncentraci enzymu  $5 \text{ pmol/ml}$  a koncentraci substrátu  $80 \mu\text{M}$ ) respektive  $17,6 \mu\text{M}$  (při koncentraci enzymu  $1,8 \text{ pmol/ml}$  a koncentraci substrátu  $82 \mu\text{M}$  [4]. Rozdíl v hodnotách je pravděpodobně zapříčiněn rozdílnými reakčními podmínkami. V mé práci byla inhibice stanovována při saturační koncentraci substrátu, zatímco ve zmíněných studiích při koncentracích substrátu blízkých hodnotě Michaelisovy konstanty.

Z obdobné analýzy inhibičního vlivu EE2 na potkaní isoformu 2B1 nebylo možné  $IC_{50}$  určit (obr. 5.5, str. 44). Její hodnota se pravděpodobně pohybuje v řádu stovek  $\mu\text{mol/l}$ , což jsou koncentrace, které vzhledem k tomu, že maximální koncentrace EE2 v krevní plasmě při denním podávání hormonální antikoncepce jsou v řádu stovek  $\text{nmol/l}$ , nejsou biologicky relevantní [166]. Toto zjištění je v souladu s již zmíněnými informacemi (viz podkapitola 2.4.2, str. 29) o rozdílné regioselektivitě při přeměně EE2 CYP2B1 a 2B6 [151]. Ta ukazuje, že pravděpodobnost vzniku reaktivního intermediátu EE2, schopného vázat se na enzym a tím ho inaktivovat, je u katalýzy CYP2B1 výrazně nižší. Při porovnání specifických aktivit obou enzymů za obdobných reakčních podmínek bez přítomnosti inhibitoru (tab. 1, str. 47) je také vidět, že specifická aktivita CYP2B6 pro hydroxylaci bupropionu je zhruba osmkrát vyšší než u CYP2B1, což by za předpokladu na mechanismus vázané inhibice, která je také časově závislá, mohlo vysvětlovat rozdíl v citlivosti na EE2. Z těchto informací je zřejmé, že potkaní ortholog lidské isoformy 2B6 není příliš vhodný pro studium vlivu EE2 na lidský organismus.

Pro jinou selektivní *in vitro* reakci, O-depentylation 7-pentoxyresorufinu, byla námi stanovena  $IC_{50}$  EE2 pro CYP2B1 rovna  $9,6 \mu\text{M}$ . Pro lidskou isoformu CYP2B6 a tuto reakci hodnota  $IC_{50}$  stanovena nebyla, z důvodu nereprodukovatelných výsledků (neuvedené) způsobených pravděpodobně nízkou stabilitou rekombinantního enzymu v reakčních podmínkách. Hodnoty k porovnání nebylo ani možné dohledat v dosažitelných zdrojích. S při-

hlédnutím k našim zjištěním a dostupným informacím, lze však předpokládat, že katalýza této reakce lidskou isoformou 2B6 bude na inhibici EE2 výrazně citlivější.

## 7. Závěr

V této bakalářské práci byl zkoumán vliv  $17\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu lidských a potkaních cytochromů P450 2B6, 2B1 a 2C9, 2C6.

- U všech zkoumaných isoform byla potvrzena předpokládaná inhibiční vliv  $17\alpha$ -ethinylestradiolu na jejich aktivitu.
- Pro reakci hydroxylace diklofenaku katalyzovanou CYP2C9 byla určena hodnota  $IC_{50} \approx 40 \mu\text{M}$ . Potkaní isoforma CYP2C6 byla EE2 oproti lidské inhibována výrazněji.
- Pro reakci hydroxylace bupropionu katalyzovanou CYP2B6 byla určena hodnota  $IC_{50} = 60 \mu\text{M}$ . Potkaní isoforma CYP2B1 byla oproti lidské inhibována méně.
- Pro reakci *O*-depentylace 7-pentoxyresorufinu katalyzovanou CYP2B1 byla určena hodnota  $IC_{50} = 9,6 \mu\text{M}$ .

## Seznam použité literatury

1. FROBENIUS, W. "The rabbits are prepared..."-The Development of Ethinylestradiol and Ethinyltestosterone. *Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology*. 2011, roč. 8, s. 32–57.
2. HANNAH, R.; D'ACO, V. J.; ANDERSON, P. D.; BUZBY, M. E.; CALDWELL, D. J.; CUNNINGHAM, V. L.; ERICSON, J. F.; JOHNSON, A. C.; PARKE, N. J.; SAMUELIAN, J. H.; SUMPTER, J. P. Exposure Assessment of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol in Surface Waters of the United States and Europe. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2009, roč. 28, č. 12, s. 2725–2732. ISSN 1552-8618.
3. JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C. R.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J. P. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental science & technology*. 1998, roč. 32, č. 17, s. 2498–2506.
4. CHANG, S.-Y.; CHEN, C.; YANG, Z.; RODRIGUES, A. D. Further Assessment of 17alpha-Ethinyl Estradiol as an Inhibitor of Different Human Cytochrome P450 Forms in Vitro. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 2009, roč. 37, č. 8, s. 1667–1675. ISSN 1521-009X.
5. JÄGER, W.; CORREIA, M. A.; BORNHEIM, L. M.; MAHNKE, A.; HANSTEIN, W. G.; XUE, L.; BENET, L. Z. Ethinylestradiol-Mediated Induction of Hepatic CYP3A9 in Female Rats: Implication for Cyclosporine Metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*. 1999, roč. 27, č. 12, s. 1505–1511. ISSN 0090-9556.
6. KAVLOCK, R. J. et al. Research Needs for the Risk Assessment of Health and Environmental Effects of Endocrine Disruptors: A Report of the U.S. EPA-Sponsored Workshop. *Environmental Health Perspectives*. 1996, roč. 104 Suppl 4, s. 715–740. ISSN 0091-6765.
7. COLBORN, T.; CLEMENT, C. Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection. *Advances in modern environmental toxicology (USA)*. 1992. ISBN 09-111-31353.

8. SHARPE, R. M.; SKAKKEBAEK, N. E. Are Oestrogens Involved in Falling Sperm Counts and Disorders of the Male Reproductive Tract? *The Lancet*. 1993, roč. 341, č. 8857, s. 1392–1396. ISSN 0140-6736.
9. KAJTA, M.; WÓJTOWICZ, A. K. Impact of Endocrine-Disrupting Chemicals on Neural Development and the Onset of Neurological Disorders. *Pharmacological Reports*. 2013, roč. 65, č. 6, s. 1632–1639. ISSN 1734-1140.
10. ROGERS, J. A.; METZ, L.; YONG, V. W. Review: Endocrine Disrupting Chemicals and Immune Responses: A Focus on Bisphenol-A and Its Potential Mechanisms. *Molecular Immunology*. 2013, roč. 53, č. 4, s. 421–430. ISSN 0161-5890.
11. HILSCHEROVA, K.; MACHALA, M.; KANNAN, K.; BLANKENSHIP, A. L.; GIESY, J. P. Cell Bioassays for Detection of Aryl Hydrocarbon (AhR) and Estrogen Receptor (ER) Mediated Activity in Environmental Samples. *Environmental Science and Pollution Research*. 2000, roč. 7, č. 3, s. 159–171. ISSN 1614-7499.
12. GAIDO, K. W.; LEONARD, L. S.; LOVELL, S.; GOULD, J. C.; BABAI, D.; PORTIER, C. J.; MCDONNELL, D. P. Evaluation of Chemicals with Endocrine Modulating Activity in a Yeast-Based Steroid Hormone Receptor Gene Transcription Assay. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997, roč. 143, č. 1, s. 205–212. ISSN 0041-008X.
13. KUIPER, G. G. J. M.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; van der SAAG, P. T.; van der BURG, B.; GUSTAFSSON, J.-Å. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor  $\beta$ . *Endocrinology*. 1998, roč. 139, č. 10, s. 4252–4263. ISSN 0013-7227.
14. NIMROD, A. C.; BENSON, W. H. Xenobiotic Interaction with and Alteration of Channel Catfish Estrogen Receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997, roč. 147, č. 2, s. 381–390. ISSN 0041-008X.
15. ROUTLEDGE, E. J.; PARKER, J.; ODUM, J.; ASHBY, J.; SUMPTER, J. P. Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1998, roč. 153, č. 1, s. 12–19. ISSN 0041-008X.

16. PETIT, F.; LE GOFF, P.; CRAVÉDI, J. P.; VALOTAIRE, Y.; PAKDEL, F. Two Complementary Bioassays for Screening the Estrogenic Potency of Xenobiotics: Recombinant Yeast for Trout Estrogen Receptor and Trout Hepatocyte Cultures. *Journal of Molecular Endocrinology*. 1997, roč. 19, č. 3, s. 321–335. ISSN 0952-5041.
17. KLOTZ, D. M.; BECKMAN, B. S.; HILL, S. M.; MCLACHLAN, J. A.; WALTERS, M. R.; ARNOLD, S. F. Identification of Environmental Chemicals with Estrogenic Activity Using a Combination of in Vitro Assays. *Environmental Health Perspectives*. 1996, roč. 104, č. 10, s. 1084–1089. ISSN 0091-6765.
18. THONGPRAKAI SANG, S.; THIAN TANAWAT, A.; RANGKADILOK, N.; SURYO, T.; SATAYAVIVAD, J. Glyphosate Induces Human Breast Cancer Cells Growth via Estrogen Receptors. *Food and Chemical Toxicology*. 2013, roč. 59, s. 129–136. ISSN 0278-6915.
19. SOTO, A. M.; CHUNG, K. L.; SONNENSCH EIN, C. The Pesticides Endosulfan, Toxaphene, and Dieldrin Have Estrogenic Effects on Human Estrogen-Sensitive Cells. *Environmental Health Perspectives*. 1994, roč. 102, č. 4, s. 380–383. ISSN 0091-6765.
20. JOBLING, S.; REYNOLDS, T.; WHITE, R.; PARKER, M. G.; SUMPTER, J. P. A Variety of Environmentally Persistent Chemicals, Including Some Phthalate Plasticizers, Are Weakly Estrogenic. *Environmental Health Perspectives*. 1995, roč. 103, č. 6, s. 582–587. ISSN 0091-6765.
21. FIELDEN, M. R.; CHEN, I.; CHITTIM, B.; SAFE, S. H.; ZACHAREWSKI, T. R. Examination of the Estrogenicity of 2,4,6,2',6'-Pentachlorobiphenyl (PCB 104), Its Hydroxylated Metabolite 2,4,6,2',6'-Pentachloro-4-Biphenylol (HO-PCB 104), and a Further Chlorinated Derivative, 2,4,6,2',4',6'-Hexachlorobiphenyl (PCB 155). *Environmental Health Perspectives*. 1997, roč. 105, č. 11, s. 1238–1248. ISSN 0091-6765.
22. TRAN, D. Q.; IDE, C. F.; MCLACHLAN, J. A.; ARNOLD, S. F. The Anti-Estrogenic Activity of Selected Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Yeast Expressing Human Estrogen Receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996, roč. 229, č. 1, s. 102–108. ISSN 0006-291X.

23. HANSELMAN, T. A.; GRAETZ, D. A.; WILKIE, A. C. Manure-Borne Estrogens as Potential Environmental Contaminants: A Review. *Environmental Science & Technology*. 2003, roč. 37, č. 24, s. 5471–5478. ISSN 0013-936X.
24. YING, G.-G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y.-J. Occurrence and Fate of Hormone Steroids in the Environment. *Environment International*. 2002, roč. 28, č. 6, s. 545–551. ISSN 0160-4120.
25. BARKHEM, T.; CARLSSON, B.; NILSSON, Y.; ENMARK, E.; GUSTAFSSON, J.; NILSSON, S. Differential Response of Estrogen Receptor  $\alpha$  and Estrogen Receptor  $\beta$  to Partial Estrogen Agonists / Antagonists. In: 1998.
26. KUCH, H. M.; BALLSCHMITER, K. Determination of Endocrine-Disrupting Phenolic Compounds and Estrogens in Surface and Drinking Water by HRGC-(NCI)-MS in the Picogram per Liter Range. *Environmental Science & Technology*. 2001, roč. 35, č. 15, s. 3201–3206. ISSN 0013-936X.
27. FAN, Z.; HU, J.; AN, W.; YANG, M. Detection and Occurrence of Chlorinated By-products of Bisphenol A, Nonylphenol, and Estrogens in Drinking Water of China: Comparison to the Parent Compounds. *Environmental Science & Technology*. 2013, roč. 47, č. 19, s. 10841–10850. ISSN 0013-936X.
28. WENZEL, A.; MÜLLER; TERNES, T. *Study on endocrine disrupters in drinking water: Final report* [online]. Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, 2003 [cit. 2020-03-16] Dostupné z URL: [https://www.researchgate.net/profile/Andrea\\_Wenzel/publication/229005028\\_Study\\_on\\_endocrine\\_disrupters\\_in\\_drinking\\_water/links/02e7e525d25243aef70000-00.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Andrea_Wenzel/publication/229005028_Study_on_endocrine_disrupters_in_drinking_water/links/02e7e525d25243aef70000-00.pdf).
29. GEE, R. H.; ROCKETT, L. S.; RUMSBY, P. C. Chapter 18 - Considerations of Endocrine Disrupters in Drinking Water. In: DARBRE, P. D. (ed.). *Endocrine Disruption and Human Health*. Boston: Academic Press, 2015, s. 319–341. ISBN 978-0-12-801139-3.



30. BENOTTI, M. J.; TRENHOLM, R. A.; VANDERFORD, B. J.; HOLADY, J. C.; STANFORD, B. D.; SNYDER, S. A. Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Compounds in U.S. Drinking Water. *Environmental Science & Technology*. 2009, roč. 43, č. 3, s. 597–603. ISSN 0013-936X.
31. STASIKANIS, A. S.; GATIDOU, G. *Micropollutants and Aquatic Environment* [online]. 2016 [cit. 2020-03-17] Dostupné z URL: [https://www.researchgate.net/publication/284970433\\_Micropollutants\\_and\\_aquatic\\_environment](https://www.researchgate.net/publication/284970433_Micropollutants_and_aquatic_environment).
32. INHOFFEN, H. H.; HOHLWEG, W. Neue per os-wirksame weibliche Keimdrüsenhormon-Derivate: 17-Aethinyl-oestradiol und Pregnen-in-on-3-ol-17. *Naturwissenschaften*. 1938, roč. 26, č. 6, s. 96–96. ISSN 1432-1904.
33. JOHNSON, A. C.; DUMONT, E.; WILLIAMS, R. J.; OLDENKAMP, R.; CISOWSKA, I.; SUMPTER, J. P. Do Concentrations of Ethinylestradiol, Estradiol, and Diclofenac in European Rivers Exceed Proposed EU Environmental Quality Standards? *Environmental Science & Technology*. 2013, roč. 47, č. 21, s. 12297–12304. ISSN 0013-936X.
34. NILSSON, S.; MÄKELÄ, S.; TREUTER, E.; TUJAGUE, M.; THOMSEN, J.; ANDERSSON, G.; ENMARK, E.; PETTERSSON, K.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. A. Mechanisms of Estrogen Action. *Physiological Reviews*. 2001, roč. 81, č. 4, s. 1535–1565. ISSN 0031-9333.
35. PEDRAM, A.; RAZANDI, M.; LEVIN, E. R. Nature of Functional Estrogen Receptors at the Plasma Membrane. *Molecular Endocrinology*. 2006, roč. 20, č. 9, s. 1996–2009. ISSN 0888-8809.
36. MANDUSIC, V.; RADAK, D.; MARKICEVIC, M.; PEROVIC, M.; OBRADOVIC, M.; MIKHAILIDIS, D. P.; ISENOVIC, E. R. Role of Estrogen and Estrogen Receptors in Cancer Pathology. *Endocrinology Studies*. 2011, roč. 1, č. 1, s. e5–e5. ISSN 2038-9523.

37. BRZOZOWSKI, A. M.; PIKE, A. C. W.; DAUTER, Z.; HUBBARD, R. E.; BONN, T.; ENGSTRÖM, O.; ÖHMAN, L.; GREENE, G. L.; GUSTAFSSON, J.-Å.; CARLQUIST, M. Molecular Basis of Agonism and Antagonism in the Oestrogen Receptor. *Nature*. 1997, roč. 389, č. 6652, s. 753–758. ISSN 1476-4687.
38. ANSTEAD, G. M.; CARLSON, K. E.; KATZENELLENBOGEN, J. A. The Estradiol Pharmacophore: Ligand Structure-Estrogen Receptor Binding Affinity Relationships and a Model for the Receptor Binding Site. *Steroids*. 1997, roč. 62, č. 3, s. 268–303. ISSN 0039-128X.
39. *Wikipedia*. Nuclear Receptor [online]. 2020 [cit. 2020-03-29] Dostupné z URL: [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Nuclear\\_receptor&oldid=939008760#/media/File:Nuclear\\_Receptor\\_Structure.png](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Nuclear_receptor&oldid=939008760#/media/File:Nuclear_Receptor_Structure.png).
40. WALTER, P.; GREEN, S.; GREENE, G.; KRUST, A.; BORNERT, J. M.; JELTSCH, J. M.; STAUB, A.; JENSEN, E.; SCRACE, G.; WATERFIELD, M. Cloning of the Human Estrogen Receptor CDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985, roč. 82, č. 23, s. 7889–7893. ISSN 0027-8424.
41. ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; GRANDIEN, K.; LAGERCRANTZ, S.; LAGERCRANTZ, J.; FRIED, G.; NORDENSKJÖLD, M.; GUSTAFSSON, J. A. Human Estrogen Receptor Beta-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997, roč. 82, č. 12, s. 4258–4265. ISSN 0021-972X.
42. MOSSELMAN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R. ER $\beta$ : Identification and Characterization of a Novel Human Estrogen Receptor. *FEBS Letters*. 1996, roč. 392, č. 1, s. 49–53. ISSN 0014-5793.
43. KUIPER, G. G. J. M.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HÄGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.-Å. Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology*. 1997, roč. 138, č. 3, s. 863–870. ISSN 0013-7227.

44. LEES, J. A.; FAWELL, S. E.; WHITE, R.; PARKER, M. G. A 22-Amino-Acid Peptide Restores DNA-Binding Activity to Dimerization-Defective Mutants of the Estrogen Receptor. *Molecular and Cellular Biology*. 1990, roč. 10, č. 10, s. 5529–5531. ISSN 0270-7306.
45. COWLEY, S. M.; HOARE, S.; MOSSELMAN, S.; PARKER, M. G. Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  Form Heterodimers on DNA. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, roč. 272, č. 32, s. 19858–19862. ISSN 0021-9258.
46. ROGERS, S. M.; BACK, D. J.; ORME, M. L. Intestinal Metabolism of Ethinylestradiol and Paracetamol in Vitro: Studies Using Ussing Chambers. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1987, roč. 23, č. 6, s. 727–734. ISSN 0306-5251.
47. ZHANG, H.; CUI, D.; WANG, B.; HAN, Y.-H.; BALIMANE, P.; YANG, Z.; SINZ, M.; RODRIGUES, A. D. Pharmacokinetic Drug Interactions Involving  $17\alpha$ -Ethinylestradiol. *Clinical Pharmacokinetics*. 2007, roč. 46, č. 2, s. 133–157. ISSN 1179-1926.
48. MAGGS, J. L.; PARK, B. K. A Comparative Study of Biliary and Urinary 2-Hydroxylated Metabolites of [6,7- $^3\text{H}$ ] $17\alpha$ -Ethinylestradiol in Women. *Contraception*. 1985, roč. 32, č. 2, s. 173–182. ISSN 0010-7824, 1879-0518. ISSN 0010-7824, 1879-0518.
49. HELTON, E. D.; WILLIAMS, M. C.; GOLDZIEHER, J. W. Human Urinary and Liver Conjugates of  $17\alpha$ -Ethinylestradiol. *Steroids*. 1976, roč. 27, č. 6, s. 851–867. ISSN 0039-128X.
50. BACK, D. J.; BATES, M.; BRECKENRIDGE, A. M.; ELLIS, A.; HALL, J. M.; MACIVER, M.; ORME, M. L.; ROWE, P. H. The in Vitro Metabolism of Ethinylestradiol, Mestranol and Levonorgestrel by Human Jejunal Mucosa. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1981, roč. 11, č. 3, s. 275–278. ISSN 1365-2125.
51. BACK, D. J.; BRECKENRIDGE, A. M.; CRAWFORD, F. E.; MACIVER, M.; ORME, M. L.; ROWE, P. H.; WATTS, M. J. An Investigation of the Pharmacokinetics of Ethinylestradiol in Women Using Radioimmunoassay. *Contraception*. 1979, roč. 20, č. 3, s. 263–273. ISSN 0010-7824.

52. SCHRAG, M. L.; CUI, D.; RUSHMORE, T. H.; SHOU, M.; MA, B.; RODRIGUES, A. D. Sulfotransferase 1e1 Is a Low Km Isoform Mediating the 3-O-Sulfation of Ethinyl Estradiol. *Drug Metabolism and Disposition*. 2004, roč. 32, č. 11, s. 1299–1303. ISSN 0090-9556.
53. EBNER, T.; REMMEL, R. P.; BURCHELL, B. Human Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase Catalyzes the Glucuronidation of Ethinylestradiol. *Molecular Pharmacology*. 1993, roč. 43, č. 4, s. 649–654. ISSN 0026-895X.
54. GUENGERICH, F. P. Metabolism of 17 Alpha-Ethinylestradiol in Humans. *Life Sciences*. 1990, roč. 47, č. 22, s. 1981–1988. ISSN 0024-3205.
55. SCHMID, S. E.; AU, W. Y.; HILL, D. E.; KADLUBAR, F. F.; SLIKKER, W. Cytochrome P-450-Dependent Oxidation of the 17 Alpha-Ethynyl Group of Synthetic Steroids. D-Homoannulation or Enzyme Inactivation. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 1983, roč. 11, č. 6, s. 531–536. ISSN 0090-9556.
56. HELTON, E. D.; GOLDZIEHER, J. W. Metabolism of Ethynyl Estrogens. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1977, roč. 3, č. 1-2, s. 231–241. ISSN 0098-4108.
57. BOLT, H. M. Metabolism of Estrogens—Natural and Synthetic. *Pharmacology & Therapeutics*. 1979, roč. 4, č. 1, s. 155–181. ISSN 0163-7258.
58. WANG, B.; SANCHEZ, R. I.; FRANKLIN, R. B.; EVANS, D. C.; HUSKEY, S.-E. W. The Involvement of CYP3A4 and CYP2C9 in the Metabolism of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Drug Metabolism and Disposition*. 2004, roč. 32, č. 11, s. 1209–1212. ISSN 0090-9556.
59. BOŘEK-DOHALSKÁ, L.; VALÁŠKOVÁ, P.; ČERNÁ, V.; STIBOROVÁ, M. Role of Rat Cytochromes P450 in the Oxidation of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2014, roč. 38, č. 3, s. 852–860. ISSN 1382-6689.

60. KENT, U. M.; LIN, H.-L.; MILLS, D. E.; REGAL, K. A.; HOLLENBERG, P. F. Identification of 17-Alpha-Ethynylestradiol-Modified Active Site Peptides and Glutathione Conjugates Formed during Metabolism and Inactivation of P450s 2B1 and 2B6. *Chemical Research in Toxicology*. 2006, roč. 19, č. 2, s. 279–287. ISSN 0893-228X.
61. MANIKANDAN, P.; NAGINI, S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Current Drug Targets*. 2018, roč. 19, č. 1, s. 38–54. ISSN 1873-5592.
62. DE MONTELLANO, P. R. O. *Cytochrome P-450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Cham: Springer, 2015. ISBN 978-3-319-12107-9. OCLC: 915681866.
63. ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. Substrate Oxidation by Cytochrome P450 Enzymes. In: ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. (ed.). *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Cham: Springer International Publishing, 2015, s. 111–176. ISBN 978-3-319-12108-6.
64. MONTELLANO, P. R. O. de (ed.). *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. 4. vyd. Springer International Publishing, 2015. ISBN 978-3-319-12107-9.
65. STIBOROVÁ, M.; HUDEČEK, J.; PETR HODEK; EVA FREI. Význam Cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy*. 1999, roč. 93, č. 93, s. 229–237.
66. NEBERT, D. W.; RUSSELL, D. W. Clinical Importance of the Cytochromes P450. *The Lancet*. 2002, roč. 360, č. 9340, s. 1155–1162. ISSN 0140-6736.
67. DENISOV, I. G.; SLIGAR, S. G. Activation of Molecular Oxygen in Cytochromes P450. In: ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. (ed.). *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Cham: Springer International Publishing, 2015, s. 69–109. ISBN 978-3-319-12108-6.
68. NEBERT, D. W.; ADESNIK, M.; COON, M. J.; ESTABROOK, R. W.; GONZALEZ, F. J.; GUENGERICH, F. P.; GUNSALUS, I. C.; JOHNSON, E. F.; KEMPER, B.; LEVIN, W.; PHILLIPS, I. R.; SATO, R.; WATERMAN, M. R. The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature. *DNA*. 1987, roč. 6, č. 1, s. 1–11. ISSN 0198-0238.

69. POULOS, T. L.; JOHNSON, E. F. Structures of Cytochrome P450 Enzymes. In: ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. (ed.). *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Cham: Springer International Publishing, 2015, s. 3–32. ISBN 978-3-319-12108-6.
70. SCHLICHTING, I.; BERENDZEN, J.; CHU, K.; STOCK, A. M.; MAVES, S. A.; BENSON, D. E.; SWEET, R. M.; RINGE, D.; PETSKO, G. A.; SLIGAR, S. G. The Catalytic Pathway of Cytochrome P450cam at Atomic Resolution. *Science*. 2000, roč. 287, č. 5458, s. 1615–1622. ISSN 0036-8075.
71. VIDA KOVIC, M.; SLIGAR, S. G.; LI, H.; POULOS, T. L. Understanding the Role of the Essential Asp251 in Cytochrome P450cam Using Site-Directed Mutagenesis, Crystallography, and Kinetic Solvent Isotope Effect. *Biochemistry*. 1998, roč. 37, č. 26, s. 9211–9219. ISSN 0006-2960.
72. COSME, J.; JOHNSON, E. F. Engineering Microsomal Cytochrome P450 2C5 to Be a Soluble, Monomeric Enzyme Mutations that Alter Aggregation, Phospholipid Dependence of Catalysis, and Membrane Binding. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, roč. 275, č. 4, s. 2545–2553. ISSN 0021-9258.
73. JOHNSON, E. F.; STOUT, C. D. Structural Diversity of Eukaryotic Membrane Cytochrome P450s. *Journal of Biological Chemistry*. 2013, roč. 288, č. 24, s. 17082–17090. ISSN 0021-9258.
74. OMURA, T.; SATO, R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes I. EVIDENCE FOR ITS HEMOPROTEIN NATURE. *Journal of Biological Chemistry*. 1964, roč. 239, č. 7, s. 2370–2378. ISSN 0021-9258.
75. HEERES, J.; BACKX, L. J. J.; MOSTMANS, J. H.; VAN CUTSEM, J. Antimycotic Imidazoles. Part 4. Synthesis and Antifungal Activity of Ketoconazole, a New Potent Orally Active Broad-Spectrum Antifungal Agent. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1979, roč. 22, č. 8, s. 1003–1005. ISSN 0022-2623.
76. TRACHTENBERG, J.; HALPERN, N.; PONT, A. Ketoconazole: A Novel and Rapid Treatment for Advanced Prostatic Cancer. *The Journal of Urology*. 1983, roč. 130, č. 1, s. 152–153. ISSN 0022-5347.

77. CORREIA, M. A.; HOLLENBERG, P. F. Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes. In: ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. (ed.). *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Cham: Springer International Publishing, 2015, s. 177–259. ISBN 978-3-319-12108-6.
78. YASUDA, K.; IKUSHIRO, S.; KAMAKURA, M.; OHTA, M.; SAKAKI, T. Metabolism of Sesamin by Cytochrome P450 in Human Liver Microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010, roč. 38, č. 12, s. 2117–2123. ISSN 0090-9556.
79. HEYDARI, A.; YEO, K. R.; LENNARD, M. S.; ELLIS, S. W.; TUCKER, G. T.; ROSTAMI-HODJEGAN, A. Mechanism-Based Inactivation of Cyp2d6 by Methylenedioxymethamphetamine. *Drug Metabolism and Disposition*. 2004, roč. 32, č. 11, s. 1213–1217. ISSN 0090-9556.
80. TINEL, M.; DESCATOIRE, V.; LARREY, D.; LOEPER, J.; LABBE, G.; LETTERON, P.; PESSAYRE, D. Effects of Clarithromycin on Cytochrome P-450. Comparison with Other Macrolides. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1989, roč. 250, č. 2, s. 746–751. ISSN 0022-3565, 1521-0103. ISSN 0022-3565, 1521-0103.
81. ORTIZ DE MONTELLANO, P. R.; KUNZE, K. L.; BEILAN, H. S.; WHEELER, C. Destruction of Cytochrome P-450 by Vinyl Fluoride, Fluroxene, and Acetylene. Evidence for a Radical Intermediate in Olefin Oxidation. *Biochemistry*. 1982, roč. 21, č. 6, s. 1331–1339. ISSN 0006-2960.
82. MONTELLANO, P. R. O. de; MANGOLD, B. L.; WHEELER, C.; KUNZE, K. L.; REICH, N. O. Stereochemistry of Cytochrome P-450-Catalyzed Epoxidation and Prosthetic Heme Alkylation. *Journal of Biological Chemistry*. 1983, roč. 258, č. 7, s. 4208–4213. ISSN 0021-9258.
83. MUAKKASSAH, S. F.; YANG, W. C. Mechanism of the Inhibitory Action of Phenelzine on Microsomal Drug Metabolism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1981, roč. 219, č. 1, s. 147–155. ISSN 0022-3565.

84. HE, K.; WOOLF, T. F.; HOLLENBERG, P. F. Mechanism-Based Inactivation of Cytochrome P-450-3A4 by Mifepristone (RU486). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1999, roč. 288, č. 2, s. 791–797. ISSN 0022-3565.
85. CHAN, W. K.; SUI, Z.; ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. Determinants of Protein Modification versus Heme Alkylation: Inactivation of Cytochrome P450 1A1 by 1-Ethynylpyrene and Phenylacetylene. *Chemical Research in Toxicology*. 1993, roč. 6, č. 1, s. 38–45. ISSN 0893-228X.
86. HE, K.; HE, Y. A.; SZKLARZ, G. D.; HALPERT, J. R.; CORREIA, M. A. Secobarbital-Mediated Inactivation of Cytochrome P450 2B1 and Its Active Site Mutants Partitioning Between Heme and Protein Alkylation and Epoxidation. *Journal of Biological Chemistry*. 1996, roč. 271, č. 42, s. 25864–25872. ISSN 0021-9258.
87. CORREIA, M. A.; MONTELLANO, P. R. O. de. Inhibition of cytochrome P450 enzymes. In: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*. Springer, 2005, s. 247–322.
88. *Scientists Compare Rat Genome With Human, Mouse* [online] [cit. 2020-05-31] Dostupné z URL:<https://www.genome.gov/11511308/2004-release-scientists-compare-rat-genome>.
89. MIMURA, M.; BABA, T.; YAMAZAKI, H.; OHMORI, S.; INUI, Y.; GONZALEZ, F. J.; GUENGERICH, F. P.; SHIMADA, T. Characterization of Cytochrome P-450 2B6 in Human Liver Microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*. 1993, roč. 21, č. 6, s. 1048–1056. ISSN 0090-9556.
90. HUKKANEN, J.; PELKONEN, O.; HAKKOLA, J.; RAUNIO, H. Expression and Regulation of Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450 (CYP) Enzymes in Human Lung. *Critical Reviews in Toxicology*. 2002, roč. 32, č. 5, s. 391–411. ISSN 1040-8444.
91. YANG, T. J.; KRAUSZ, K. W.; SHOU, M.; YANG, S. K.; BUTERS, J. T. M.; GONZALEZ, F. J.; GELBOIN, H. V. Inhibitory Monoclonal Antibody to Human Cytochrome P450 2B6. *Biochemical Pharmacology*. 1998, roč. 55, č. 10, s. 1633–1640. ISSN 0006-2952.



92. STRESSER, D. M.; KUPFER, D. Monospecific Antipeptide Antibody to Cytochrome P-450 2B6. *Drug Metabolism and Disposition*. 1999, roč. 27, č. 4, s. 517–525. ISSN 0090-9556.
93. HANNA, I. H.; REED, J. R.; GUENGERICH, F. P.; HOLLENBERG, P. F. Expression of Human Cytochrome P450 2B6 in Escherichia Coli: Characterization of Catalytic Activity and Expression Levels in Human Liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000, roč. 376, č. 1, s. 206–216. ISSN 0003-9861.
94. KAWAKAMI, H.; OHTSUKI, S.; KAMIIE, J.; SUZUKI, T.; ABE, T.; TERASAKI, T. Simultaneous Absolute Quantification of 11 Cytochrome P450 Isoforms in Human Liver Microsomes by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry with In Silico Target Peptide Selection. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011, roč. 100, č. 1, s. 341–352. ISSN 0022-3549.
95. DROCOURT, L.; PASCUSI, J. M.; ASSEMAT, E.; FABRE, J. M.; MAUREL, P.; VILAREM, M. J. Calcium Channel Modulators of the Dihydropyridine Family Are Human Pregnane X Receptor Activators and Inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in Human Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 2001, roč. 29, č. 10, s. 1325–1331. ISSN 0090-9556.
96. SAHI, J.; BLACK, C. B.; HAMILTON, G. A.; ZHENG, X.; JOLLEY, S.; ROSE, K. A.; GILBERT, D.; LECLUYSE, E. L.; SINZ, M. W. Comparative Effects of Thiazolidinediones on in Vitro P450 Enzyme Induction and Inhibition. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 2003, roč. 31, č. 4, s. 439–446. ISSN 0090-9556.
97. KOCAREK, T. A.; DAHN, M. S.; CAI, H.; STROM, S. C.; MERCER-HAINES, N. A. Regulation of CYP2B6 and CYP3A Expression by Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A Inhibitors in Primary Cultured Human Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 2002, roč. 30, č. 12, s. 1400–1405. ISSN 0090-9556.
98. FAUCETTE, S. R.; WANG, H.; HAMILTON, G. A.; JOLLEY, S. L.; GILBERT, D.; LINDLEY, C.; YAN, B.; NEGISHI, M.; LECLUYSE, E. L. Regulation of CYP2B6 in

- Primary Human Hepatocytes by Prototypical Inducers. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 2004, roč. 32, č. 3, s. 348–358. ISSN 0090-9556.
99. MARTIN, H.; SARSAT, J.-P.; de WAZIERS, I.; HOUSSET, C.; BALLADUR, P.; BEAUNE, P.; ALBALADEJO, V.; LERCHE-LANGRAND, C. Induction of Cytochrome P450 2B6 and 3A4 Expression by Phenobarbital and Cyclophosphamide in Cultured Human Liver Slices. *Pharmaceutical Research*. 2003, roč. 20, č. 4, s. 557–568. ISSN 1573-904X.
100. GUENGERICH, F. P. Human Cytochrome P450 Enzymes. In: ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. (ed.). *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Cham: Springer International Publishing, 2015, s. 523–785. ISBN 978-3-319-12108-6.
101. KHARASCH, E. D.; STUBBERT, K. Role of Cytochrome P4502B6 in Methadone Metabolism and Clearance. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2013, roč. 53, č. 3, s. 305–313. ISSN 1552-4604.
102. ASIMUS, S.; ASHTON, M. Artemisinin—a Possible CYP2B6 Probe Substrate? *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. 2009, roč. 30, č. 5, s. 265–275. ISSN 1099-081X.
103. WHITE, I. N. H.; DE MATTEIS, F.; GIBBS, A. H.; LIM, C. K.; WOLF, C. R.; HENDERSON, C.; SMITH, L. L. Species Differences in the Covalent Binding of [<sup>14</sup>C]Tamoxifen to Liver Microsomes and the Forms of Cytochrome P450 Involved. *Biochemical Pharmacology*. 1995, roč. 49, č. 8, s. 1035–1042. ISSN 0006-2952.
104. RENDIC, S. Summary of Information on Human CYP Enzymes: Human P450 Metabolism Data. *Drug Metabolism Reviews*. 2002, roč. 34, č. 1-2, s. 83–448. ISSN 0360-2532.
105. BUSBY, W. F.; ACKERMANN, J. M.; CRESPI, C. L. Effect of Methanol, Ethanol, Dimethyl Sulfoxide, and Acetonitrile on in Vitro Activities of cDNA-Expressed Human Cytochromes P-450. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 1999, roč. 27, č. 2, s. 246–249. ISSN 0090-9556.

106. HESSE, L. M.; von MOLTKE, L. L.; SHADER, R. I.; GREENBLATT, D. J. Ritonavir, Efavirenz, and Nelfinavir Inhibit CYP2B6 Activity in Vitro: Potential Drug Interactions with Bupropion. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 2001, roč. 29, č. 2, s. 100–102. ISSN 0090-9556.
107. KORHONEN, L. E.; TURPEINEN, M.; RAHNASTO, M.; WITTEKINDT, C.; POSO, A.; PELKONEN, O.; RAUNIO, H.; 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*. 2007, roč. 150, č. 7, s. 932–942. ISSN 0007-1188.
108. TURPEINEN, M.; RAUNIO, H.; PELKONEN, O. The Functional Role of CYP2B6 in Human Drug Metabolism: Substrates and Inhibitors in Vitro, in Vivo and in Silico. *Current Drug Metabolism*. 2006, roč. 7, č. 7, s. 705–714. ISSN 1389-2002.
109. TURPEINEN, M.; NIEMINEN, R.; JUNTUNEN, T.; TAAVITSAINEN, P.; RAUNIO, H.; PELKONEN, O. Selective Inhibition of CYP2B6-Catalyzed Bupropion Hydroxylation in Human Liver Microsomes in Vitro. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 2004, roč. 32, č. 6, s. 626–631. ISSN 0090-9556.
110. RAE, J. M.; SOUKHOVA, N. V.; FLOCKHART, D. A.; DESTA, Z. Triethylenethiophosphoramidate Is a Specific Inhibitor of Cytochrome P450 2B6: Implications for Cyclophosphamide Metabolism. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 2002, roč. 30, č. 5, s. 525–530. ISSN 0090-9556.
111. RICHTER, T.; SCHWAB, M.; EICHELBAUM, M.; ZANGER, U. M. Inhibition of Human CYP2B6 by N,N',N''-Triethylenethiophosphoramidate Is Irreversible and Mechanism-Based. *Biochemical Pharmacology*. 2005, roč. 69, č. 3, s. 517–524. ISSN 0006-2952.
112. LEWIS, D. F. V.; LAKE, B. G. Molecular Modelling of Mammalian CYP2B Isoforms and Their Interaction with Substrates, Inhibitors and Redox Partners. *Xenobiotica*. 1997, roč. 27, č. 5, s. 443–478. ISSN 0049-8254.

113. IMAOKA, S.; HASHIZUME, T.; FUNAE, Y. Localization of Rat Cytochrome P450 in Various Tissues and Comparison of Arachidonic Acid Metabolism by Rat P450 with That by Human P450 Orthologs. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2005, roč. 20, č. 6, s. 478–484. ISSN 13474367.
114. IMAOKA, S.; TERANO, Y.; FUNAE, Y. Expression of Four Phenobarbital-Inducible Cytochrome P-450s in Liver, Kidney, and Lung of Rats. *The Journal of Biochemistry*. 1989, roč. 105, č. 6, s. 939–945. ISSN 0021-924X.
115. BOGAARDS, J. J. P.; BERTRAND, M.; JACKSON, P.; OUDSHOORN, M. J.; WEAVER, R. J.; BLADEREN, P. J. V.; WALTHER, B. Determining the Best Animal Model for Human Cytochrome P450 Activities: A Comparison of Mouse, Rat, Rabbit, Dog, Micropig, Monkey and Man. *Xenobiotica*. 2000, roč. 30, č. 12, s. 1131–1152. ISSN 0049-8254.
116. FUNAE, Y.; IMAOKA, S. Cytochrome P450 in Rodents. In: SCHENKMAN, J. B.; GREIM, H. (ed.). *Cytochrome P450*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1993, s. 221–238. Handbook of Experimental Pharmacology. ISBN 978-3-642-77763-9.
117. LEWIS, D. F. V.; LAKE, B. G.; DICKINS, M.; EDDERSHAW, P. J.; TARBIT, M. H.; GOLDFARB, P. S. Molecular Modelling of CYP2B6, the Human CYP2B Isoform, by Homology with the Substrate-Bound CYP102 Crystal Structure: Evaluation of CYP2B6 Substrate Characteristics, the Cytochrome B5 Binding Site and Comparisons with CYP2B1 and CYP2B4. *Xenobiotica*. 1999, roč. 29, č. 4, s. 361–393. ISSN 0049-8254.
118. PEKTHONG, D.; DESBANS, C.; MARTIN, H.; RICHERT, L. Bupropion Hydroxylation as a Selective Marker of Rat CYP2B1 Catalytic Activity. *Drug Metabolism and Disposition*. 2012, roč. 40, č. 1, s. 32–38. ISSN 0090-9556.
119. FAUCETTE, S. R.; HAWKE, R. L.; LECLUYSE, E. L.; SHORD, S. S.; YAN, B.; LAETHEM, R. M.; LINDLEY, C. M. Validation of Bupropion Hydroxylation as a Selective Marker of Human Cytochrome P450 2B6 Catalytic Activity. *Drug Metabolism and Disposition*. 2000, roč. 28, č. 10, s. 1222–1230. ISSN 0090-9556.

120. SHIMADA, T.; YAMAZAKI, H.; MIMURA, M.; INUI, Y.; 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. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1994, roč. 270, č. 1, s. 414–423. ISSN 0022-3565.
121. WILLIAMS, J. A.; HYLAND, R.; JONES, B. C.; SMITH, D. A.; HURST, S.; GO- OSEN, T. C.; PETERKIN, V.; KOUP, J. R.; BALL, S. E. Drug-Drug Interactions for UDP-Glucuronosyltransferase Substrates: A Pharmacokinetic Explanation for Typi- cally Observed Low Exposure (AUC<sub>i</sub>/AUC) Ratios. *Drug Metabolism and Dispo- sition: The Biological Fate of Chemicals*. 2004, roč. 32, č. 11, s. 1201–1208. ISSN 0090-9556.
122. KLOSE, T. S.; BLAISDELL, J. A.; GOLDSTEIN, J. A. Gene Structure of CYP2C8 and Extrahepatic Distribution of the Human CYP2Cs. *Journal of Biochemical and Mo- lecular Toxicology*. 1999, roč. 13, č. 6, s. 289–295. ISSN 1099-0461.
123. DELOZIER, T. C.; KISSLING, G. E.; COULTER, S. J.; DAI, D.; FOLEY, J. F.; BRADBURY, J. A.; MURPHY, E.; STEENBERGEN, C.; ZELDIN, D. C.; GOLD- STEIN, J. A. Detection of Human CYP2C8, CYP2C9, and CYP2J2 in Cardiovascular Tissues. *Drug Metabolism and Disposition*. 2007, roč. 35, č. 4, s. 682–688. ISSN 0090- 9556.
124. OBACH, R. S.; ZHANG, Q. Y.; DUNBAR, D.; KAMINSKY, L. S. Metabolic Charac- terization of the Major Human Small Intestinal Cytochrome P450s. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 2001, roč. 29, č. 3, s. 347–352. ISSN 0090-9556.
125. GERBAL-CHALOIN, S.; PASCUSI, J.-M.; PICHARD-GARCIA, L.; DAUJAT, M.; WAECHTER, F.; FABRE, J.-M.; CARRÈRE, N.; MAUREL, P. Induction of CYP2C Genes in Human Hepatocytes in Primary Culture. *Drug Metabolism and Disposition*. 2001, roč. 29, č. 3, s. 242–251. ISSN 0090-9556.

126. VAN BOOVEN, D.; MARSH, S.; MCLEOD, H.; CARRILLO, M. W.; SANGKUHL, K.; KLEIN, T. E.; ALTMAN, R. B. Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenetics and genomics*. 2010, roč. 20, č. 4, s. 277–281. ISSN 1744-6872.
127. RIFKIND, A. B.; LEE, C.; CHANG, T. K.; WAXMAN, D. J. Arachidonic Acid Metabolism by Human Cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: Regioselective Oxygenation and Evidence for a Role for CYP2C Enzymes in Arachidonic Acid Epoxygenation in Human Liver Microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1995, roč. 320, č. 2, s. 380–389. ISSN 0003-9861.
128. MARILL, J.; CAPRON, C. C.; IDRES, N.; CHABOT, G. G. Human Cytochrome P450s Involved in the Metabolism of 9-Cis- and 13-Cis-Retinoic Acids. *Biochemical Pharmacology*. 2002, roč. 63, č. 5, s. 933–943. ISSN 0006-2952.
129. LEE, C. R.; GOLDSTEIN, J. A.; PIEPER, J. A. Cytochrome P450 2C9 Polymorphisms: A Comprehensive Review of the in-Vitro and Human Data. *Pharmacogenetics*. 2002, roč. 12, č. 3, s. 251–263. ISSN 0960-314X.
130. AITHAL, G. P.; DAY, C. P.; KESTEVEN, P. J.; DALY, A. K. Association of Polymorphisms in the Cytochrome P450 CYP2C9 with Warfarin Dose Requirement and Risk of Bleeding Complications. *The Lancet*. 1999, roč. 353, č. 9154, s. 717–719. ISSN 0140-6736.
131. NINOMIYA, H.; MAMIYA, K.; MATSUO, S.; IEIRI, I.; HIGUCHI, S.; TASHIRO, N. Genetic Polymorphism of the CYP2C Subfamily and Excessive Serum Phenytoin Concentration with Central Nervous System Intoxication. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2000, roč. 22, č. 2, s. 230–232. ISSN 0163-4356.
132. KIDD, R. S.; STRAUGHN, A. B.; MEYER, M. C.; BLAISDELL, J.; GOLDSTEIN, J. A.; DALTON, J. T. Pharmacokinetics of Chlorpheniramine, Phenytoin, Glipizide and Nifedipine in an Individual Homozygous for the CYP2C9\*3 Allele. *Pharmacogenetics*. 1999, roč. 9, č. 1, s. 71–80. ISSN 0960-314X.
133. O'REILLY, R. A.; TRAGER, W. F.; RETTIE, A. E.; GOULART, D. A. Interaction of Amiodarone with Racemic Warfarin and Its Separated Enantiomorphs in Humans.

- Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 1987, roč. 42, č. 3, s. 290–294. ISSN 1532-6535.
134. GIANCARLO, G. M.; VENKATAKRISHNAN, K.; GRANDA, B. W.; von MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, D. J. Relative Contributions of CYP2C9 and 2C19 to Phenytoin 4-Hydroxylation in Vitro: Inhibition by Sulfaphenazole, Omeprazole, and Ticlopidine. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2001, roč. 57, č. 1, s. 31–36. ISSN 1432-1041.
135. NATION, R. L.; EVANS, A. M.; MILNE, R. W. Pharmacokinetic Drug Interactions with Phenytoin (Part I). *Clinical Pharmacokinetics*. 1990, roč. 18, č. 1, s. 37–60. ISSN 1179-1926.
136. KUNZE, K. L.; WIENKERS, L. C.; THUMMEL, K. E.; TRAGER, W. F. Warfarin-Fluconazole. I. Inhibition of the Human Cytochrome P450-Dependent Metabolism of Warfarin by Fluconazole: In Vitro Studies. *Drug Metabolism and Disposition*. 1996, roč. 24, č. 4, s. 414–421. ISSN 0090-9556.
137. O'REILLY, R. A.; GOULART, D. A.; KUNZE, K. L.; NEAL, J.; GIBALDI, M.; EDDY, A. C.; TRAGER, W. F. Mechanisms of the Stereoselective Interaction between Miconazole and Racemic Warfarin in Human Subjects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 1992, roč. 51, č. 6, s. 656–667. ISSN 0009-9236.
138. POND, S. M.; BIRKETT, D. J.; WADE, D. N. Mechanisms of Inhibition of Tolbutamide Metabolism: Phenylbutazone, Oxyphenbutazone, Sulfaphenazole. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 1977, roč. 22, s. 573–579. ISSN 1532-6535.
139. TRANSON, C.; LEEMANN, T.; DAYER, P. In Vitro Comparative Inhibition Profiles of Major Human Drug Metabolising Cytochrome P450 Isozymes (CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4) by HMG-CoA Reductase Inhibitors. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 1996, roč. 50, č. 3, s. 209–215. ISSN 0031-6970.
140. LINDELL, M.; LANG, M.; LENNERNÄS, H. Expression of Genes Encoding for Drug Metabolising Cytochrome P450 Enzymes and P-Glycoprotein in the Rat Small Intestine; Comparison to the Liver. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2003, roč. 28, č. 1, s. 41–48. ISSN 2107-0180.

141. DANIEL, W. A.; HADUCH, A.; SYREK, M.; BOKSA, J. Direct and Indirect Interactions between Antidepressant Drugs and CYP2C6 in the Rat Liver during Long-Term Treatment. *European Neuropsychopharmacology*. 2006, roč. 16, č. 8, s. 580–587. ISSN 0924-977X.
142. *Blastp on UNIPROTKB\_REFPROTSWISSPROT* [online] [cit. 2020-03-13] Dostupné z URL: <https://www.uniprot.org/blast/uniprot/B20200313DA437993067-D6F64326E5E763500BDED0DD61BZ?alignment=48>.
143. KOBAYASHI, K.; URASHIMA, K.; SHIMADA, N.; CHIBA, K. Substrate Specificity for Rat Cytochrome P450 (CYP) Isoforms: Screening with cDNA-Expressed Systems of the Rat. *Biochemical Pharmacology*. 2002, roč. 63, č. 5, s. 889–896. ISSN 0006-2952.
144. WU, W. W. P.; YEUNG, J. H. K. Inhibition of Warfarin Hydroxylation by Major Tanshinones of Danshen (*Salvia Miltiorrhiza*) in the Rat in Vitro and in Vivo. *Phytomedicine*. 2010, roč. 17, č. 3, s. 219–226. ISSN 0944-7113.
145. YAMAZAKI, H.; SHIMADA, T. Progesterone and Testosterone Hydroxylation by Cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in Human Liver Microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1997, roč. 346, č. 1, s. 161–169. ISSN 0003-9861.
146. KOBAYASHI, K.; URASHIMA, K.; SHIMADA, N.; CHIBA, K. Selectivities of Human Cytochrome P450 Inhibitors toward Rat P450 Isoforms: Study with cDNA-Expressed Systems of the Rat. *Drug Metabolism and Disposition*. 2003, roč. 31, č. 7, s. 833–836. ISSN 0090-9556.
147. SHAW, P. M.; ADESNIK, M.; WEISS, M. C.; CORCOS, L. The Phenobarbital-Induced Transcriptional Activation of Cytochrome P-450 Genes Is Blocked by the Glucocorticoid-Progesterone Antagonist RU486. *Molecular Pharmacology*. 1993, roč. 44, č. 4, s. 775–783. ISSN 0026-895X.
148. MONTELLANO, P. R. O. de. Acetylenes: Cytochrome P450 Oxidation and Mechanism-Based Enzyme Inactivation. *Drug Metabolism Reviews*. 2019, roč. 51, č. 2, s. 162–177. ISSN 0360-2532.



149. LIN, H.-I.; ZHANG, H.; HOLLENBERG, P. F. Formation of Both Heme and Apoprotein Adducts Contributes to the Mechanism-Based Inactivation of Human CYP2J2 by 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol. *Drug Metabolism and Disposition*. 2018, roč. 46, č. 6, s. 813–822. ISSN 0090-9556.
150. LIN, H.-I.; HOLLENBERG, P. F. The Inactivation of Cytochrome P450 3A5 by 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol Is Cytochrome B5-Dependent: Metabolic Activation of the Ethynyl Moiety Leads to the Formation of Glutathione Conjugates, a Heme Adduct, and Covalent Binding to the Apoprotein. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007, roč. 321, č. 1, s. 276–287. ISSN 0022-3565.
151. KENT, U. M.; MILLS, D. E.; RAJNARAYANAN, R. V.; ALWORTH, W. L.; HOLLENBERG, P. F. Effect of 17-Alpha-Ethinylestradiol on Activities of Cytochrome P450 2B (P450 2B) Enzymes: Characterization of Inactivation of P450s 2B1 and 2B6 and Identification of Metabolites. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002, roč. 300, č. 2, s. 549–558. ISSN 0022-3565.
152. KOCAREK, T. A.; SCHUETZ, E. G.; GUZELIAN, P. S. Regulation of Cytochrome P450 2B1/2 MRNAs by Kepone® (Chlordecone) and Potent Estrogens in Primary Cultures of Adult Rat Hepatocytes on Matrigel. *Toxicology Letters*. 1994, roč. 71, č. 2, s. 183–196. ISSN 0378-4274.
153. BOREK-DOHALSKA, L.; KLUSONOVA, Z.; HOLECOVA, J.; MARTINKOVA, M.; BARTA, F.; DRACINSKA, H.; CAJTHAML, T.; STIBOROVA, M. Exposure of Rats to Exogenous Endocrine Disruptors 17alpha-Ethinylestradiol and Benzo(a)Pyrene and an Estrogenic Hormone Estradiol Induces Expression of Cytochromes P450 Involved in Their Metabolism. 2016, s. 11.
154. SHELEPOVA, T.; NAFZIGER, A. N.; VICTORY, J.; KASHUBA, A. D. M.; ROWLAND, E.; ZHANG, Y.; SELLERS, E.; KEARNS, G.; LEEDER, J. S.; GAEDIGK, A.; BERTINO, J. S. Effect of a Triphasic Oral Contraceptive on Drug-Metabolizing Enzyme Activity as Measured by the Validated Cooperstown 5+1 Cocktail. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2005, roč. 45, č. 12, s. 1413–1421. ISSN 1552-4604.

155. WALSKY, R. L.; ASTUCCIO, A. V.; OBACH, R. S. Evaluation of 227 Drugs for In Vitro Inhibition of Cytochrome P450 2B6. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2006, roč. 46, č. 12, s. 1426–1438. ISSN 1552-4604.
156. LIN, H.-L.; KENT, U. M.; ZHANG, H.; WASKELL, L.; HOLLENBERG, P. F. The Functional Role of Threonine-205 in the Mechanism-Based Inactivation of P450 2B1 by Two Ethynyl Substrates: The Importance of the F Helix in Catalysis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004, roč. 311, č. 3, s. 855–863. ISSN 0022-3565.
157. LEEMANN, T.; TRANSON, C.; DAYER, P. Cytochrome P450TB (CYP2C): A Major Monooxygenase Catalyzing Diclofenac 4'-Hydroxylation in Human Liver. *Life Sciences*. 1993, roč. 52, č. 1, s. 29–34. ISSN 0024-3205.
158. KAPHALIA, L.; KAPHALIA, B. S.; KUMAR, S.; KANZ, M. F.; TREINEN-MOSLEN, M. Efficient High Performance Liquid Chromatograph/Ultraviolet Method for Determination of Diclofenac and 4'-Hydroxydiclofenac in Rat Serum. *Journal of Chromatography B*. 2006, roč. 830, č. 2, s. 231–237. ISSN 1570-0232.
159. HESSE, L. M.; VENKATAKRISHNAN, K.; COURT, M. H.; MOLTKE, L. L. von; DUAN, S. X.; SHADER, R. I.; GREENBLATT, D. J. CYP2B6 Mediates the In Vitro Hydroxylation of Bupropion: Potential Drug Interactions with Other Antidepressants. *Drug Metabolism and Disposition*. 2000, roč. 28, č. 10, s. 1176–1183. ISSN 0090-9556.
160. BURKE, M. D.; MAYER, R. T. Ethoxyresorufin: Direct Fluorimetric Assay of a Microsomal O-Dealkylation Which Is Preferentially Inducible by 3-Methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition*. 1974, roč. 2, č. 6, s. 583–588. ISSN 0090-9556.
161. SUMPTER, J. P.; JOBLING, S. Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. *Environmental Health Perspectives*. 1995, roč. 103 Suppl 7, s. 173–178. ISSN 0091-6765.
162. HICKMAN, D.; WANG, J. P.; WANG, Y.; UNADKAT, J. D. Evaluation of the Selectivity of In Vitro Probes and Suitability of Organic Solvents for the Measurement of Human Cytochrome P450 Monooxygenase Activities. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 1998, roč. 26, č. 3, s. 207–215. ISSN 0090-9556.

163. EASTERBROOK, J.; LU, C.; SAKAI, Y.; LI, A. P. Effects of Organic Solvents on the Activities of Cytochrome P450 Isoforms, UDP-Dependent Glucuronyl Transferase, and Phenol Sulfotransferase in Human Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*. 2001, roč. 29, č. 2, s. 141–144. ISSN 0090-9556.
164. ROKITTA, D.; PFEIFFER, K.; STREICH, C.; GERWIN, H.; FUHR, U. The Effect of Organic Solvents on Enzyme Kinetic Parameters of Human CYP3A4 and CYP1A2 in Vitro. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2013, roč. 23, č. 8, s. 576–583. ISSN 1537-6516.
165. SAKALLI, S.; BURKINA, V.; ZLABEK, V.; ZAMARATSKAIA, G. Effects of Acetone, Acetonitrile, Ethanol, Methanol and DMSO on Cytochrome P450 in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Hepatic Microsomes. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2015, roč. 25, č. 6, s. 501–506. ISSN 1537-6516.
166. HEUVEL, M. W. van den; BRAGT, A. J. M. van; ALNABAWY, A. K. M.; KAPTEIN, M. C. J. Comparison of Ethinylestradiol Pharmacokinetics in Three Hormonal Contraceptive Formulations: The Vaginal Ring, the Transdermal Patch and an Oral Contraceptive. *Contraception*. 2005, roč. 72, č. 3, s. 168–174. ISSN 0010-7824.