

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Martin Ivančík

Vplyv protinádorového liečiva lenvatinibu na aktivitu cytochrómov

P450

Modulation of cytochrome P450 activity by the anticancer drug lenvatinib

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Helena Dračínská, Ph.D.

Praha 2022

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracoval samostatne a že som uviedol všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Prahe dňa

.....

Podpis autora

Abstrakt

Lenvatinib, obchodně prodáváný jako Lenvima®, je perorální léčivo schválené k léčbě rakoviny štítné žlázy, hepatocelulárního karcinomu a karcinomu ledvinových buněk, které působí jako inhibitor tyrosinkinas. Studie *in vitro* a *in vivo* prokázaly, že metabolismus lenvatinibu v lidském těle probíhá v játrech a ledvinách, přičemž jeho přeměnu zajišťuje systém cytochromů P450 a aldehydoxidasu.

Právě proto bylo cílem této bakalářské práce stanovit vliv lenvatinibu na aktivitu jednotlivých isoform lidského cytochromu P450. Mezi studované isoformy byly vybrány ty, které zajišťují metabolismus většiny cizorodých látek v lidském těle. Měření byla provedena *in vitro* za použití rekombinantních CYP exprimovaných v SupersomechTM pomocí markerových reakcí, které jednotlivé isoformy cytochromu P450 zajišťují.

Aktivita enzymu v reakčních směsích obsahujících lenvatinib v koncentraci, která odpovídala koncentraci daného substrátu nebo byla desetinasobně vyšší, byla porovnána s aktivitou enzymu v reakčních směsích, kde bylo místo lenvatinibu přidáno pouze rozpouštědlo DMSO. Na základě těchto měření byla vypočtena procentuální aktivita isoform 1A1, 1A2, 1B1, 2B6, 2C8, 2C9, 2E1 a 3A4 cytochromu P450 v přítomnosti lenvatinibu.

K poklesu aktivity došlo u isoform CYP1B1, CYP1A1 a CYP3A4. K nejvýraznější inhibici došlo u isoformy CYP1B1, kde byla následně stanovena i hodnota IC_{50} a to na 13,1 μ M. Inhibiční účinek byl pozorován i u isoformy CYP2C8 a CYP2C9, na základě čehož by bylo možné předpokládat, že lenvatinib působí jako mírný inhibitor podrodiny CYP2C.

Výsledky prokázaly, že lenvatinib nezpůsobuje výraznou změnu aktivity cytochromu P450, a proto by neměl mít ani výrazný podíl na interakcích mezi léky, které mohou vést k nežádoucím účinkům nebo selhání léčby.

Klíčová slova: lenvatinib, cytochrom P450, enzymová aktivita, inhibice

Abstract

Lenvatinib, commercially marketed as Lenvima®, is an oral drug approved for the treatment of thyroid cancer, hepatocellular carcinoma and renal cell carcinoma that acts as a tyrosine kinase inhibitor. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that lenvatinib is in the human body metabolised in liver and kidney by the cytochrome P450 enzyme system and aldehyde oxidase.

Therefore, the aim of this bachelor thesis was to determine the effect of lenvatinib on the activity of individual isoforms of human cytochrome P450. Among the isoforms studied, those that ensure the metabolism of majority of foreign substances in the human body were selected. Measurements were performed *in vitro* using recombinant CYPs expressed in Supersomes™ and using marker reactions that are provided by individual cytochrome P450 isoforms.

The activity of the enzyme in the reaction mixtures containing lenvatinib was compared with the activity of the enzyme in the reaction mixtures where only the solvent DMSO was added instead of lenvatinib. The concentration of lenvatinib corresponded to the concentration of the given substrate or was 10 times higher. Based on these measurements, the percentage activity of cytochrome P450 isoforms 1A1, 1A2, 1B1, 2B6, 2C8, 2C9, 2E1 and 3A4 in the presence of lenvatinib was calculated.

A decrease in activity of CYP1B1, CYP1A1 and CYP3A4 isoforms was observed. The most significant inhibition occurred in the CYP1B1 isoform, where the IC₅₀ value was subsequently determined to be 13,1 µM. An inhibitory effect was also found for CYP2C8 and CYP2C9 isoforms, suggesting that lenvatinib acts as a mild inhibitor of the CYP2C subfamily.

The results showed that lenvatinib did not significantly alter cytochrome P450 activity and therefore should not play a significant role in drug-drug interactions that may lead to adverse events or treatment failure.

Key words: lenvatinib, cytochrome P450, enzyme activity, inhibition

[IN SLOVAK]

Pod'akovanie:

Chcel by som sa pod'akovať svojej školiteľke **RNDr. Heleně Dračínskej, Ph.D.** za odborné vedenie, ochotu, cenné rady a čas, ktorý mi počas vypracovania tejto bakalárskej práce venovala. Okrem toho by som sa chcel pod'akovať mojej priateľke a rodine za podporu počas celého štúdia.

Obsah

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	10
ÚVOD.....	12
1. LITERÁRNY PREHĽAD.....	13
1.1 CYTOCHRÓM P450	13
1.1.1 Rozdelenie cytochrómov P450.....	15
1.1.2 Významné izoformy cytochrómu P450 pre biotransformáciu xenobiotík	15
1.1.2.1 <i>CYP1A</i>	15
1.1.2.2 <i>CYP1B</i>	16
1.1.2.3 <i>CYP2A</i>	16
1.1.2.4 <i>CYP2B</i>	16
1.1.2.5 <i>CYP2C</i>	17
1.1.2.6 <i>CYP2D</i>	17
1.1.2.7 <i>CYP2E</i>	17
1.1.2.8 <i>CYP3A</i>	17
1.1.3 Inhibícia cytochrómu P450	18
1.1.3.1 <i>Ireverzibilná inhibícia</i>	18
1.1.3.2 <i>Reverzibilná inhibícia</i>	19
1.2 TYROZÍNKinÁZY.....	20
1.2.1 Receptorové tyrozínkinázy.....	20
1.2.2 Nereceptorové tyrozínkinázy	21
1.2.3 Inhibítory tyrozínkináz.....	22
1.2.4 Lenvatinib.....	23
1.2.4.1 <i>Metabolizmus lenvatinibu</i>	24
1.2.4.2 <i>Interakcie s cytochrómom P450</i>	25
1.3 LIEKOVÉ INTERAKCIE	26
2. CIEĽ PRÁCE.....	28

3. MATERIÁL A METÓDY	29
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	29
3.2 POUŽITÉ PRÍSTROJE	30
3.3 POUŽITÉ METÓDY	32
3.3.1 Stanovenie aktivity CYP1A1 a 1B1 – <i>O</i> -deetylácia 7-etoxyresorufínu ...	32
3.3.2 Stanovenie koncentrácie IC ₅₀ ľudského CYP1B1	34
3.3.3 Stanovenie aktivity CYP1A2 – <i>O</i> -demetylácia 7-metoxyresorufínu	35
3.3.4 Stanovenie aktivity CYP2B6 – hydroxylácia bupropiónu.....	36
3.3.5 Stanovenie aktivity CYP2C8 – 6 α -hydroxylácia paklitaxelu.....	38
3.3.6 Stanovenie aktivity CYP2C9 – 4'-hydroxylácia diklofenaku.....	40
3.3.7 Stanovenie aktivity CYP2E1 – 6-hydroxylácia chlorzoxazónu	42
3.3.8 Stanovenie aktivity CYP3A4 – 6 β -hydroxylácia testosterónu	45
4. VÝSLEDKY	48
4.1 VPLYV LENVATINIBU NA AKTIVITU CYP1A1	49
4.2 VPLYV LENVATINIBU NA AKTIVITU CYP1A2.....	50
4.3 VPLYV LENVATINIBU NA AKTIVITU CYP1B1	51
4.4 VPLYV LENVATINIBU NA AKTIVITU CYP2B6.....	53
4.5 VPLYV LENVATINIBU NA AKTIVITU CYP2C8.....	54
4.6 VPLYV LENVATINIBU NA AKTIVITU CYP2C9.....	55
4.7 VPLYV LENVATINIBU NA AKTIVITU CYP2E1	56
4.8 VPLYV LENVATINIBU NA AKTIVITU CYP3A4.....	57
5. DISKUSIA.....	58
6. ZÁVER	62
ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	64

Zoznam použitých skratiek

ABC	ATP-Binding Cassette <i>Transporter</i> (ATP-viažuci kazetový <i>transportér</i>)
ALK	anaplastic lymphocyte kinase (anaplastická lymfomová kináza)
AO	aldehydoxidáza
ATP	adenozíntrifosfát
cAMP	cyklický adenosínmonofosfát
CYP	cytochróm P450
DDIs	drug-drug interactions (interakcie medzi liekmi)
DMSO	dimetylsulfoxid
ECD	extracelulárna doména
EGFR	epidermal growth factor receptor (receptor epidermálneho rastového faktoru)
FDA	Food and Drug Administration (Správa potravín a liečiv)
FGFR	fibroblast growth factor receptor (receptor fibroblastového rastového faktoru)
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
IC ₅₀	koncentrácia zlučiny spôsobujúca 50% inhibíciu daného enzýmu
KIT	receptor faktora kmeňových buniek
K _M	Michaelisova konštanta
MDR1	Multidrug Resistance 1 <i>glycoprotein</i> (viacnásobne-liekovo rezistentný <i>glykoproteín</i>)
NADPH	nikotínamidadenínindinukleotid fosfát
NADPH-GS	NADPH-generujúci systém
PDGFR α	platelet-derived growth factor receptor α (α receptor rastového faktora z krvných doštičiek)
RET	Rearranged during Transfection (receptor pre neurotrofný faktor)
RPM	počet otáčok za minútu
TKI	inhibítory tyrozínkináz
TMD	transmembránová doména
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor (receptor vaskulárneho endoteliálneho rastového faktoru)
V _{MAX}	maximálna rýchlosť reakcie

Úvod

Rakovina je jedno z najobávanejších ochorení 20. a 21. storočia, ktorého výskyt v populácii sa každý rok zvyšuje [1]. V roku 2020 dosiahol odhadovaný počet nových prípadov na svete 19,3 milióna a v tom istom roku zomrelo na rakovinu takmer 10 miliónov ľudí [2].

Pojem rakovina zahŕňa viac ako 100 rôznych foriem ochorenia, pričom každé jedno z nich má unikátne vlastnosti, avšak základné procesy spôsobujúce vznik nádorov sú veľmi podobné [3]. Proces tvorby rakoviny, karcinogenéza, sa skladá z viacerých krokov, medzi ktoré patrí iniciácia zahŕňajúca zmenu genetickej informácie v bunkách, propagácia, čo je proces bunecnej proliferácie, a progres, ktorý je charakteristický zvýšenou rýchlosťou rastu nádoru, invazívnosťou a tvorbou metastáz [4]. Na rozdiel od zdravých buniek, ktorých rast a rozmnožovanie je kontrolované signálnymi dráhami, rakovinové bunky nepodliehajú kontrole, voľne sa množia a majú schopnosť migrovať do vzdialených miest v rámci tela, čo má za následok vznik nádorov [3], [5].

Mechanizmy prenosu signálu sa spoliehajú prevažne na posttranslačné modifikácie proteínov, medzi ktoré patria aj receptorové tyrozínkinázy (RTK) [6], [7]. Ide o transmembránové glykoproteíny aktivované väzbou ligandu, čo spôsobí prenos signálu z extracelulárneho priestoru do cytoplazmy pomocou fosforylácie tyrozínových zvyškov. RTK dokážu aktivovať viaceré signálne dráhy vedúce k proliferácii buniek, diferenciácii, migrácii alebo metabolickým zmenám [7]. Práve kvôli ich dôležitej úlohe môže porucha signalizácie pomocou týchto enzýmov viesť k viacerým ochoreniam, napríklad k rakovine [8]. Zistenie, že nádory obsahujú aktivačné mutácie v génoch kódujúcich RTK, viedlo k vývoju nových liekov, ktoré sú špecifické pre tieto tyrozínkinázy a dokážu ich inhibovať [8], [9].

Medzi inhibítory tyrozínkináz patrí aj lenvatinib, perorálne liečivo schválené na liečbu hepatocelulárneho karcinómu, karcinómu štítnej žľazy a obličkových buniek [10], [11]. Metabolizmus lenvatinibu prebieha prevažne v pečeni a v obličkách pomocou systému enzýmov cytochrómov P450 [12], [13]. V súčasnosti kvôli častejšiemu použitiu lenvatinibu na liečbu rakoviny je dôležité pochopenie jeho farmakokinetických vlastností pre zlepšenie výsledkov liečby. Informácie o vplyve liečiva na špecifické cytochrómy P450 môžu odhaliť potencionálne liekové interakcie a interindividuálne variácie v jeho metabolizme [14].

1. Literárny prehľad

1.1 Cytochróm P450

Cytochrómy P450 (CYP) sú hemoproteinové enzýmy, ktoré majú významnú rolu v premene a detoxifikácii cudzorodých látok (xenobiotík), v bunkovom metabolizme a udržiavaní homeostázy [15]. Boli objavené v 60. rokoch 20. storočia a v nasledujúcich rokoch bola dokázaná ich prítomnosť v nespočetnom množstve chemických reakcií, ktoré prebiehajú v živých organizmoch [16], [17]. Názov „P450“ bol pri objave použitý pre popis nového „pigmentu“, ktorý v komplexe s oxidom uhoľnatým vykazoval absorpčné maximum pri vlnovej dĺžke 450 nm a bol izolovaný z mikrozómov pečene zajaca [16].

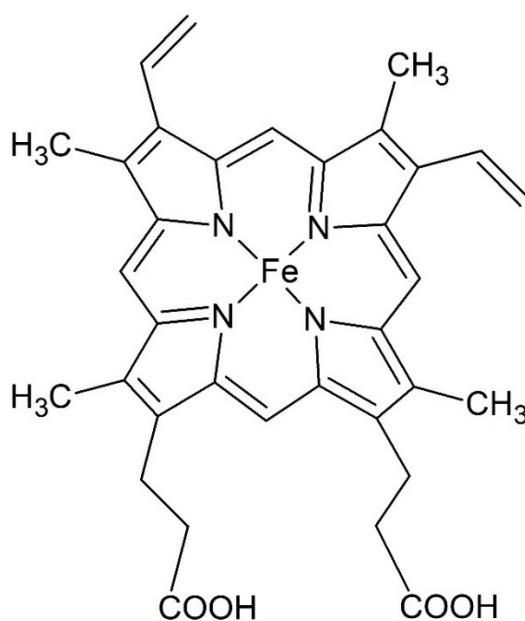
Dnes je známe, že cytochrómy P450 sa zúčastňujú oxidačno-redukčných reakcií až 95 % zo všetkých organických látok, ktoré takýmto reakciám podliehajú [18]. Ide o enzýmy so zmiešanou funkciou, ktoré patria do skupiny monooxygenáz (oxidáz) kvôli inzercii len jedného atómu kyslíku z molekuly O₂ do substrátu, pričom druhý atóm kyslíku je redukovaný na molekulu vody [16], [19]. Cytochrómy P450 sa v ľudskom tele vyskytujú najmä v pečeni, ale aj v obličkách, pľúcach, tenkom čreve, koži a v mozgu. V eukaryotických bunkách sa nachádzajú prevažne v membránach hladkého endoplazmatického retikula a v membránach mitochondrií, zatiaľ čo bakteriálne cytochrómy P450 sú enzýmy rozpustné v cytoplazme [20], [21].

Cytochrómy P450 obsahujú porfyrínový skelet (protoporfyrín IX), ktorý je v molekule enzýmu viazaný pomocou hydrofóbných síl a tiolovej síry sulfhydrylovej skupiny cysteínu prítomnej v aktívnom centre enzýmu [20]. Štruktúrne jadro cytochrómu P450 je tvorené štvorzávitnicovým zväzkom zloženým z troch paralelných helixov D, L, I a jedného antiparalelného helixu E (obrázok 1, strana 14). Prostetická hemová skupina (obrázok 2, strana 14) je umiestnená medzi helixom I a L a napojená na príľahlú Cys-hem-ligand slučku (loop) [22].



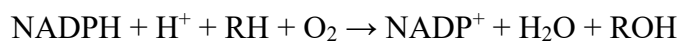
Obr. 1: Štruktúra cytochrómu P450 (prebrané z [22]).

Štruktúrne jadro je tvorené štvorzávitnicovým zväzkom zloženým z troch paralelných helixov D, L, I a jedného antiparalelného helixu E.



Obr. 2: Štruktúra hemu (vytvorené v programe ChemSketch).
Prostetická hemová skupina cytochrómu P450.

Cytochrómy P450 sú v organizme zodpovedné hlavne za reakcie prvej fázy biotransformácie chemických látok, čo vedie k ich detoxifikácii a po reakciách druhej fázy biotransformácie k ich eliminácii z buniek a exkrécii z organizmu [7]. Sú to enzýmy katalyzujúce oxidačné, peroxidačné a redukčné reakcie, ktoré sú súčasťou biotransformácie xenobiotík [21]. Všeobecne prebiehajú reakcie, ktorých sa zúčastňuje cytochróm P450, podľa rovnice:



pričom RH predstavuje substrát [17]. Okrem cytochrómu P450 sa reakcií zúčastňuje aj ďalší dôležitý enzým NADPH:cytochróm P450 reduktáza, ktorý je potrebný pre katalytickú funkciu cytochrómu [23].

1.1.1 Rozdelenie cytochrómov P450

V súčasnosti je vďaka analýze genómu známych 57 génov kódujúcich cytochrómy P450 v ľudskom tele, 88 v potkanoch a 103 v myšiach [11]. Ľudské cytochrómy P450 sú klasifikované do 18 rodín (označených arabskou číslicou) a 44 podrodín (označených veľkým písmenom) podľa ich primárnej štruktúry (poradia aminokyselín) [25]. Do jednej rodiny patria tie cytochrómy P450, ktoré vykazujú aspoň 40% identitu v ich aminokyselinovej sekvencii, zatiaľ čo v rámci jednej podrodiny vykazujú jednotlivé CYP aspoň 55% identitu [26]. Jednotlivé izoenzymy sú následne označené arabskou číslicou za písmenom [21]. Cytochrómy P450 sa vzájomne odlišujú výskytom v organizme, substrátovou selektivitou a látkami, ktoré dokážu spôsobiť zmenu ich aktivity [25].

Medzi hlavné ľudské cytochrómy P450, ktoré zabezpečujú metabolickú premenu cudzorodých látok v pečeni, patria izoformy 1A2, 2A6, 2D6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2E1 a 3A4, zatiaľ čo v ostatných tkanivách sú prítomné vo vyššej koncentrácii izoformy 1A1, 2B6, 2E1 a 3A4 [21], [25].

1.1.2 Izoformy cytochrómu P450 významné pre biotransformáciu xenobiotík

1.1.2.1 CYP1A

Podrodina 1A cytochrómu P450 má dôležitú úlohu v rámci metabolizmu liekov, látok znečisťujúcich životné prostredie a endogénnych látok, a práve preto patrí medzi tie najdôležitejšie [13]. Skladá sa z dvoch funkčných génov CYP1A1 a CYP1A2, ktoré sú najviac rozšírené v pečeni a v tráviacej sústave [21], [28]. Izoforma CYP1A1 zabezpečuje metabolizmus arénov, zatiaľ čo CYP1A2 premenu aromatických aminov a heterocyklických zlúčenín [27].

V rámci metabolizmu látok znečisťujúcich životné prostredie, ktorého sa podrodina CYP1A zúčastňuje, ide napríklad o 4-aminobifenyl, 2-naftylamín alebo benzo[*a*]pyrén [27]. Kvôli vysokému zastúpeniu CYP1A2 v pečeni zabezpečuje táto

izoforma premenu širokého spektra liekov, do ktorého patria antipsychotiká (klozapín), antidepressíva (duloxetín) alebo lieky na kardiovaskulárne ochorenia (propranolol) [28]. Okrem toho zabezpečuje podrodina CYP1A aj metabolizmus pohlavných hormónov (androgénov a estrogénov), retinolu, melatonínu a fosfatidylcholínu [27].

1.1.2.2 CYP1B

Jediným členom podrodiny CYP1B je izoforma CYP1B1, ktorá bola objavená v roku 1994, pričom analýza aminokyselinovej sekvencie preukázala približne 40% homológiu s izoformami CYP1A1 a CYP1A2 [29]–[31]. Zatiaľ čo koncentrácia CYP1B1 v normálnych tkanivách je relatívne nízka a na rozdiel od väčšiny cytochrómov P450 sa nenachádza v pečeni, zvýšená expresia tohto enzýmu bola pozorovaná pri viacerých typoch rakoviny, napríklad prsníka, pľúc, lymfatických uzlín alebo kože [32]. CYP1B1 je schopný metabolizovať aflatoxín B1, aromatické a heterocyklické amíny alebo polycyklické aromatické uhľovodíky, pričom všetky tieto látky patria medzi významné karcinogény [29]. Okrem toho je zapojený aj do metabolizmu estradiolu, retinolu alebo melatonínu [33].

1.1.2.3 CYP2A

Podrodina CYP2A tvorí približne 4 % zo všetkých foriem cytochrómu P450, ktoré sa vyskytujú v pečeni. Zaraďujeme sem tri hlavné ľudské izoformy, a to CYP2A6, CYP2A7 a CYP2A13 [34]. Najdôležitejším zástupcom je CYP2A6, ktorý zabezpečuje premenu nikotínu, kumarínu, butadiénu alebo aflatoxínu B1 [21], [34].

1.1.2.4 CYP2B

Jediným zástupcom podrodiny CYP2B v tele človeka je izoforma CYP2B6, o ktorej sa predpokladalo, že tvorí menej ako 1 % zo všetkých foriem cytochrómov P450 nachádzajúcich sa v pečeni, avšak viaceré štúdie neskôr ukázali, že v skutočnosti je to od 2-10 %. Zároveň bola dokázaná zvýšená expresia tejto formy u fajčiarov a alkoholikov [35].

Medzi substráty CYP2B6 patrí viacero látok využívaných pre liečebné účely ako napríklad antidepressívum bubropión, antiepileptikum mefobarbital alebo anestetikum propofol [35]. Okrem toho zabezpečuje metabolizmus aj testosterónu, estrónu, ethinylestradiolu a arachidonovej kyseliny [36].

1.1.2.5 CYP2C

V ľudskom tele sú známi štyria zástupcovia tejto podrodiny (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19), ktorí spoločne metabolizujú až 25 % zo všetkých liekov a viaceré endogénne látky [37], [38]. Jednotlivé izoformy sú najviac zastúpené v pečeni, kde spoločne tvoria až 20 % zo všetkých prítomných cytochrómov P450. Okrem toho sa vyskytujú aj v pľúcach, obličkách alebo črevách [37]. Medzi hlavné substráty tejto podrodiny patria široko využívané lieky ako ibuprofén, propranolol, paklitaxel alebo diazepam [21], [37].

1.1.2.6 CYP2D

Jediným funkčným ľudským zástupcom podrodiny CYP2D je izoforma CYP2D6, ktorá tvorí asi len 4 % zo všetkých cytochrómov P450, ktoré sa vyskytujú v pečeni [39]. Táto forma sa vyznačuje výrazným genetickým polymorfizmom [21]. Okrem toho vykazuje veľmi vysokú afinitu k alkaloidom, ktoré je zároveň schopná detoxikovať [39].

1.1.2.7 CYP2E

Podrodinu CYP2E zastupuje izoforma CYP2E1, ktorá tvorí asi 7 % zo všetkých cytochrómov P450 v pečeni a má kľúčovú úlohu pri metabolizme liekov a karcinogénov [7], [21]. Táto forma je zodpovedná za tvorbu reaktívnych metabolitov z mnohých látok, s ktorými sa človek môže stretnúť (napr. benzén, styren, vinylchlorid alebo chloroform) a zároveň aktivuje karcinogény, hlavne rad nitrosamínov [21]. Okrem toho zabezpečuje spolu s ďalšími dvoma enzýmami, alkoholdehydrogenázou a katalázou, oxidáciu etanolu na acetaldehyd [41]. Pri nízkej koncentrácii etanolu je CYP2E1 zodpovedný približne za 10 % z celkovej oxidačnej kapacity pečene. Okrem toho dokáže oxidovať aj ďalšie zlúčeniny, napríklad acetón alebo benzén [42].

1.1.2.8 CYP3A

Do podrodiny CYP3A patria dvaja hlavní zástupcovia CYP3A4 a CYP3A5, ktorých expresia prebieha prevažne v pečeni a tenkom čreve [43]. Jednotlivé izoformy spolu zabezpečujú premenu až 50 % dostupných liekov, pričom dôležitejšou izoformou je CYP3A4, ktorý je v tomto smere najvýznamnejším zo všetkých cytochrómov P450 [21], [44]. Okrem liekov sa tento enzým podieľa na oxidácii veľkého množstva karcinogénov a endogénnych látok (steroidov). Medzi substráty tohto cytochrómu patria napríklad

aflatoxín, tamoxifén, benzo[*a*]pyrén, 17 β -estradiol, kortisol, testosterón alebo progesterón [21].

1.1.3 Inhibícia cytochrómu P450

Cytochróm P450 je membránovo viazaný proteín, ktorého jednou z hlavných úloh je spracovanie xenobiotík [15]. Napriek tomu, že do tejto skupiny radíme vyše 50 enzýmov, len 6 z nich zabezpečuje metabolizmus až 90 % dostupných liekov [45]. Práve kvôli pôsobeniu liekov cez receptorové mechanizmy môže dôjsť k inhibícií alebo indukcií cytochrómov P450, čo následne vedie ku klinicky významným interakciám, ktoré môžu spôsobiť neočakávané a nežiadúce reakcie, dokonca až zlyhania terapeutickjej liečby [15], [45].

Téma inhibície CYP enzýmov získala pozornosť v 70. rokoch 20. storočia, keď bol preukázaný vplyv cimetidínu, ktorý sa využíva pri pálení záhy, na metabolizmus iných liekov v zvieratách aj ľuďoch. V súčasnosti sú známe 2 základné druhy inhibície cytochrómov P450, a to mechanizmus ireverzibilný (tzv. „mechanism-based“) a reverzibilný, pričom rozpoznanie môže byť veľmi náročné, pokiaľ sa inhibítor viaže na enzým veľmi pevne a pomaly sa uvoľňuje. Ireverzibilná inhibícia vyžaduje biotransformáciu inhibítora, zatiaľ čo pri reverzibilnej nemusí dôjsť k premene molekuly inhibítora [46].

1.1.3.1 Ireverzibilná inhibícia

K ireverzibilnej inhibícií dochádza vytvorením reaktívneho medziproduktu premeny xenobiotika a následným pevným kovalentným naviazaním medziproduktu na proteín alebo hem cytochrómu P450. Účinok takejto inhibície spôsobuje nevratnú inaktiváciu enzýmu a obnovenie činnosti môže nastať len syntézou nového enzýmu CYP [47].

Látky spôsobujúce takýto druh inhibície sa rozdeľujú do dvoch skupín. Môže ísť o inhibítory ireverzibilné alebo kvazi-ireverzibilné, pričom obe sú závislé na vzniku reaktívnych intermediátov [47].

Pri kvazi-ireverzibilnej inhibícií interagujú medziprodukty s hemovým železom cytochrómu P450, čo spôsobuje tvorbu neaktívneho komplexu. Na druhej strane reaktívne medziprodukty, ktoré vznikli pôsobením ireverzibilného inhibítora, reagujú s aminokyselinovými zvyškami aktívneho miesta v apoproteíne alebo zmenou hemu v porfyríne, čo spôsobuje nakoniec deštrukciu hemu a celého cytochrómu P450 [47].

Medzi látky, ktoré spôsobujú kvazi-ireverzibilnú inhibíciu patria napríklad aromatické amíny (obsiahnuté v makrolidových antibiotikách, napr. erytromycín) alebo 1,1-disubstituované hydrazíny (napr. izoniazid, antibiotikum používané pri liečbe tuberkulózy), naopak alkény a alkíny (napr. gestodén, súčasť antikoncepčných tabliet), ktoré obsahujú dvojité/trojité väzby, sú schopné vyvolať inhibíciu ireverzibilnú [47]–[49].

1.1.3.2 Reverzibilná inhibícia

Reverzibilná inhibícia zahŕňa rýchlu asociáciu a disociáciu medzi inhibítorom a cytochrómom P450, pričom naviazanie molekuly prebieha cez slabé väzby, ktorých tvorba a degradácia je veľmi jednoduchá [46]. Medzi najčastejšie látky, ktoré spôsobujú tento druh inhibície, patria heteroaromatické xenobiotiká, ktorých molekula obsahuje atóm dusíku. Ide napríklad o pyridín, imidazol, triazol alebo chinolín. Reverzibilná inhibícia sa delí na 4 základné druhy a to inhibíciu kompetitívnu, akompetitívnu, zmiešanú a nekompetitívnu [47].

Ku kompetitívnej inhibícií dochádza vtedy, ak substrát a inhibítor bojujú o to isté väzbové miesto na enzýme. Dochádza pri tom k zvýšeniu hodnoty K_M . Hodnota V_{MAX} sa nemení [47].

Pri nekompetitívnej inhibícií dochádza k väzbe inhibítora na iné väzbové miesto ako na to, kde nastáva väzba molekuly substrátu. Inhibítor je schopný viazať sa rovnako dobre na voľnú molekulu enzýmu a taktiež aj na molekulu binárneho komplexu enzým-substrát [50]. V prvom prípade spomaľuje väzbu substrátu na enzým a tvorbu binárneho komplexu, zatiaľ čo v druhom prípade bráni rozpadu binárneho komplexu a tvorbe produktov. Pri nekompetitívnom druhu inhibície dochádza k zachovaniu hodnoty K_M a zníženiu hodnoty V_{MAX} [47].

Pri zmiešanej inhibícií dochádza ku kompetitívnemu aj akompetitívnemu deju, čo spôsobuje prevažne zvýšenie K_M a zníženie hodnoty V_{MAX} [47].

Posledným druhom je inhibícia akompetitívna, pri ktorej dochádza k väzbe inhibítora na binárny komplex enzým-substrát a zabráneniu jeho rozpadu na produkty. Dochádza k poklesu hodnôt V_{MAX} aj K_M [47].

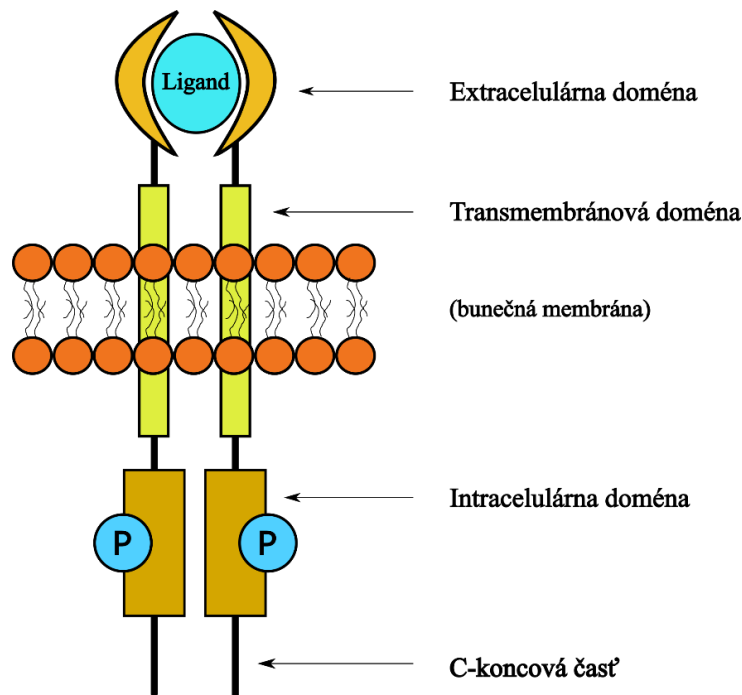
1.2 Tyrozínkinázy

Proteínové tyrozínkinázy sú nenahraditeľné enzýmy a súčasť bunčných signalizačných procesov, ktoré regulujú bunčný rast, diferenciáciu, migráciu a metabolizmus [51]. Tieto enzýmy katalyzujú prenos fosfátovej skupiny z adenosíntrifosfátu (ATP) na aminokyselinové zbytky tyrozínu v proteínoch, pričom fosforylácia tyrozínu je významná posttranslačná modifikácia, ktorá slúži na prenos signálu a komunikáciu medzi bunkami [51], [52]. V súčasnosti sú známe dva druhy, a to tyrozínkinázy receptorové (transmembránové) a nereceptorové [51].

1.2.1 Receptorové tyrozínkinázy

Receptorové tyrozínkinázy (RTK) umožňujú komunikáciu medzi bunkami a ich extracelulárnym prostredím, čo prispieva k zásadným krokom pri tvorbe nového tkaniva alebo organogenéze vo vývoji a k udržaniu homeostázy dospelého jedinca. Do tejto skupiny zaradíme 19 podrodín a 55 enzýmov, ktoré zabezpečujú rôzne funkcie, avšak všetky sa vyznačujú rovnakou štruktúrou. Sú zložené z N-koncovej extracelulárnej domény (ECD), jednej transmembránovej domény (TMD) a intracelulárnej kinázovej domény, ktorá je nasledovaná veľkou neusporiadanou C-koncovou časťou (obrázok 3, strana 21) [53].

Receptorové tyrozínkinázy sú aktivované pomocou receptorovo-špecifických ligandov, pričom tieto ligandy sa viažu na extracelulárnu doménu. Táto väzba umožňuje vznik intramolekulárneho diméru, čo následne aktivuje kinázovú doménu a spustí fosforyláciu C-koncovej časti [8]. Jednotlivé podrodiny receptorových tyrozínkináz sa vyznačujú veľkou podobnosťou ich kinázovej domény a odlišnosťou extracelulárnej. Táto rôznorodosť umožňuje receptorom rozpoznať štruktúrne odlišné proteínové ligandy, čo zabezpečuje jedinečnú kontrolu aktivity kinázovej domény [53].



Obr. 3: Štruktúra receptorovej tyrozínkinázy (vytvorené v programe Inkscape).
 Popis štruktúry RTK sa nachádza v texte na predchádzajúcej strane.

1.2.2 Nereceptorové tyrozínkinázy

Nereceptorové tyrozínkinázy sú bunčné enzýmy, ktoré spája neprítomnosť extracelulárnej domény. Jednotlivé enzýmy sú zaradené do 10 podrodín na základe ich štruktúrnej odlišnosti [54]. Väčšina z nich je lokalizovaná v cytoplazme alebo pri vnútornej strane cytoplazmatickej membrány, kde vo všeobecnosti zabezpečujú úlohu prenášačov signálu v rámci cytoplazmy [55].

Najväčšou je podrodina Src, ktorá obsahuje až 8 členov. Napriek neprítomnosti transmembránovej domény sú lokalizované primárne pri bunčnej membráne [56]. Majú významnú úlohu v patogeneze kolorektálneho karcinómu, pričom ich aktivita a expresia bola zvýšená u pacientov s týmto ochorením [57].

Druhou je podrodina Csk, ktorá obsahuje 2 členov. Expresia enzýmov prebieha primárne v týmuse, slezine a mozgu. Hlavnou úlohou je ich pôsobenie ako negatívna regulácia podrodiny Src, čo prebieha pomocou fosforylácie inhibítora tejto podrodiny [56].

Medzi zvyšných členov nereceptorových tyrozínkináz patria podrodiny Syk, Tec, Jak, Fak, Abl, Fes, Frk a Ack [56].

1.2.3 Inhibítory tyrozínkináz

Proteinové tyrozínkinázy ovplyvňujú prenos signálu, diferenciáciu buniek a iné regulačné mechanizmy, pričom disregulácia niektorého z týchto procesov môže viesť aj k tvorbe rakoviny [8], [58]. Pri abnormálnej expresii proteinových tyrozínkináz môže nastať porucha bunecnej proliferácie, čo vedie k vzniku nádoru, metastáz a angiogenéze nádoru. Práve preto sú v súčasnosti niektoré tyrozínkinázy cieľom pôsobenia látok využívaných pri liečbe rakoviny [59]. Týmito látkami sú inhibítory tyrozínkináz (TKI), ktoré ovplyvňujú aktivitu RTK dvoma spôsobmi. Väčšina z nich sa viaže na väzbové miesto pre ATP, zatiaľ čo niekoľko inhibítorov sa zameriava na nové alosterické miesta. V oboch prípadoch dochádza k inhibícii kinázovej aktivity, čo má za následok zníženie proliferácie a rastu nádorov [60].

V roku 2001 bol imatinib ako prvý zo skupiny TKI schválený FDA (Food and Drug Administration - Správa potravín a liečiv), čo prinieslo nové spôsoby pre liečbu rakoviny [59]. V súčasnosti je schválených už viac ako 50 TKI, pričom tieto liečivá sa vyznačujú vysokou selektivitou, efektívnosťou, slabými vedľajšími účinkami a jednoduchou prípravou [59], [61]. Medzi cieľové tyrozínkinázy patria napríklad EGFR, VEGFR, FGFR alebo ALK [62].

EGFR (Epidermal growth factor receptor - receptor epidermálneho rastového faktoru) nazývaný aj HER1 je transmembránový glykoproteín s kinázovou aktivitou, ktorý je súčasťou mnohých významných signalizačných dráh [62]. Mutácia tohto proteínu sa najčastejšie vyskytuje u ľudí s adenokarcinómom pľúc [63]. Medzi inhibítory tohto receptora patria napríklad gefitinib, poziotinib alebo erlotinib [62].

ALK (Anaplastic lymphocyte kinase – anaplastická lymfomová kináza) je transmembránový kinázový receptor, pričom jeho expresia prebieha v nervovom systéme ešte počas embryogenézy a postupne slabne. Mutácie tohto proteínu boli spojené s viacerými druhmi rakoviny ako napríklad veľkobunecný B-bunkový lymfóm, karcinóm pľúc alebo karcinómy pažeráka či prsníka. Ako hlavné inhibítory tejto kinázy sa využívajú alectinib, crizotinib alebo ceritinib [64].

FGFR (Fibroblast growth factor receptor- receptor fibroblastového rastového faktoru) je transmembránový proteín s kinázovou aktivitou, ktorý sa skladá z troch extracelulárnych častí a iba jednej intracelulárnej [43]. Pri mutácií dochádza k zlepšeniu rastu nádoru a k jeho prekrveniu, pričom mutácia bola objavená až pri 20 % uroteliálneho

karcinómu. Medzi inhibítory tejto kinázy patria napríklad erdafitinib alebo pemigatinib [62].

VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor – receptor vaskulárneho endoteliálneho rastového faktoru) je receptorová tyrozínkináza, ktorá hrá dôležitú úlohu v procese angiogenézy a prvýkrát bola izolovaná už v roku 1980 [66]. Mutácia je najčastejšie spájaná s rakovinou obličkových buniek, štítnej žľazy, pečene alebo kolorektálnym karcinómom [62]. Medzi inhibítory tejto tyrozínkinázy patria napríklad regorafenib, vandetanib alebo lenvatinib [40].

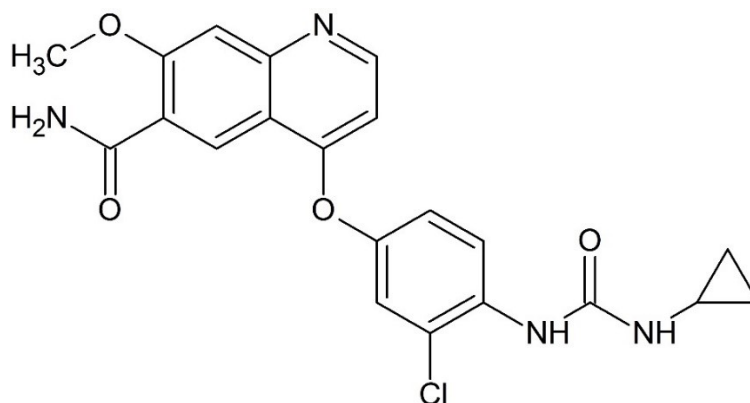
1.2.4 Lenvatinib

Lenvatinib, obchodne predávaný ako Lenvima®, je perorálne liečivo schopné inhibovať niektoré receptorové tyrozínkinázy a schválené pre liečbu rakoviny štítnej žľazy, hepatocelulárneho karcinómu a karcinómu obličkových buniek [10], [11]. Okrem toho ukázal potenciál aj pre liečbu rakoviny pľúc, adenoidne cystického karcinómu a karcinómu endometria [11]. Medzi receptory, ktoré je schopný inhibovať, patria VEGFR (1-3), FGFR (1-4), PDGFR α (Platelet-derived growth factor receptor α – receptor rastového faktora z krvných doštičiek), KIT (Receptor faktora kmeňových buniek) a RET (Receptor pre neurotrofný faktor) [67]. V roku 2015 bola publikovaná štúdia o väzbe lenvatinibu na VEGFR, ktorá hovorí o mechanizme jeho účinku. Pomocou röntgenovej štúdie a kinetických interakčných štúdií bolo zistené, že lenvatinib sa viaže na väzbové miesto pre ATP a okolitú oblasť pomocou cyklopropánového kruhu, čím inhibuje aktivitu tyrozínkinázy [68].

Testy prvej fázy klinických štúdií prebehli v rokoch 2011 až 2015 v Japonsku, Európe a Spojených štátoch amerických, pričom maximálna dávka bola stanovená na 25 mg denne [67], [69]. Následne po týchto testoch bola stanovená aj odporúčaná denná dávka na 24 mg. Okrem toho boli zistené aj najčastejšie vedľajšie účinky, medzi ktoré patrí napríklad vysoký krvný tlak, únava, zvracanie, pokles hmotnosti a proteinúria [67]. Po klinických testoch, ktoré začali už v roku 2013, bol lenvatinib v roku 2015 prvýkrát schválený FDA na liečbu rakoviny štítnej žľazy, v roku 2016 na liečbu rakoviny obličiek a v roku 2018 na liečbu hepatocelulárneho karcinómu, pričom toto ochorenie je 4. najčastejším nádorovým ochorením na svete [70], [71].

Lenvatinib je zlúčenina patriaca do skupiny chinolínových karboxamidov, pričom celý názov tohto lieku je 4-[3-chlór-4-(cyklopropylkarbamoylamino) fenoxyl]-7-metoxychinolín-6-karboxamid (obrázok 4, strana 24). Po orálnom podaní nadobúda

maximálnu koncentráciu v tele medzi 1. až 4. hodinou a biodostupnosť (bioavailability) bola stanovená na 85 % [72]. V *in vitro* testoch bol lenvatinib viazaný prevažne na plazmatické proteíny, hlavne na albumín, ale tiež aj P-glykoproteín a γ -globulín a jeho polčas rozpadu bol stanovený na 28 hodín [12], [72].



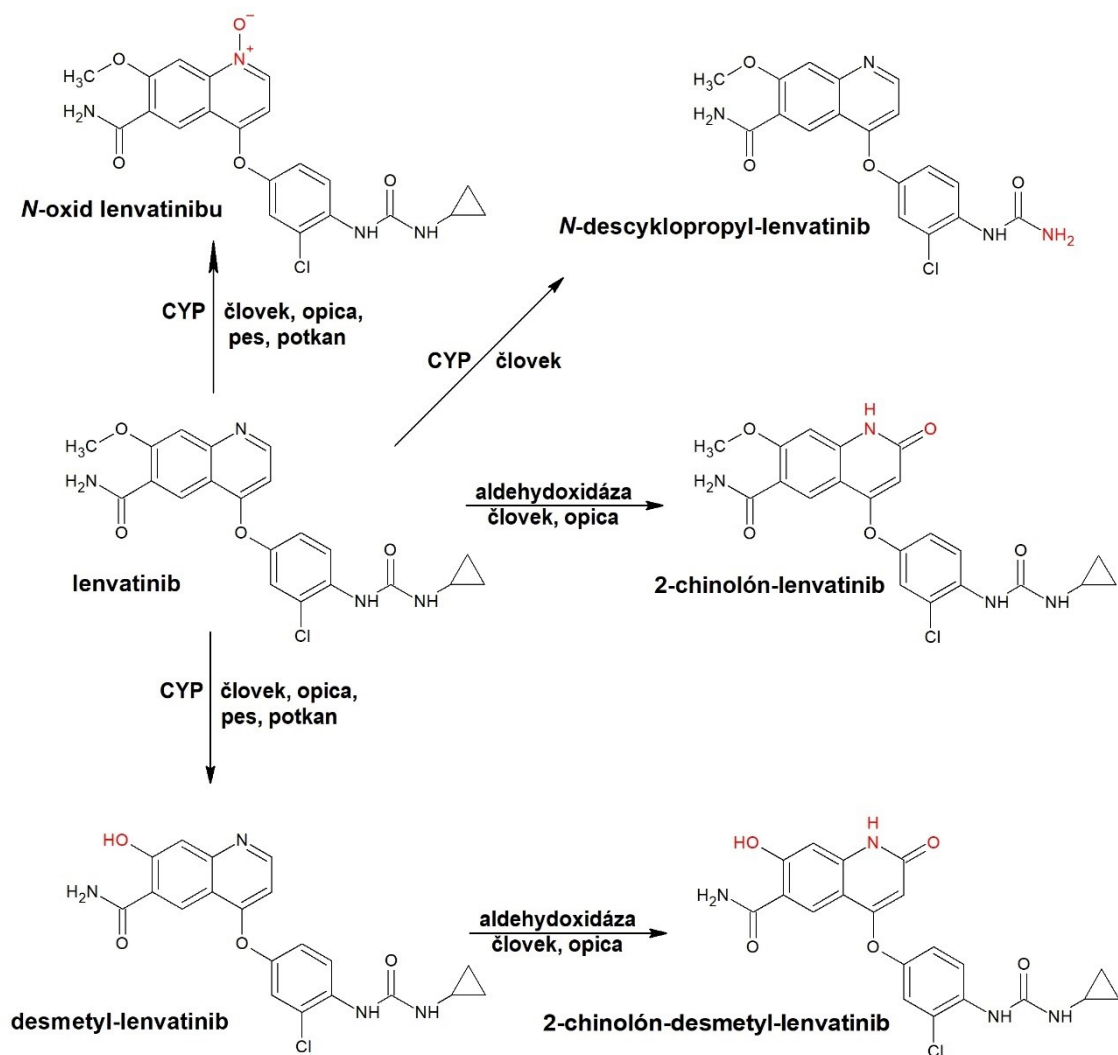
Obr. 4: Štruktúra lenvatinibu (vytvorené v programe ChemSketch).

1.2.4.1 Metabolizmus lenvatinibu

Štúdie *in vitro* a *in vivo* ukázali, že metabolizmus lenvatinibu prebieha hlavne v pečeni a v obličkách. Po premene nastáva exkrécia a to hlavne cez stolicu (65 %) a cez moč (25 %), pričom asi len 2,5 % dávky ostáva v tele človeka neporušená [12]. Metabolizmus lenvatinibu prebieha pomocou cytochrómov P450, kde najväčšiu úlohu hrá zástupca CYP3A4 (>80 %) [13].

Práve tento enzým premieňa lenvatinib na *N*-oxid lenvatinibu, desmetyl-lenvatinib a *N*-descyklopropyl-lenvatinib (obrázok 5, strana 25) [14], [73]. Desmetyl-lenvatinib a samotný lenvatinib sú taktiež oxidované pomocou aldehydoxidázy na dve zlúčeniny, a to 2-chinolón-lenvatinib a 2-chinolón-desmetyl-lenvatinib, pričom tieto dve látky sú hlavnými produktami, ktoré sa vyskytujú v stolici [73].

Aldehyd oxidáza (AO) je enzým zabezpečujúci oxidáciu aldehydov a azo-heterocyklických derivátov, pričom vysoká aktivita tohto enzýmu bola dokázaná u ľudí a opíc, veľmi nízka u potkanov a žiadna u psov [74]. Kinetická analýza odhalila nízku afinitu lenvatinibu a relatívne vyššiu afinitu desmetyl-lenvatinibu k aldehydoxidáze, čo naznačuje, že lenvatinib by bol stabilný voči metabolizmu AO, pokiaľ by nebol transformovaný najprv na desmetyl-lenvatinib pomocou cytochrómu P450 [73].



Obr. 5: Metabolizmus lenvatinibu (vytvorené v programe ChemSketch).
Prebrané a upravené z [14], [73].

1.2.4.2 Interakcie s cytochrómom P450

Keďže metabolizmus lenvatinibu prebieha prevažne pomocou CYP3A4 a zároveň lenvatinib pôsobí ako substrát ATP-viažuceho kazetového transportéru, počas štúdií vedených firmou Eisai, ktorá lenvatinib objavila a vyvinula, bol skúmaný vplyv lenvatinibu na aktivitu cytochrómu P450 a na viacnásobne-liekovo rezistentný (MDR1 – Multidrug Resistance 1) P-glykoproteín [75], [76].

P-glykoproteín je ABC transportér (ATP-Binding Cassette Transporter – ATP-viažuci kazetový transportér) patriaci do veľkej MDR rodiny, ktorých úloha je zložitá [77]. Tieto prenášače získavajú energiu na prenos substrátov pomocou naviazanie a hydrolýzy ATP. Za fyziologických podmienok sú xenobiotiká vylučované z buniek von pomocou týchto membránových transportérov. V nádorových bunkách, v ktorých

nastáva zvýšené expresia P-glykoproteínu, sú protirakovinové látky transportované v zvýšenej miere do extracelulárneho matrixu pomocou týchto prenášačov. Tento jav udržiava intracelulárnu koncentráciu liečiva v nádorových bunkách pod terapeutickým prahom, čo môže viesť k cytotoxickému účinku protinádorových liekov [77].

Výsledky štúdií preukázali, že lenvatinib pôsobí ako ireverzibilný inhibítor CYP3A4 a ako jeden zo substrátov MDR1 veľmi slabo inhibuje jeho transportnú funkciu [75], [78]. Okrem toho bolo v rámci ďalších štúdií zistené, že lenvatinib pôsobí ako mierny inhibítor aj izoforiem CYP2C8 a CYP2C9 [79], [80].

1.3 Liekové interakcie

V súčasnosti je štúdium interakcií medzi liekmi (DDIs – drug-drug interactions) veľmi významné [81]. Ich výskyt je veľmi častý pri predpísaní primárnej liečby a väčšina z nich je predvídateľná. Identifikácia najvýznamnejších a klinicky relevantných liekových interakcií je zásadná pre bezpečnosť pacienta, pričom ročne majú na svedomí približne 2,8 % zo všetkých hospitalizácií v Spojených štátoch amerických, čo predstavuje viac ako 245 000 pacientov. Medzi stratégie na zníženie rizika DDIs patrí napríklad minimalizácia počtu predpísaných liekov, pravidelné prehodnocovanie terapie, zváženie nefarmakologických možností, sledovanie príznakov toxicity alebo úprava dávkovania liekov [82].

Liekové interakcie sa delia na dva druhy, a to na farmakodynamické a farmakokinetické. K farmakodynamickým interakciám dochádza vtedy, ak dve súčasne podávané liečivá majú aditívny alebo rušivý účinok na telo. Farmakodynamika popisuje vzťah medzi koncentráciou liečiva v mieste pôsobenia (typicky na receptore) a zodpovedajúcim účinkom, pričom práve kombinácia liekov môže mať za následok zmenu vo vzťahu dávka – odozva [83]. Typickým príkladom takejto interakcie je podanie warfarínu spolu s protizápalovými liekmi, pričom ich súbežne užívanie môže zvýšiť riziko krvácania [84].

Farmakokinetické interakcie sú charakterizované tým, že jeden z liekov ovplyvňuje absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo vylučovanie iného podávaného lieku [82]. Tento druh interakcií má spravidla aj farmakodynamický účinok a v súčasnosti k ich eliminácii napomáha software upozorňujúci lekára či lekárnik na potenciálne nežiadúce farmakokinetické interakcie pri predpisovaní liekov [83]. Typickým príkladom je spolužívanie teofylínu používaného pre liečbu respiračných ochorení a antibiotika

ciprofloxacínu, ktorý účinkuje ako inhibítor CYP1A2, čo zvyšuje riziko hospitalizácie z dôvodu toxicity teofylínu [84].

Najčastejším mechanizmom, pomocou ktorého dochádza ku klinicky významným liekovým interakciám, je inhibícia alebo indukcia cytochrómov P450 ako enzýmov, ktorých hlavnou úlohou je metabolizmus liekov a ostatných cudzorodých látok [82]. Lieky, ktoré interagujú s cytochrómami P450, sa delia do troch skupín na substráty, inhibítory a induktory [84]. Induktory sú látky, ktoré zvyšujú množstvo alebo aktivitu cytochrómu P450. Inhibítory majú opačný efekt a patria medzi najdôležitejšie látky z hľadiska liekových interakcií, keďže môžu viesť k zvýšenej koncentrácii liečiva v plazme, zvýšenej odozve na dávku alebo toxickému účinku [85].

Pravdepodobnosť akejkoľvek liekovej interakcie sa logicky zvyšuje v závislosti od počtu užívaných liekov a od toho, či aktivácia alebo eliminácia týchto liekov závisí na aktivite cytochrómov P450. Práve preto sa interakcie budú najčastejšie vyskytovať u ľudí užívajúcich veľké množstvo liekov, pričom do tejto skupiny patria hlavne starší pacienti, ľudia s psychiatrickými problémami alebo potrebou užívania antimikrobiálnych látok. Približne 93 % zo všetkých potenciálnych liekových interakcií u starších ľudí sprostredkovaných cytochrómom P450 možno pripísať súbežnému podávaniu liekov metabolizovaných izoformami CYP3A4 a CYP2D6, pričom až 70 % má na svedomí CYP3A4 [84].

Dôsledkom takéhoto vzájomného pôsobenia môže byť zvýšenie frekvencie a závažnosti nežiadúcich účinkov alebo zvýšenie pravdepodobnosti zlyhania liečby [81]. Skúmanie týchto interakcií a účinkov na organizmus prebieha najprv spôsobom *in vitro*. Problémom je, že systémy *in vitro* nemusia presne predpovedať účinok u pacientov s komplexným metabolizmom a mnohé z interakcií sú objavené až pri testoch *in vivo*. Pri testoch na ľuďoch je problémom to, že tieto interakcie sa vyskytujú len zriedka a na ich detekciu sú častokrát potrebné veľmi presné prístroje a štúdie, ktoré trvajú niekoľko rokov [85].

Dôležitú úlohu pri skúmaní liekových interakcií hrá aj geneticky polymorfizmus, vďaka ktorému pacienti disponujú rozdielnou aktivitou jednotlivých izoform cytochrómov P450 [85]. Približne 10 % ľudí so svetlou pokožkou chýba aktivita izoformy CYP2D6, zatiaľ čo 5-10 % ľudí so svetlou pokožkou disponuje zvýšenou aktivitou tejto izoformy [84].

2. Cieľ práce

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo štúdium vplyvu inhibítora tyrozínkináz lenvatinibu na aktivitu ľudských izoforiem cytochrómu P450, ktoré sú významné pre metabolizmus xenobiotík, *in vitro*.

Hlavné ciele bakalárskej práce:

- Optimalizácia metód separácie látok z reakčných zmesí pre stanovenie množstva vzniknutého produktu.
- Stanovenie aktivity ľudských izoforiem cytochrómu P450 CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2E1 a CYP3A4 v prítomnosti lenvatinibu.
- Určenie koncentrácie lenvatinibu spôsobujúcej 50% inhibíciu (IC_{50}) u výrazne inhibovaných ľudských izoforiem cytochrómu P450 zo SuperzómovTM.

3. Materiál a metódy

3.1 Použité chemikálie

Použité chemikálie v tejto bakalárskej práci pochádzajú z nasledujúcich zdrojov:

Cayman Chemicals, USA:

6 β -hydroxytestosterón

Fluka, Švajčiarsko:

testosterón

Gentest BD Bioscience, USA:

ľudské rekombinantné CYP1A1, CYP1B1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2E1 a CYP3A4 v Superzómoch™

Lach: Ner, ČR:

dihydrogénfosforečnan sodný, dimetylsulfoxid, etylacetát, hydrogénfosforečnan draselný, chlorid draselný, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, metanol, trihydrát octanu sodného

Lachema, ČR:

uhličitan sodný

Linde, ČR:

kvapalný dusík

Penta, ČR:

hydroxid draselný, kyselina o-fosforečná

Roche Diagnostics GmbH, Nemecko:

NADPH

Sigma-Aldrich, USA:

bupropi3n hydrochlorid, diklofenak, 7-etoxyresorufin, fenacet3n, N-fenylantranilov3 kyselina, gluk3za-6-fosf3t, gluk3za-6-fosf3tdehydrogen3za, (2S,3S)-hydroxybupropi3n hydrochlorid, 4'-hydroxydiklofenak, 7-metoxyresorufin, NADP⁺, resorufin, triprolid3n hydrochlorid, Tris-base

St3tn3 Zdravotn3 3řad v Praze, RNDr. Radka V3clav3kov3, Ph.D.:

6-hydroxychlorzoxaz3n, chlorzoxaz3n

VWR Chemicals, Franc3zsko:

metanol (HPLC), acetonitril (HPLC)

3.2 Použit3 pr3stroje

Analytick3 v3hy:

Precisa 40SM-200A, Pesa (Švaj3iarsko)

Discovery, Ohaus (USA)

Automatick3 pipety:

Automatick3 pipety, Eppendorf (Nemecko)

Automatick3 pipety Nichiryo, Nichipet ex (Japonsko)

Centrif3gy:

Centrif3ga 5418, uhlov3 rotor, Eppendorf (Nemecko)

Centrif3ga Z 383 K, v3kyvn3 rotor, Hermle Labortechnik (Nemecko)

Centrif3ga Allegra X-30, uhlov3 rotor F0630, Beckman Coulter (USA)

Ultracentrif3ga Optima XPN-90, uhlov3 rotor 45Ti, Beckman Coulter (USA)

Minicentrif3ga SpectrafugeTM, uhlov3 rotor, Labnet (USA)

Filtra3n3 zariadenie na mobilnej f3ze:

Millipore StericupTM filtration system, Sigma-Aldrich (USA)

Fluorimeter:

Infinite M200 PRO Multimode Microplate Reader, TECAN (Švaj3iarsko)

HPLC systém:

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

Autosampler: Automated Sample Injector ALS G1329A

Detektor: Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector (G4212A)

Pumpa: Agilent 1200 Series Quaternary Pump

Odplyňovač: Vákuový odplyňovač G1322

Termobox pro kolónu: LCO 101, ECOM (ČR)

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

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

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

Program: ChemStation Online 1

Inkubátor:

Thermomixer Compact, Eppendorf (Nemecko)

Magnetická miešačka:

C-MAG MS 4, IKA (Nemecko)

Variomag, Monotherm (Nemecko)

Predvážky:

EW 600-2M, Kern (Nemecko)

pH-meter:

pH meter ATI Orion 211 s kombinovanou elektródou, ATI Orion (USA)

pH meter HI2211-02, Hanna Instrument (USA)

Vákuová odparka:

CentriVap Benchtop vacuum concentrator, Labconco (USA)

Vortex:

MS1 Minishaker, IKA (Nemecko)

Vortex Mixer VX-200, Labnet (USA)

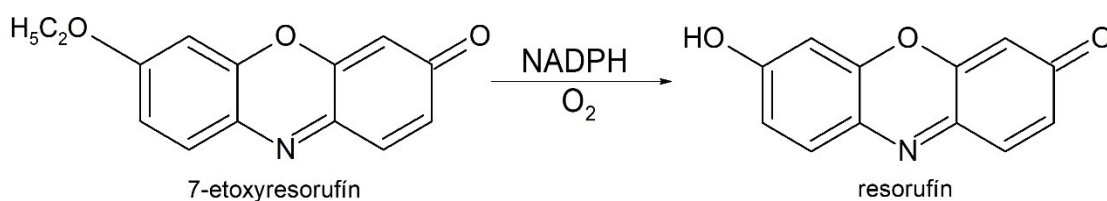
GV Lab, Gilson (USA)

3.3 Použité metódy

Viacere metódy použité na stanovenie aktivity jednotlivých izoform cytochrómu P450 boli prebrané a upravené z diplomovej práce Mgr. Barbory Otahálovej [86].

3.3.1 Stanovenie aktivity CYP1A1 a 1B1 – O-deetylácia 7-etoxyresorufínu

K stanoveniu aktivity ľudského cytochrómu P450 1A1 a 1B1 bola použitá markerová reakcia O-deetylácie 7-etoxyresorufínu [87]. Cytochrómy P450 1A1 a 1B1 katalyzujú premenu 7-etoxyresorufínu na produkt resorufín, ktorý je možné stanoviť fluorescenčne (obrázok 6).



Obr. 6: O-deetylácia 7-etoxyresorufínu – markerová reakcia CYP1A1, čiastočne aj CYP1B1 (vytvorené v programe ChemSketch).

Pre toto stanovenie bol použitý lenvatinib s koncentráciou 20 μM , 2 μM (koncentrácia, ktorá odpovedá koncentrácii substrátu 7-etoxyresorufínu) a 0 μM . Do vzoriek bez lenvatinibu bol pridaný rovnaký objem rozpúšťadla DMSO. Objem DMSO nepresahoval 1 % celkového objemu inkubačnej zmesi.

Stanovenie aktivity CYP1A1 a CYP1B1 bola prevedené v 4 paralelných meraniach. Pripravené boli inkubačné zmesi s objemom 200 μl a zložením:

- 0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,4)
- 2 μM 7-etoxyresorufín (zásobný roztok 0,4 mM v DMSO)
- lenvatinib s príslušnou koncentráciou (zásobný roztok v DMSO s 200x vyššou koncentráciou)
- 0,5 mM NADPH (5 mM zásobný roztok v pufrí)
- vhodne riedený ľudský CYP1A1 a CYP1B1 v Superzómoch™

Rekombinantné ľudské CYP1A1 a CYP1B1 v Superzómoch™ boli riedené fosfátovým pufrom tak, aby nárast fluorescencie spôsobený vznikom fluorescenčného

produktu resorufínu bol lineárny s časom. Vplyv lenvatinibu na ľudské cytochrómy P450 1A1 a 1B1 bol pozorovaný pri ich koncentrácii 5 pmol/ml alebo 2,5 pmol/ml.

V prvom prípade preinkubačná zmes pripravená pre 4 paralelné stanovenia obsahovala všetky zložky okrem NADPH a DMSO alebo lenvatinibu a bola preinkubovaná na termobloku 5 minút pri teplote 37 °C a 400 RPM (Thermomixer compact). Preinkubačná zmes bola pipetovaná po 179 µL do 4 jamiek mikrotitračnej doštičky. Do prvých dvoch jamiek bol pridaný 1 µL DMSO, do tretej 1 µL 0,4mM lenvatinibu a do štvrtej 1 µL 4mM lenvatinibu. Do prvej jamky, ktorá slúžila ako blank, bolo pridaných 20 µL pufru, v zvyšných troch jamkách bola reakcia zahájená pridaním 20 µL roztoku NADPH.

V druhom prípade obsahovala preinkubačná zmes pripravená pre 4 paralelné stanovenia iba pufr a cytochróm P450 1A1 alebo 1B1 a bola preinkubovaná na termobloku 3 minúty pri teplote 37 °C a 400 RPM (Thermomixer compact). Preinkubačná zmes bola pipetovaná po 178 µL do 4 jamiek mikrotitračnej doštičky. Do prvých dvoch jamiek bol pridaný 1 µL DMSO, do tretej 1 µL 0,4mM lenvatinibu a do štvrtej 1 µL 4mM lenvatinibu. Do prvej jamky, ktorá slúžila ako blank, bolo pridaných 20 µL pufru, do zvyšných troch 20 µL roztoku NADPH a následne boli zmesi inkubované vo fluorimetri 10 minút pri teplote 37 °C. Vo všetkých jamkách bola následne reakcia zahájená v 30-sekundových intervaloch pridaním 1 µL roztoku 7-etoxyresorufínu.

Intenzita fluorescencie bola meraná v 30-sekundových intervaloch po dobu 5 minút pri excitačnej vlnovej dĺžke 530 nm a emisnej vlnovej dĺžke 585 nm. Z nameraných hodnôt intenzity fluorescencie a kalibračnej priamky vyjadrujúcej závislosť intenzity fluorescencie na látkovom množstve resorufínu (0-160 pmol) bola vypočítaná aktivita CYP1A1 a CYP1B1 vyjadrená ako látkové množstvo vzniknutého produktu (resorufínu) za minútu na 1 mol enzýmu. V ďalšom kroku bola porovnaná aktivita CYP1A1 a CYP1B1 po pridaní lenvatinibu s aktivitou CYP1A1 a CYP1B1 po pridaní DMSO, ktorá predstavovala 100% aktivitu CYP1A1 a CYP1B1.

3.3.2 Stanovenie koncentrácie IC₅₀ ľudského CYP1B1

Pomocou *O*-deetylácie 7-etoxyresorufínu bol pozorovaný vplyv lenvatinibu na aktivitu ľudského CYP1B1 v SuperzómochTM. Pre toto stanovenie bol využitý lenvatinib s koncentráciou odpovedajúcou 35x; 30x; 25x; 10x; 5x; 2x; 1x; 0,5x; 0,2x a 0,1x koncentrácie substrátu. Paralelne bola meraná aktivita CYP1B1 bez prídavku lenvatinibu, kde bol miesto neho pridaný rovnaký objem rozpúšťadla DMSO.

Zloženie inkubačnej zmesi:

- 0,1 M KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7,4)
- 2 μM 7-etoxyresorufín (zásobný roztok 0,4 mM v DMSO)
- lenvatinib s príslušnou koncentráciou (zásobný roztok v DMSO s 200x vyššou koncentráciou)
- 0,5 mM NADPH (5 mM zásobný roztok v pufri)
- 5,0 pmol/ml cytochróm P450 1B1 (1 nmol/ml v SuperzómochTM)

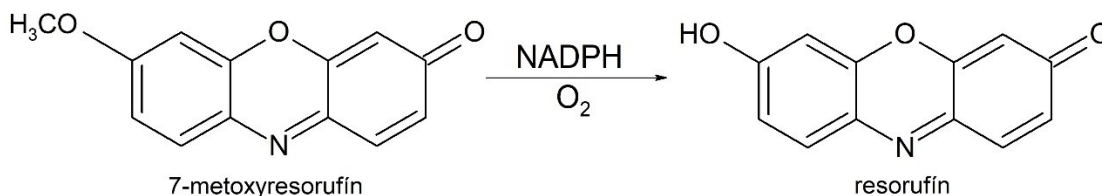
Postup bol analogický k meraniu aktivity CYP1B1 (strana 32 a 33). Intenzita fluorescence bola meraná 5 minút v intervaloch 30 sekúnd pri excitačnej vlnovej dĺžke 530 nm a emisnej vlnovej dĺžke 585 nm.

Zo získaných hodnôt intenzity fluorescence a kalibračnej priamky vyjadrujúcej závislosť intenzity fluorescence na látkovom množstve resorufínu (0-160 pmol) bola vypočítaná aktivita CYP1B1 vyjadrená ako látkové množstvo vzniknutého produktu (resorufínu) za 1 minútu na 1 mol enzýmu. V ďalšom kroku bola porovnaná aktivita CYP1B1 po pridaní lenvatinibu s aktivitou CYP1B1 po pridaní DMSO, ktorá predstavovala 100% aktivitu CYP1B1.

Z výsledných hodnôt aktivít CYP1B1 bola vytvorená závislosť percentuálnej aktivity CYP1B1 na logaritme koncentrácie lenvatinibu. Závislosť percentuálnej aktivity na logaritme koncentrácie bola preložená sigmoidnou krivkou popísanou rovnicou pre výpočet IC₅₀, pričom táto operácia bola prevedená v programe Origin 2016 (OriginLab, USA). Z tejto krivky bola odčítaná hodnota koncentrácie lenvatinibu odpovedajúca 50% inhibícií CYP1B1.

3.3.3 Stanovenie aktivity CYP1A2 – O-demetylácia 7-metoxoresorufínu

K stanoveniu aktivity ľudského cytochrómu P450 1A2 bola využitá markerová reakcia O-demetylácie 7-metoxoresorufínu (obrázok 7) [88].



Obr. 7: O-demetylácia 7-metoxoresorufínu – markerová reakcie CYP1A2 (vytvorené v programe ChemSketch).

Pre toto stanovenie bol použitý lenvatinib s koncentráciou 20 μM , 2 μM (koncentrácia, ktorá odpovedá koncentrácii substrátu 7-metoxoresorufínu) a 0 μM . Do vzoriek bez lenvatinibu bol pridaný rovnaký objem rozpúšťadla DMSO. Objem DMSO nepresahoval 1 % celkového objemu inkubačnej zmesi.

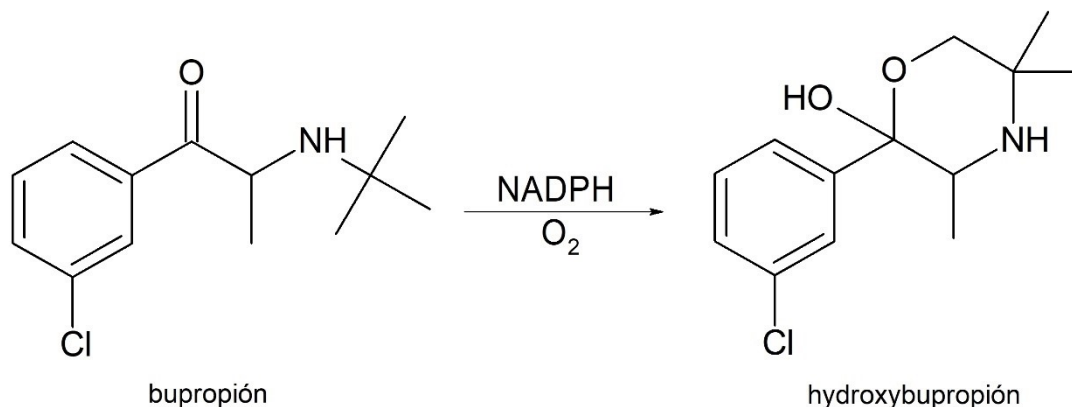
Stanovenie aktivity CYP1A2 bola prevedené v 4 paralelných meraniach. Pripravené boli inkubačné zmesi s objemom 200 μl a zložením:

- 0,1 M KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7,4)
- 2 μM 7-metoxoresorufín (zásobný roztok 0,4 mM v DMSO)
- lenvatinib s príslušnou koncentráciou (zásobný roztok v DMSO s 200x vyššou koncentráciou)
- 0,5 mM NADPH (5 mM zásobný roztok v pufrí)
- vhodne riedený ľudský CYP1A2 v SuperzómochTM

Postup bol analogický k meraniu aktivity CYP1A1 na stranách 32 a 33 okrem použitého substrátu, ktorým bol 7-metoxoresorufín. V prvom prípade bola reakcia naštartovaná pridaním roztoku NADPH, v druhom pridaním roztoku substrátu. V oboch prípadoch bol pozorovaný vplyv lenvatinibu na aktivitu ľudských cytochrómov P450 CYP1A2 pri ich koncentrácii 5 pmol/ml, aby nárast fluorescence spôsobený vznikom fluorescenčného produktu resorufínu bol lineárny s časom.

3.3.4 Stanovenie aktivity CYP2B6 – hydroxylácia bupropiónu

Pre stanovenie aktivity ľudského cytochrómu P450 2B6 bola použitá markerová reakcia hydroxylácie bupropiónu (obrázok 8). V rámci tejto bakalárskej práce bola metóda optimalizovaná pre separáciu lenvatinibu podľa metódy Hessa 2000 [89].



Obr. 8: Hydroxylácia bupropiónu – markerová reakcia CYP2B6 (vytvorené v programe ChemSketch).

Reakčná zmes s celkovým objemom 250 μ l bola pripravená v tripletoch s nasledujúcim zložením:

- 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,4)
- 80 μ M bupropión (zásobný roztok 8 mM v dH_2O)
- lenvatinib s príslušnou koncentráciou (zásobný roztok v DMSO s 100x vyššou koncentráciou)
- 1 mM NADPH-generujúci systém – NADPH-GS (zásobný roztok: 10 mM NADP^+ , 100 mM D-glukóza-6-fosfát, 10 U/ml D-glukóza-6-fosfátdehydrogenáza, 100 mM $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- 10 pmol ľudského cytochrómu P450 2B6 v SuperzómochTM

K tomuto stanoveniu bol použitý lenvatinib s koncentráciou 80 μ M (koncentrácia, ktorá odpovedá koncentrácii substrátu bupropiónu) a 0 μ M. Do vzoriek bez lenvatinibu bol pridaný rovnaký objem rozpúšťadla DMSO. Objem DMSO pri tom nepresahoval 1 % celkového objemu inkubačnej zmesi.

Okrem reakčných zmesí, ktoré obsahovali rôzne koncentrácie lenvatinibu, boli pripravené aj 3 kontrolné reakčné zmesi. Prvá reakčná zmes neobsahovala lenvatinib a NADPH-GS, druhá neobsahovala bupropión a tretia CYP2B6 spolu s lenvatinibom.

Preinkubačné zmesi obsahovali všetky zložky okrem NADPH-GS a boli preinkubované 5 minút pri teplote 37 °C. Po preinkubácii bola reakcia zahájená prídavkom 25 µl NADPH-GS. Vzorky boli inkubované 20 minút pri teplote 37 °C a 400 RPM (Thermomixer Compact) za prístupu vzduchu. Reakcia bola zastavená prídavkom 50 µl 1M HCl a vzorky boli 10 sekúnd vortexované. V ďalšom kroku bolo do reakčnej zmesi pridaných 10 µl 1,25mM triprolidínu (v dH₂O) ako vnútorného štandardu. Po intenzívnom trepaní (30 sekúnd, 1400 RPM) boli vzorky centrifugované pri 13 900 RPM (Eppendorf 5418) po dobu 10 minút. Nakoniec boli supernatanty odobraté do vialiek a pripravené na analýzu.

Ďalších 9 vzoriek (3 x 0 µM lenvatinib, 3 x 80 µM lenvatinib a 3 kontroly) bolo pripravených rovnakým spôsobom, avšak preinkubačné zmesi obsahujúce všetky zložky okrem bupropiónu boli preinkubované po dobu 10 minút pri teplote 37 °C. Po 10 minútach preinkubácie bola reakcia zahájená pridaním 2,5 µl zásobného roztoku bupropiónu.

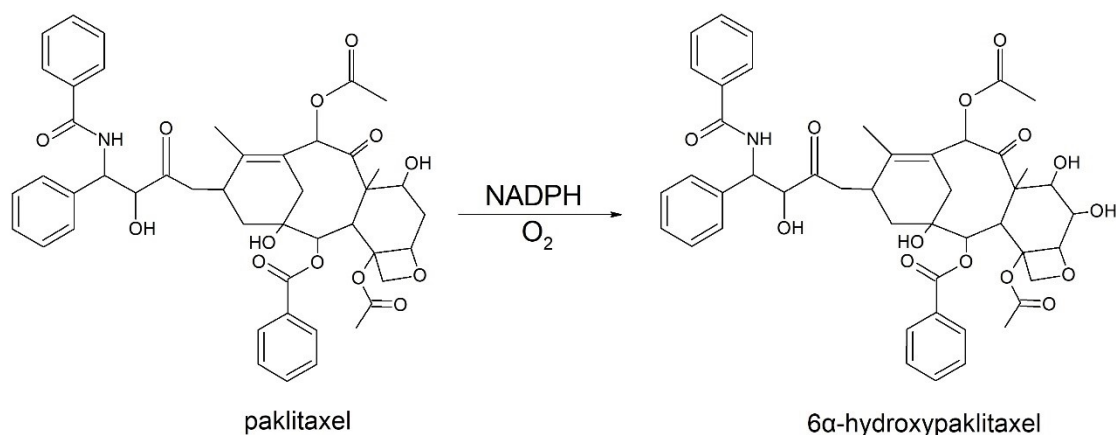
Separácia hydroxybupropiónu vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou

Hydroxybupropión, metabolit burpopiónu, ktorý vzniká enzýmovou reakciou v inkubačných zmesiach, bol separovaný a kvantifikovaný metódou HPLC s izokratickou elúciou po dobu 20 minút. Mobilná fáza bola zložená z 50mM KH₂PO₄ (pH 2,8, upravené HCl) a acetonitrilu v pomere 81:19. Separácia bola vykonaná na kolóne Nucleosil 250×4 mm, C₁₈, 100-5, HD pri laboratórnej teplote s konštantou prietokovou rýchlosťou 1,0 ml/min, pričom nástrek na kolónu predstavoval 60 µl supernatantu. Hydroxybupropión bol detekovaný pri vlnovej dĺžke 214 nm a kvantifikovaný vzťahnutím jeho plochy píku k ploche píku vnútorného štandardu (triprolidín).

Vyhodnotenie bolo vykonané pomocou použitia päťbodovej kalibračnej priamky s rozsahom 5 – 60 µM hydroxybupropiónu, pričom plochy píkov boli opäť vzťahnuté k ploche píku vnútorného štandardu (triprolidín). Z výsledných hodnôt bolo pre každú inkubačnú zmes vypočítané látkové množstvo vzniknutého hydroxybupropiónu za minútu na mol enzýmu. Aktivita CYP2B6 po pridaní lenvatinibu bola porovnávaná s aktivitou CYP2B6 po pridaní DMSO, pričom táto aktivita predstavovala 100% aktivitu CYP2B6.

3.3.5 Stanovenie aktivity CYP2C8 – 6 α -hydroxylácia paklitaxelu

Pre stanovenie aktivity ľudského cytochrómu P450 2C8 bola použitá markerová reakcia 6 α -hydroxylácie paklitaxelu (obrázok 9). V rámci tejto bakalárskej práce museli byť podmienky pre separáciu lenvatinibu na HPLC optimalizované podľa metódy Rodríguez-Antona 2007 [90].



Obr. 9: 6 α -hydroxylácia paklitaxelu – markerová reakcia CYP2C8 (vytvorené v programe ChemSketch).

Reakčná zmes s celkovým objemom 250 μ l bola pripravená v triploch s nasledujúcim zložením:

- 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,4)
- 20 μM paklitaxel (zásobný roztok 4 mM v DMSO)
- lenvatinib s príslušnou koncentráciou (zásobný roztok v DMSO s 200x vyššou koncentráciou)
- 1 mM NADPH-generujúci systém – NADPH-GS (zásobný roztok: 10 mM NADP^+ , 100 mM D-glukóza-6-fosfát, 10 U/ml D-glukóza-6-fosfátdehydrogenáza, 100 mM $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- 10 pmol ľudského cytochrómu P450 2C8 v SuperzómochTM

K tomuto stanoveniu bol použitý lenvatinib s koncentráciou 20 μM (koncentrácia, ktorá odpovedá koncentrácii substrátu paklitaxelu) a 0 μM . Do vzoriek bez lenvatinibu bol pridaný rovnaký objem rozpúšťadla DMSO. Objem DMSO pri tom nepresahoval 1 % celkového objemu inkubačnej zmesi.

Okrem reakčných zmesí, ktoré obsahovali rôzne koncentrácie lenvatinibu, boli pripravené aj 3 kontrolné reakčné zmesi. Prvá reakčná zmes neobsahovala NADPH-GS a lenvatinib, druhá paklitaxel a tretia CYP2C8 a lenvatinib.

Preinkubačné zmesi boli preinkubované 5 minút pri teplote 37 °C, pričom obsahovali všetky zložky okrem NADPH-GS. Po preinkubácii bola reakcia zahájená prídavkom 25 µl NADPH-GS. Vzorky boli inkubované 20 minút pri teplote 37 °C a 400 RPM (Thermomixer Compact) za prístupu vzduchu. Reakcia bola zastavená prídavkom 1,5 ml etylacetátu a vzorky boli 10 sekúnd vortexované. V ďalšom kroku bolo do reakčnej zmesi pridaných 5 µl 0,5mM docetaxelu (v DMSO) ako vnútorného štandardu. Po intenzívnom trepaní (3 minúty, 1400 RPM) boli vzorky centrifugované pri 13 900 RPM (Eppendorf 5418) po dobu 10 minút. Organická fáza bola odobratá do vialky a odparená dosucha vo vákuovej odparke. Extrakcia bola prevedená dvakrát. Pred separáciou na HPLC boli odparky rozpustené v 40 µl metanolu.

Ďalších 7 vzoriek (3 x 0 µM lenvatinib, 3 x 20 µM lenvatinib a 1 kontrola bez CYP) bolo pripravených rovnakým spôsobom, avšak preinkubačné zmesi boli preinkubované po dobu 10 minút pri teplote 37 °C a obsahovali všetky zložky okrem paklitaxelu. Po 10 minútach preinkubácie bola reakcia zahájená pridaním 1,25 µl zásobného roztoku paklitaxelu.

Separácia 6α-hydroxypaklitaxelu vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou

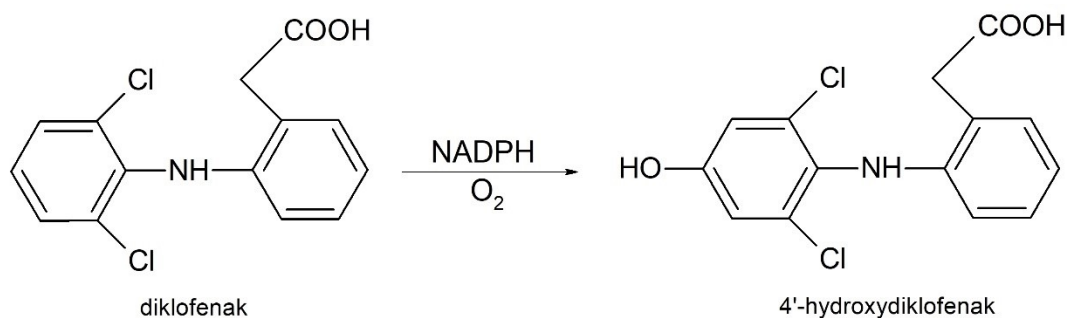
6α-hydroxypaklitaxel, metabolit paklitaxelu, ktorý vzniká enzýmovou reakciou v inkubačných zmesiach, bol separovaný a kvantifikovaný metódou HPLC s izokratickou elúciou po dobu 60 minút. Mobilná fáza bola zložená z metanolu a ultračistej vody v pomere 60:40. Separácia bola vykonaná na kolóne Nucleosil 250×4 mm, C₁₈, 100-5, HD pri laboratórnej teplote s konštantou prietokovou rýchlosťou 0,7 ml/min, pričom nástrek na kolónu predstavoval 20 µl. 6α-hydroxypaklitaxel bol detekovaný pri vlnovej dĺžke 230 nm a kvantifikovaný vzťahnutím plochy jeho píku k ploche píku vnútorného štandardu (docetaxel).

Vyhodnotenie bolo vykonané pomocou použitia päťbodovej kalibračnej priamky s rozsahom 10 – 60 µM 6α-hydroxypaklitaxelu, pričom plochy píkov boli opäť vzťahnuté k ploche píku vnútorného štandardu (docetaxel). Z výsledných hodnôt bolo pre každú inkubačnú zmes vypočítané látkové množstvo vzniknutého 6α-hydroxypaklitaxelu za minútu na mol enzýmu. Aktivita CYP2C8 po pridaní lenvatinibu bola porovnávaná

s aktivitou CYP2C8 po pridaní DMSO, pričom táto aktivita predstavovala 100% aktivitu CYP2C8.

3.3.6 Stanovenie aktivity CYP2C9 – 4'-hydroxylácia diklofenaku

Pre stanovenie aktivity ľudského cytochrómu P450 2C9 bola použitá markerová reakcia 4'-hydroxylácia diklofenaku (obrázok 10). V rámci tejto bakalárskej práce bola metóda optimalizovaná pre separáciu lenvatinibu podľa metódy Schmidta 2018 [91].



Obr. 10: 4'-hydroxylácia diklofenaku – markerová reakcia CYP2C9 (vytvorené v programe ChemSketch).

Reakčná zmes s celkovým objemom 500 μ l bola pripravená v tripletoch s nasledujúcim zložením:

- 0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,4)
- 50 μ M diklofenak (zásobný roztok 10 mM v DMSO)
- lenvatinib s príslušnou koncentráciou (zásobný roztok v DMSO s 200x vyššou koncentráciou)
- 1 mM NADPH-GS (zásobný roztok: 10 mM NADP^+ , 100 mM D-glukóza-6-fosfát, 10 U/ml D-glukóza-6-fosfátdehydrogenáza, 100 mM $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- 20 pmol ľudského cytochrómu P450 2C9 v SuperzómochTM

K tomuto stanoveniu bol použitý lenvatinib s koncentráciou 50 μ M (koncentrácia, ktorá odpovedá koncentrácii substrátu diklofenaku) a 0 μ M. Do vzoriek bez lenvatinibu bol pridaný rovnaký objem rozpúšťadla DMSO. Objem DMSO pri tom nepresahoval 1 % celkového objemu inkubačnej zmesi.

Okrem reakčných zmesí, ktoré obsahovali rôzne koncentrácie lenvatinibu, boli pripravené aj 3 kontrolné reakčné zmesi. Prvá reakčná zmes neobsahovala lenvatinib a NADPH-GS, v druhej bola reakcia ihneď zastavená pridaním 100 μ l ľadového 100% acetonitrilu a vortexovaná a tretia neobsahovala CYP spolu s lenvatinibom.

Preinkubačné zmesi boli preinkubované 5 minút pri teplote 37 °C a obsahovali všetky zložky okrem NADPH-GS. Po preinkubácii bola reakcia zahájená prídavkom 50 μ l NADPH-GS. Vzorky boli inkubované 15 minút pri teplote 37 °C a 400 RPM (Thermomixer Compact) za prístupu vzduchu. Reakcia bola zastavená prídavkom 100 μ l ľadového 100% acetonitrilu a vzorky boli 10 sekúnd vortexované. V ďalšom kroku bolo do reakčnej zmesi pridaných 5 μ l 1mM *N*-fenylantranilovej kyseliny (v metanole) ako vnútorného štandardu a 1 ml etylacetátu. Po intenzívnom trepaní (3 minúty, 1400 RPM) boli vzorky centrifugované pri 13 900 RPM (Eppendorf 5418) po dobu 5 minút. Organická fáza bola odobratá do vialky a odparená dosucha vo vákuovej odparke. Extrakcia bola prevedená dvakrát. Pred separáciou na HPLC boli odparky rozpustené v 40 μ l metanolu.

Ďalších 9 vzoriek (3 x 0 μ M lenvatinib, 3 x 50 μ M lenvatinib a 3 kontroly) bolo pripravených rovnakým spôsobom, avšak preinkubačné zmesi boli preinkubované po dobu 10 minút pri teplote 37 °C a obsahovali všetky zložky okrem diklofenaku. Po 10 minútach preinkubácie bola reakcia zahájená pridaním 2,5 μ l zásobného roztoku diklofenaku.

Separácia 4'-hydroxydiklofenaku vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou

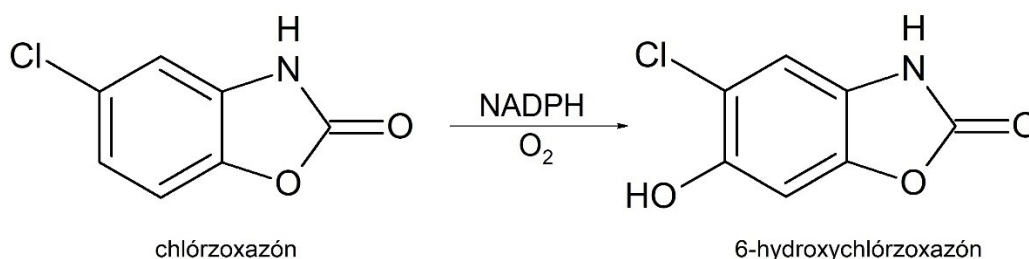
4'-hydroxydiklofenak, metabolit diklofenaku, ktorý vzniká enzýmovou reakciou katalyzovanou CYP2C9 v inkubačných zmesiach, bol separovaný a kvantifikovaný metódou HPLC s izokratickou elúciou po dobu 40 minút. Mobilná fáza bola zložená z metanolu a 0,1% (v/v) kyseliny octovej v pomere 62:38. Separácia bola prevedená na kolóne Nucleosil 250 \times 4 mm, C₁₈, 100-5, HD pri laboratórnej teplote s konštantou prietokovou rýchlosťou 0,6 ml/min. Nástrek na kolónu činil 20 μ l. 4'-hydroxydiklofenak bol detekovaný pri vlnovej dĺžke 272 nm a kvantifikovaný vzťahnutím plochy jeho píku k ploche píku vnútorného štandardu (*N*-fenylantranilová kyselina).

Vyhodnotenie bolo vykonané pomocou použitia päťbodovej kalibračnej priamky s rozsahom 5 – 200 μ M 4'-hydroxydiklofenaku, pričom plochy píkov boli opäť vzťahnuté k ploche píku vnútorného štandardu (*N*-fenylantranilová kyselina). Z výsledných hodnôt

bolo pre každú inkubačnú zmes vypočítané látkové množstvo vzniknutého 4'-hydroxydiklofenaku za minútu na mol enzýmu. Aktivita CYP2C9 po pridaní lenvatinibu bola porovnávaná s aktivitou CYP2C9 po pridaní DMSO, pričom táto aktivita predstavovala 100% aktivitu CYP2C9.

3.3.7 Stanovenie aktivity CYP2E1 – 6-hydroxylácia chlorzoxazónu

K stanoveniu aktivity ľudského cytochrómu P450 2E1 bola použitá markerová reakcia 6-hydroxylácia chlorzoxazónu (obrázok 11). V rámci tejto bakalárskej práce bolo potrebné upraviť podmienky pre separáciu lenvatinibu na HPLC podľa metódy Petera 1990 [92].



Obr. 11: 6-hydroxylácia chlorzoxazónu – markerová reakcia CYP2E1 (vytvorené v programe ChemSketch).

Reakčná zmes s celkovým objemom 500 μl bola pripravená v tripletoch s nasledujúcim zložením:

- 50 mM Tris/HCl, 150 mM KCl, pH 7,4
- 80 μM chlorzoxazón (zásobný roztok 20 mM v DMSO)
- lenvatinib s príslušnou koncentráciou (zásobný roztok v DMSO s 250x vyššou koncentráciou)
- 1 mM NADPH-GS (zásobný roztok: 10 mM NADP⁺, 100 mM D-glukóza-6-fosfát, 10 U/ml D-glukóza-6-fosfátdehydrogenáza, 100 mM MgCl₂·H₂O)
- 20 pmol ľudského cytochrómu P450 2E1 v Superzómoch™

K tomuto stanoveniu bol použitý lenvatinib s koncentráciou 80 μM (koncentrácia, ktorá odpovedá koncentrácii substrátu chlorzoxazónu) a 0 μM . Do vzoriek bez

lenvatinibu bol pridaný rovnaký objem rozpúšťadla DMSO. Objem DMSO pri tom nepresahoval 0,8 % celkového objemu inkubačnej zmesi.

Okrem reakčných zmesí, ktoré obsahovali rôzne koncentrácie lenvatinibu, boli pripravené aj 3 kontrolné reakčné zmesi. Prvá reakčná zmes neobsahovala NADPH-GS a lenvatinib, v druhej bola reakcia ihneď zastavená pridaním 25 μ l 43% H_3PO_4 a vortexovaná 10 sekúnd a tretia neobsahovala cytochróm P450 a lenvatinib.

Preinkubačné zmesi obsahujúce všetky zložky okrem NADPH-GS boli preinkubované 5 minút pri teplote 37 °C. Po preinkubácii bola reakcia zahájená prídavkom 50 μ l NADPH-GS. Vzorky boli inkubované 15 minút pri teplote 37 °C a 400 RPM (Thermomixer Compact) za prístupu vzduchu. Reakcia bola zastavená prídavkom 25 μ l 43% H_3PO_4 a vzorky boli 10 sekúnd vortexované. V ďalšom kroku bolo do reakčnej zmesi pridaných 5 μ l 1mM fenacetínu (v metanole) ako vnútorného štandardu a 1 ml etylacetátu. Po intenzívnom trepaní (3 minúty, 1400 RPM) boli vzorky centrifugované pri 13 900 RPM (Eppendorf 5418) po dobu 5 minút. Organická fáza bola odobratá do vialky a odparená dosucha vo vákuovej odparke. Extrakcia bola prevedená dvakrát. Pred separáciou na HPLC boli odparky rozpustené v 30 μ l metanolu.

Ďalších 9 vzoriek (3 x 0 μ M lenvatinib, 3 x 50 μ M lenvatinib a 3 kontroly) bolo pripravených rovnakým spôsobom, avšak preinkubačné zmesi boli preinkubované po dobu 10 minút pri teplote 37 °C a obsahovali všetky zložky okrem chlorzoxazónu. Po 10 minútach preinkubácie bola reakcia zahájená pridaním 2 μ l zásobného roztoku chlorzoxazónu.

Separácia 6-hydroxychlorzoxazónu vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou

6-hydroxychlorzoxazón, metabolit chlorzoxazónu, ktorý vzniká enzýmovou reakciou katalyzovanou CYP2E1 v inkubačných zmesiach, bol separovaný a kvantifikovaný metódou HPLC s gradientovou elúciou po dobu 35 minút podľa tabuľky 1 na strane 44. Mobilnou fázou A bol 47% metanol a mobilnou fázou B bol 80% metanol. Separácia bola prevedená na kolóne Nucleosil 250 \times 4 mm, C_{18} , 100-5, pri teplote 35 °C s konštantou prietokovou rýchlosťou 0,5 ml/min. Nástrek na kolónu činil 20 μ l. 6-hydroxychlorzoxazón bol detekovaný pri vlnovej dĺžke 287 nm a kvantifikovaný vzťahnutím jeho plochy píku k ploche píku vnútorného štandardu (fenacetín).

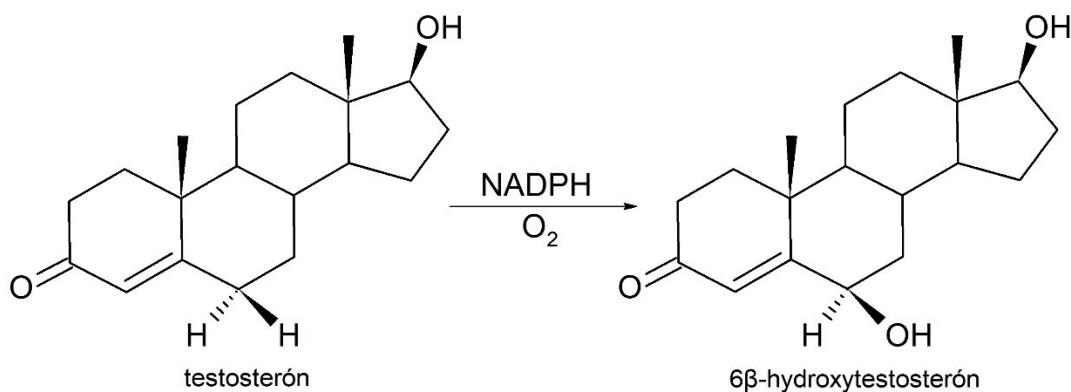
Tabuľka 1: Gradientová elúcia separácie 6-hydroxychlorzoxazónu. Mobilná fáza A – 47% metanol, mobilná fáza B – 80% metanol.

Čas (min)	Mobilná fáza A	Mobilná fáza B
0:00	100 %	0 %
21:00	100 %	0 %
21:30	0 %	100 %
27:00	0 %	100 %
27:30	100 %	0 %
35:00	100 %	0 %

Vyhodnotenie bolo vykonané pomocou použitia päťbodovej kalibračnej priamky s rozsahom 10 – 60 μ M 6-hydroxychlorzoxazónu, pričom plochy píkov boli opäť vzťahované k ploche píku vnútorného štandardu (fenacetín). Z nameraných hodnôt bolo pre každú inkubačnú zmes vypočítané látkové množstvo vzniknutého 6-hydroxychlorzoxazónu za minútu na mol enzýmu. Aktivita CYP2E1 po pridaní lenvatinibu bola porovnávaná s aktivitou CYP2E1 po pridaní DMSO, pričom táto aktivita predstavovala 100% aktivitu CYP2E1.

3.3.8 Stanovenie aktivity CYP3A4 – 6β-hydroxylácia testosterónu

Pre stanovenie aktivity ľudského cytochrómu P450 3A4 bola použitá markerová reakcia 6β-hydroxylácie testosterónu (obrázok 12) [93].



Obr. 12: 6β-hydroxylácia testosterónu – markerová reakcia CYP3A4 (vytvorené v programe ChemSketch).

Reakčná zmes s celkovým objemom 500 μl bola pripravená v tripletoch s nasledujúcim zložením:

- 0,1 M KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7,4)
- 50 μM testosterón (zásobný roztok 10 mM v metanole)
- lenvatinib s príslušnou koncentráciou (zásobný roztok v DMSO s 200x vyššou koncentráciou)
- 1 mM NADPH-GS (zásobný roztok: 10 mM NADP⁺, 100 mM D-glukóza-6-fosfát, 10 U/ml D-glukóza-6-fosfátdehydrogenáza, 100 mM MgCl₂·H₂O)
- 20 pmol ľudského cytochrómu P450 3A4 v Superzómoch™

K tomuto stanoveniu bol použitý lenvatinib s koncentráciou 50 μM (koncentrácia, ktorá odpovedá koncentrácii substrátu testosterónu) a 0 μM. Do vzoriek bez lenvatinibu bol pridaný rovnaký objem rozpúšťadla DMSO. Objem organických rozpúšťadiel pri tom nepresahoval 1 % celkového objemu inkubačnej zmesi.

Okrem reakčných zmesí, ktoré obsahovali rôzne koncentrácie lenvatinibu, boli pripravené aj 3 kontrolné reakčné zmesi. Prvá reakčná zmes neobsahovala NADPH-GS a lenvatinib, v druhej bola reakcia ihneď zastavená pridaním 100 μl 1M Na₂CO₃/2M NaCl

a vortexovaná po dobu 10 sekúnd a tretia neobsahovala cytochróm P450 a lenvatinib.

Preinkubačné zmesi obsahovali všetky zložky okrem NADPH-GS a boli preinkubované 5 minút pri teplote 37 °C. Po preinkubácii bola reakcia zahájená prídavkom 50 µl NADPH-GS. Vzorky boli inkubované 15 minút pri teplote 37 °C a 400 RPM (Thermomixer Compact) za prístupu vzduchu. Reakcia bola zastavená prídavkom 100 µl 1M Na₂CO₃/2M NaCl a vzorky boli 10 sekúnd vortexované. V ďalšom kroku bolo do reakčnej zmesi pridaných 5 µl 1mM fenacetínu (v metanole) ako vnútorného štandardu a 1 ml etylacetátu. Po intenzívnom trepaní (3 minúty, 1400 RPM) boli vzorky centrifugované pri 13 900 RPM (Eppendorf 5418) po dobu 5 minút. Organická fáza bola odobratá do vialky a odparená dosucha vo vákuovej odparke. Extrakcia bola prevedená dvakrát. Pred separáciou na HPLC boli odparky rozpustené v 30 µl metanolu.

Ďalších 9 vzoriek (3 x 0 µM lenvatinib, 3 x 50 µM lenvatinib a 3 kontroly) bolo pripravených rovnakým spôsobom, avšak preinkubačné zmesi obsahovali všetky zložky okrem testosterónu a boli preinkubované po dobu 10 minút pri teplote 37 °C. Po 10 minútach preinkubácie bola reakcia zahájená pridaním 2,5 µl zásobného roztoku testosterónu.

Separácia 6β-hydroxytestosterónu vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou

6β-hydroxytestosterón, metabolit testosterónu, ktorý vzniká enzýmovou reakciou katalyzovanou CYP3A4 v inkubačných zmesiach, bol separovaný a kvantifikovaný metódou HPLC s lineárnou gradientovou elúciou po dobu 35 minút podľa tabuľky 2. Mobilnou fázou A bol 50% metanol a mobilnou fázou B bol 75% metanol.

Tabuľka 2: Gradientová elúcia separácie 6β-hydroxytestosterónu. Mobilná fáza A – 50% metanol, mobilná fáza B – 75% metanol.

Čas (min)	Mobilná fáza A	Mobilná fáza B
00:00	100 %	0 %
27:00	0 %	100 %
30:00	100 %	0 %
35:00	100 %	0 %

Separácia bola prevedená na kolóne Nucleosil 250×4 mm, C₁₈, 100-5, HD pri teplote 35 °C s konštantou prietokovou rýchlosťou 0,6 ml/min. Nástrek na kolónu činil 20 µl. 6β-hydroxytestosterón bol detekovaný pri vlnovej dĺžke 254 nm a kvantifikovaný vzťahnutím jeho plochy píku k ploche píku vnútorného štandardu (fenacetín).

Vyhodnotenie bolo vykonané pomocou použitia päťbodovej kalibračnej priamky s rozsahom 10 – 300 µM 6β-hydroxytestosterónu, pričom plochy pík boli opäť vzťahnuté k ploche píku vnútorného štandardu. Z výsledných hodnôt bolo pre každú inkubačnú zmes vypočítané látkové množstvo vzniknutého 6β-hydroxytestosterónu za minútu na mol enzýmu. Aktivita CYP3A4 po pridaní lenvatinibu bola porovnávaná s aktivitou CYP3A4 po pridaní DMSO, pričom táto aktivita predstavovala 100% aktivitu CYP3A4.

4. Výsledky

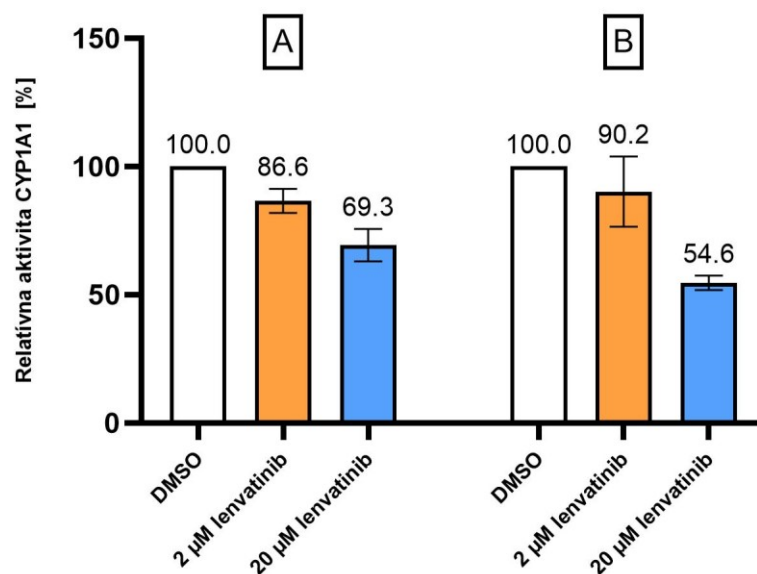
Aktivita ľudských izoforiem cytochrómu P450 1A1, 1A2, 1B1, 2B6, 2C8, 2C9, 2E1 a 3A4 v SuperzómochTM bola stanovená pomocou markerových reakcií, ktoré tieto izoformy zabezpečujú. Aktivita cytochrómu P450 pri pridaní lenvatinibu bola porovnaná s jeho aktivitou v reakčných zmesiach, ktoré namiesto lenvatinibu obsahovali iba rozpúšťadlo DMSO. Na základe toho bol stanovený vplyv lenvanitibu na aktivitu jednotlivých izoforiem ľudského cytochrómu P450, pričom jednotlivé merania boli vykonané pri koncentrácii lenvatinibu, ktorá odpovedala koncentrácii substrátu alebo pri koncentrácii 10-násobne vyššej oproti koncentrácii substrátu.

Merania boli prevedené dvoma spôsobmi. Pri prvej skupine meraní, ktorá je v grafoch označená písmenom A, obsahovala preinkubačná zmes všetky zložky okrem NADPH alebo NADPH-GS. Po 5-minútovej preinkubácii bola reakcia naštartovaná prídavkom NADPH alebo NADPH-GS, pričom NADPH slúži ako kofaktor cytochrómu P450.

V druhej skupine, ktorá je v grafoch označená písmenom B, obsahovala preinkubačná zmes všetky zložky okrem substrátu, pričom čas preinkubácie bol v tomto prípade predĺžený o 5 minút oproti skupine A. V ďalšom kroku bola reakcia naštartovaná prídavkom substrátu. Toto usporiadanie pokusu slúžilo k sledovaniu možného vplyvu prípadných metabolitov lenvatinibu na aktivitu cytochrómu P450, takže na odhalenie ireverzibilnej inhibície závislej na mechanizme reakcie. Takýto metabolický účinok by bolo možné pozorovať ako odlišnú zmenu aktivity cytochrómu P450 v prítomnosti lenvatinibu v skupine B oproti zmene aktivity v skupine A pri rovnakej koncentrácii lenvatinibu.

4.1 Vplyv lenvatinibu na aktivitu CYP1A1

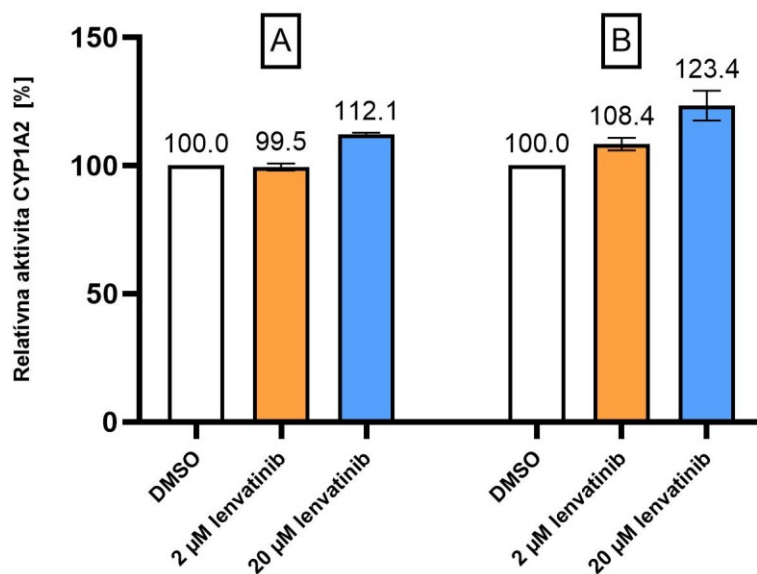
Aktivita ľudského CYP1A1 bola stanovená pomocou markerovej reakcie *O*-deetylácie 7-etoxyresorufínu, ktorú táto izoforma zabezpečuje [87]. Zmena aktivity CYP1A1 bola sledovaná pri koncentrácii lenvatinibu rovnkej koncentrácii substrátu (2 μM) a koncentrácii 10-násobne vyššej (20 μM). Aktivita bola porovnávaná so vzorkami obsahujúcimi iba rozpúšťadlo DMSO. Pri naštartovaní reakcie prídavkom NADPH nedošlo takmer k žiadnej zmene aktivity pri koncentrácii lenvatinibu rovnkej koncentrácii substrátu, zatiaľ čo pri koncentrácii lenvatinibu 10-násobne vyššej došlo k miernemu poklesu aktivity. Pri naštartovaní reakcie substrátom sa aktivita CYP1A1 pri koncentrácii lenvatinibu rovnkej koncentrácii substrátu taktiež nezmenila a k výraznejšiemu poklesu aktivity takmer na 50 % došlo pri koncentrácii 10-násobne vyššej (obrázok 13).



Obr. 13: Vplyv lenvatinibu na aktivitu ľudského CYP1A1 v Superzómoch™, ktorý bol stanovený pomocou *O*-deetylácie 7-etoxyresorufínu. Koncentrácia substrátu (7-etoxyresorufín) bola 2 μM , lenvatinib bol pridaný v rovnakej a 10-násobne vyššej koncentrácii (2 μM a 20 μM). A) naštartovanie reakcie NADPH. B) naštartovanie reakcie prídavkom substrátu. Výsledky sú priemerom a smerodajnými odchýlkami 4 meraní. Aktivita CYP1A1 pri pridaní lenvatinibu bola porovnaná s aktivitou tejto izoformy bez pridaného lenvatinibu (DMSO).

4.2 Vplyv lenvatinibu na aktivitu CYP1A2

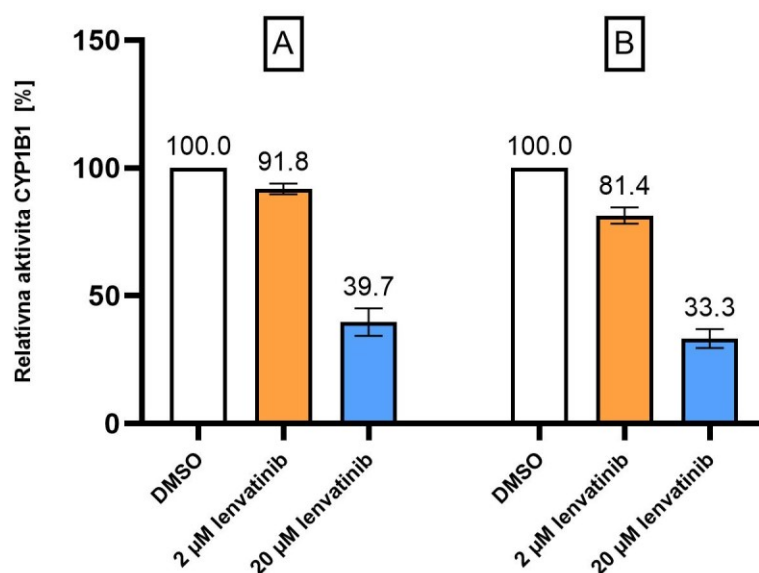
Markerová reakcia *O*-demetylácie 7-metoxyresorufínu, ktorú zabezpečuje ľudský CYP1A2, slúžila na stanovenie aktivity tejto izoformy [88]. Ani v jednom prípade prevedenia experimentu neboli pozorované významné zmeny pri koncentrácii lenvatinibu rovnkej koncentrácii substrátu a ani pri koncentrácii 10-násobne vyššej (obrázok 14).



Obr. 14: Vplyv lenvatinibu na aktivitu ľudského CYP1A2 v Superzómoch™, ktorý bol stanovený pomocou *O*-demetylácie 7-metoxyresorufínu. Koncentrácia substrátu (7-metoxyresorufín) bola 2 µM, lenvatinib bol pridaný v rovnakej a 10-násobne vyššej koncentrácii (2 µM a 20 µM). A) naštartovanie reakcie NADPH. B) naštartovanie reakcie prídavkom substrátu. Výsledky sú priemerom a smerodajnými odchýlkami 3 meraní. Aktivita CYP1A2 pri pridaní lenvatinibu bola porovnaná s aktivitou tejto izoformy bez pridaného lenvatinibu (DMSO).

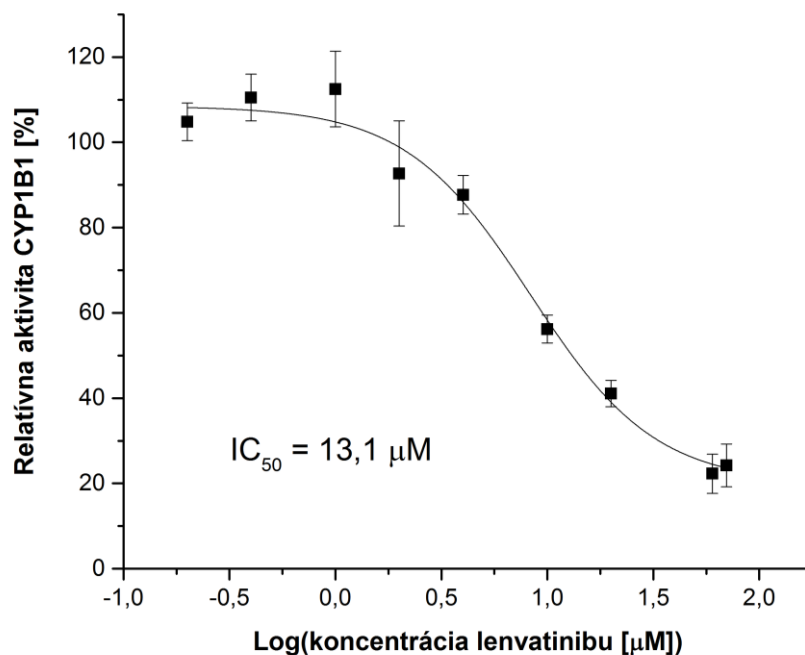
4.3 Vplyv lenvatinibu na aktivitu CYP1B1

Aktivita ľudského CYP1B1 bola stanovená pomocou markerovej reakcie *O*-deetylácie 7-etoxyresorufínu, ktorá je touto izoformou taktiež katalyzovaná [87]. Z výsledkov (obrázok 15) je zrejmé, že v prítomnosti lenvatinibu dochádza k zníženiu aktivity ľudského CYP1B1. Pri oboch spôsoboch prevedenia reakcie boli pozorované podobné výsledky. Pri koncentrácii lenvatinibu rovnkej koncentrácii substrátu výrazná zmena aktivity nenastala, zatiaľ čo pri koncentrácii 10-násobne vyššej došlo k poklesu aktivity na 40 % pri naštartovaní reakcie NADPH a 33 % pri naštartovaní reakcie prídavkom substrátu.



Obr. 15: Vplyv lenvatinibu na aktivitu ľudského CYP1B1 v Superzómoch™, ktorý bol stanovený pomocou *O*-deetylácie 7-etoxyresorufínu. Koncentrácia substrátu (7-etoxyresorufín) bola 2 μM, lenvatinib bol pridaný v rovnakej a 10-násobne vyššej koncentrácii (2 μM a 20 μM). A) naštartovanie reakcie NADPH. B) naštartovanie reakcie prídavkom substrátu. Výsledky sú priemerom a smerodajnými odchýlkami 4 meraní. Aktivita CYP1B1 pri pridaní lenvatinibu bola porovnaná s aktivitou tejto izoformy bez pridaného lenvatinibu (DMSO).

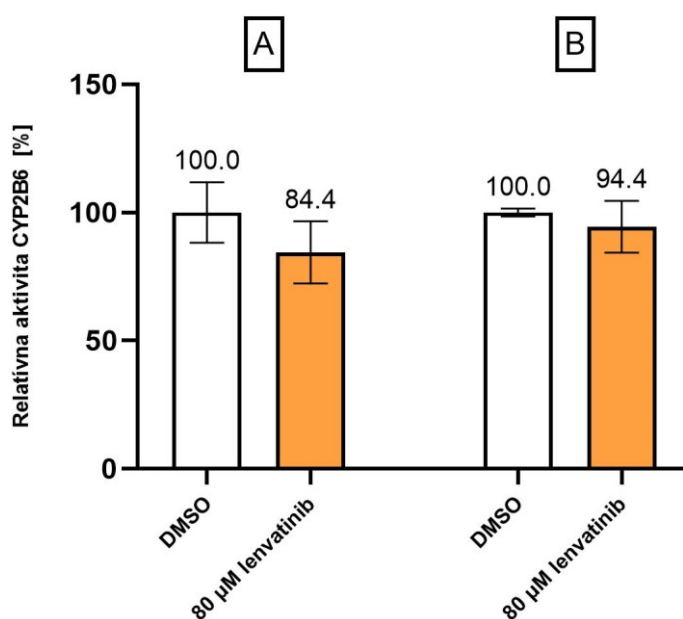
Následne bola stanovená aj hodnota IC_{50} lenvatinibu pre CYP1B1. V rámci tohto stanovenia bol použitý lenvatinib v rozsahu koncentrácie 0,1x - 35x koncentrácie substrátu. Paralelne bola meraná aktivita ľudského CYP1B1 bez prídavku lenvatinibu, kde bol miesto neho pridaný rovnaký objem rozpúšťadla DMSO. Hodnota IC_{50} bola stanovená na 13,1 μM (obrázok 16).



Obr. 16: Stanovenie IC_{50} lenvatinibu pre CYP1B1 pomocou *O*-deetylácie 7-etoxyresorufínu. Koncentrácia lenvatinibu bola v rozsahu 0,2 μM – 70 μM . Koncentrácia substrátu (7-etoxyresorufín) bola 2 μM . Koncentrácia ľudského CYP1B1 bola 5,0 nmol/l. Reakcia bola naštartovaná pridaním NADPH. Výsledky sú priemerom a smerodajnými odchýlkami troch meraní. Percentá vyjadrujú zmenu aktivity CYP1B1 pri pridaní lenvatinibu v porovnaní s aktivitou tejto izoformy bez pridaného lenvatinibu.

4.4 Vplyv lenvatinibu na aktivitu CYP2B6

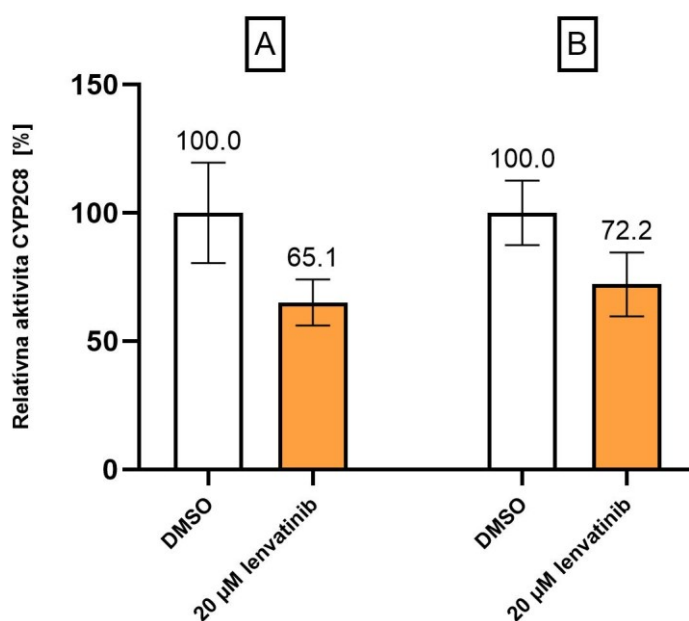
Hydroxylácia bupropiónu, ktorú ľudský CYP2B6 sprostredkuje, bola využitá na stanovenie aktivity tejto izoformy [89]. Účinok lenvatinibu bol pozorovaný pri jeho koncentrácii rovnkej koncentrácii substrátu (80 μM). Z výsledkov (obrázok 17) vyplýva, že lenvatinib nemá na ľudský CYP2B6 výrazný vplyv, keďže pri oboch spôsoboch prevedenia reakcia nedošlo k žiadnej zmene aktivity.



Obr. 17: Vplyv lenvatinibu na aktivitu ľudského CYP2B6 v Superzómoch™, ktorý bol stanovený pomocou hydroxylácie bupropiónu. Koncentrácia substrátu (bupropión) a lenvatinibu bola 80 μM . A) naštartovanie reakcie NADPH-GS. B) naštartovanie reakcie prídavkom substrátu. Výsledky sú priemerom a smerodajnými odchýlkami troch meraní. Aktivita CYP2B6 pri pridaní lenvatinibu bola porovnaná s aktivitou tejto izoformy bez pridaného lenvatinibu (DMSO).

4.5 Vplyv lenvatinibu na aktivitu CYP2C8

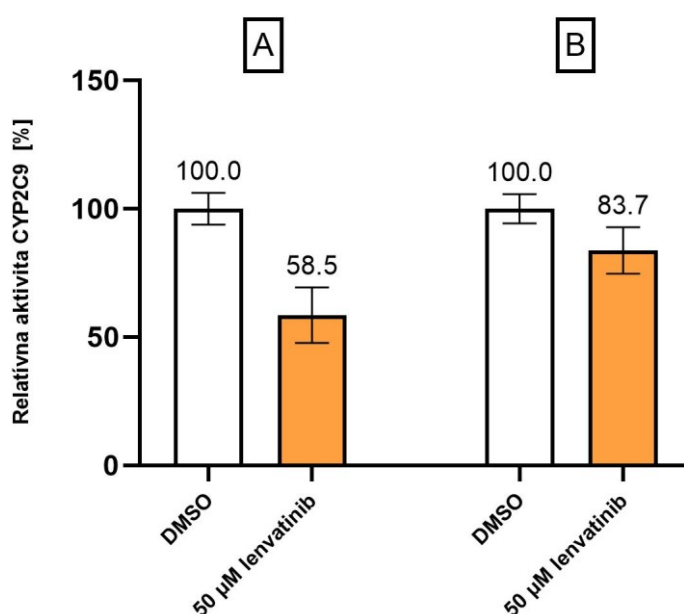
Pre stanovenie aktivity ľudskeho CYP2C8 bola využitá markerová reakcia 6 α -hydroxylácie paklitaxelu, ktorú táto izoforma zabezpečuje [90]. Koncentrácia lenvatinibu bola rovná koncentrácii substrátu (20 μ M). V oboch prípadoch prevedenia reakcie došlo k miernemu poklesu aktivity cytochrómu P450 2C8 (obrázok 18), pričom rozdiel v prevedení experimentu nemal vplyv na výslednú zmenu aktivity.



Obr. 18: Vplyv lenvatinibu na aktivitu ľudskeho CYP2C8 v Superzómoch™, ktorý bol stanovený pomocou 6 α -hydroxylácie paklitaxelu. Koncentrácia substrátu (paklitaxel) a lenvatinibu bola 20 μ M. A) naštartovanie reakcie NADPH-GS. B) naštartovanie reakcie prídavkom substrátu. Výsledky sú priemerom a smerodajnými odchýlkami troch meraní. Aktivita CYP2C8 pri pridaní lenvatinibu bola porovnaná s aktivitou tejto izoformy bez pridaného lenvatinibu (DMSO).

4.6 Vplyv lenvatinibu na aktivitu CYP2C9

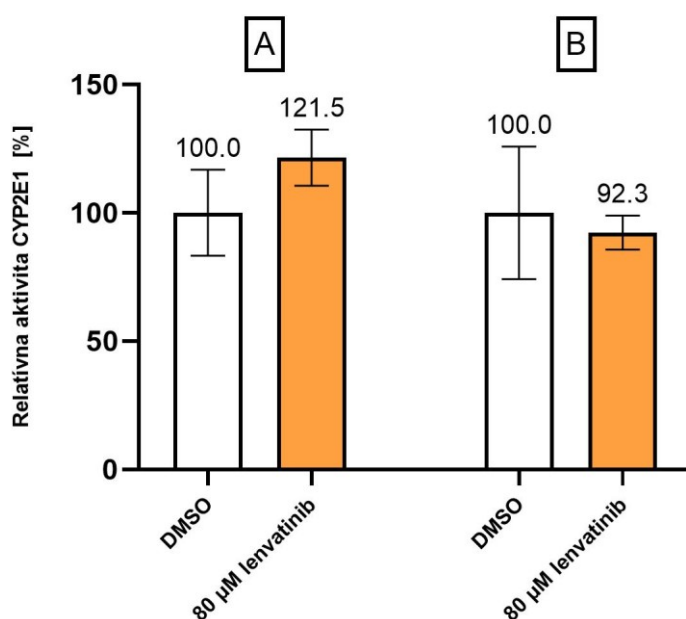
Pomocou markerovej reakcie 4'-hydroxylácie diklofenaku, ktorú ľudský CYP2C9 katalyzuje, bola stanovená aktivita tejto izoformy [91]. Merania boli prevedené pri koncentrácii lenvatinibu rovnkej koncentrácii substrátu (50 μM). V oboch prípadoch prevedenia reakcie došlo k zníženiu aktivity cytochrómu P450 2C9 (obrázok 19). Pri naštartovaní reakcie NADPH-GS došlo k zníženiu aktivity na 58,5 %. Pri preinkubácii lenvatinibu s CYP2C9 a NADPH-GS a naštartovaní reakcie substrátom došlo k zníženiu aktivity len na 83,7 %.



Obr. 19: Vplyv lenvatinibu na aktivitu ľudského CYP2C9 v SuperzómochTM, ktorý bol stanovený pomocou 4'-hydroxylácie diklofenaku. Koncentrácia substrátu (diklofenak) a lenvatinibu bola 50 μM . A) naštartovanie reakcie NADPH-GS. B) naštartovanie reakcie prídavkom substrátu. Výsledky sú priemerom a smerodajnými odchýlkami troch meraní. Aktivita CYP2C9 pri pridaní lenvatinibu bola porovnaná s aktivitou tejto izoformy bez pridaného lenvatinibu (DMSO).

4.7 Vplyv lenvatinibu na aktivitu CYP2E1

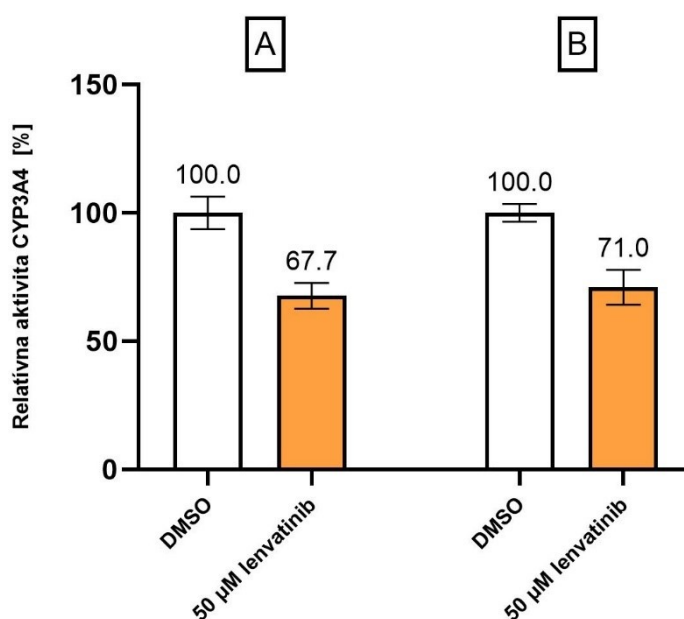
6-hydroxylácia chlorzoxazónu, ktorú ľudský CYP2E1 zabezpečuje, bola použitá na stanovenie aktivity tejto izoformy [92]. Vplyv lenvatinibu bol pozorovaný pri jeho koncentrácii rovnkej koncentrácii substrátu (80 μM). Z výsledkov (obrázok 20) vyplýva, že lenvatinib nemá na aktivitu ľudského CYP2E1 vplyv, keďže ani pri jednom prevedení reakcie nedošlo k žiadnym výrazným zmenám v reakčnej rýchlosti.



Obr. 20: Vplyv lenvatinibu na aktivitu ľudského CYP2E1 v SuperzómochTM, ktorý bol stanovený pomocou 6-hydroxylácie chlorzoxazónu. Koncentrácia substrátu (chlorzoxazón) a lenvatinibu bola 80 μM . A) naštartovanie reakcie NADPH-GS. B) naštartovanie reakcie prídavkom substrátu. Výsledky sú priemerom a smerodajnými odchýlkami troch meraní. Aktivita CYP2E1 pri pridaní lenvatinibu bola porovnaná s aktivitou tejto izoformy bez pridaného lenvatinibu (DMSO).

4.8 Vplyv lenvatinibu na aktivitu CYP3A4

Aktivita ľudského CYP3A4 bola stanovená pomocou markerovej reakcie 6 β -hydroxylácie testosterónu, ktorú táto izoforma sprostredkuje [93]. Účinok lenvatinibu bol pozorovaný pri jeho koncentrácii rovnkej koncentrácii substrátu (50 μ M). V oboch prípadoch prevedenia reakcie bol výsledok rovnaký a lenvatinib spôsobil zníženie aktivity ľudského CYP3A4 na približne 70 % (obrázok 21).



Obr. 21: Vplyv lenvatinibu na aktivitu ľudského CYP3A4 v Superzómoch™, ktorý bol stanovený pomocou 6 β -hydroxylácie testosterónu. Koncentrácia substrátu (testosterón) a lenvatinibu bola 50 μ M. A) naštartovanie reakcie NADPH-GS. B) naštartovanie reakcie prídavkom substrátu. Výsledky sú priemerom a smerodajnými odchýlkami troch meraní. Aktivita CYP3A4 pri pridaní lenvatinibu bola porovnaná s aktivitou tejto izoformy bez pridaného lenvatinibu (DMSO).

5. Diskusia

Lenvatinib, obchodne predávaný ako Lenvima[®], je perorálne liečivo schválené na liečbu rakoviny štítnej žľazy, hepatocelulárneho karcinómu a karcinómu obličkových buniek, ktoré pôsobí ako inhibítor tyrozínkináz [10], [11]. Lenvatinib bol prvýkrát schválený FDA v roku 2015, a to na liečbu rakoviny štítnej žľazy [71]. Štúdie *in vitro* a *in vivo* preukázali, že metabolizmus lenvatinibu v ľudskom tele prebieha v pečeni a obličkách, pričom jeho premenu zabezpečuje systém cytochrómov P450 a aldehydoxidáza [12], [13].

Cytochrómy P450 patria medzi hlavné enzýmy zabezpečujúce metabolizmus liekov a ostatných cudzorodých látok [82]. V súčasnosti sa veľká pozornosť venuje interakciám medzi liekmi (DDIs), pričom najčastejším mechanizmom, pomocou ktorého vznikajú, je inhibícia alebo indukcia cytochrómov P450 [81], [82]. Z tohto dôvodu je veľmi dôležité pochopenie farmakokinetických vlastností lenvatinibu pre zlepšenie výsledkov liečby. Informácie o vplyve lenvatinibu na špecifické cytochrómy P450 môžu odhaliť potencionálne liekové interakcie a zabrániť nežiadúcim účinkom [14].

Práve preto bolo cieľom tejto bakalárskej práce stanoviť vplyv lenvatinibu na aktivitu jednotlivých izoformiem ľudského cytochrómu P450. Medzi študované izoformy boli vybrané tie, ktoré zabezpečujú metabolizmus väčšiny cudzorodých látok v ľudskom tele. Merania boli prevedené *in vitro* za použitia rekombinantných CYP exprimovaných v SuperzómochTM pomocou markerových reakcií, ktoré jednotlivé izoformy cytochrómu P450 zabezpečujú. Aktivita enzýmu v reakčných zmesiach obsahujúcich lenvatinib v koncentrácii, ktorá odpovedala koncentrácii daného substrátu alebo bola 10-násobne vyššia, bola porovnaná s aktivitou enzýmu v reakčných zmesiach, kde bolo namiesto lenvatinibu pridané iba rozpúšťadlo DMSO. Na základe týchto meraní bola vypočítaná percentuálna aktivita izoformiem 1A1, 1A2, 1B1, 2B6, 2C8, 2C9, 2E1 a 3A4 cytochrómu P450 v prítomnosti lenvatinibu.

Merania boli prevedené dvoma spôsobmi. V prvej skupine obsahovala preinkubačná zmes všetky zložky okrem NADPH alebo NADPH-GS a po 5-minútovej preinkubácii bola reakcia naštartovaná prídavkom NADPH alebo NADPH-GS, pričom NADPH slúži ako kofaktor cytochrómu P450.

V druhej skupine meraní obsahovala preinkubačná zmes všetky zložky okrem substrátu, pričom čas preinkubácie bol v tomto prípade predĺžený o 5 minút oproti prvej

skupine. Reakcia bola následne naštartovaná prídavkom substrátu, pričom toto usporiadanie pokusu slúžilo k sledovaniu možného vplyvu prípadných metabolitov lenvatinibu na aktivitu cytochrómu P450, takže na odhalenie ireverzibilnej inhibície závislej na mechanizme reakcie.

Podľa štúdie vedenej firmou Eisai, ktorej konkrétne dáta však neboli ešte zverejnené, je metabolizmus lenvatinibu zabezpečený hlavne pomocou izoformy CYP3A4, pričom lenvatinib pôsobí ako mierny induktor a ireverzibilný inhibítor tohto enzýmu [78]. Okrem toho bolo zistené, že izoforma CYP1A1 výrazne prispieva k metabolizmu lenvatinibu, pričom v neprítomnosti cytochrómu b5, ktorý hrá dôležitú úlohu v reakčnom cykle cytochrómu P450, bola dokonca účinnejšia pri tvorbe desmetyl-lenvatinibu ako CYP3A4 [14], [94].

Niektoré ďalšie štúdie prišli ale s protikladnými výsledkami. Zatiaľ čo pri podaní rifampicínu, ktorý je silným induktorom CYP3A, došlo k zvýšeniu koncentrácie metabolitov lenvatinibu v plazme o 8,7 %, v inej štúdií, kde okrem lenvatinibu bol pacientom podávaný ketokonazol, ktorý pôsobí ako špecifický inhibítor CYP3A4, nedošlo k takmer žiadnej zmene perorálneho „klírens“ lenvatinibu [75], [95]. Na základe týchto dát by bolo možné predpokladať, že oxidatívny metabolizmus sprostredkovaný CYP3A4 (a inými izoformami cytochrómu P450) nemá hlavnú úlohu v celkovom „klírens“ lenvatinibu v ľudskom tele. Je teda možné, že v ľudskom tele existujú viaceré cesty, ktoré sa podieľajú na metabolizme lenvatinibu [95].

Inhibičný vplyv lenvatinibu na CYP3A4 sa potvrdil aj v tejto práci, pričom jeho aktivita klesla podobne pri oboch prevedeniach reakcie (obrázok 21, strana 57). Pri naštartovaní reakcie NADPH-GS došlo k poklesu aktivity na 68 %, zatiaľ čo pri naštartovaní reakcie prídavkom substrátu klesla aktivita na 71 %. Prípadná tvorba metabolitov lenvatinibu po jeho 10-minútovej preinkubácii s CYP3A4 a NADPH-GS nemala teda na inhibíciu izoformy rozdielny vplyv. Ide o izoformu, ktorá je najvýznamnejšou zo všetkých cytochrómov P450 a spolu s CYP3A5 zabezpečuje premenu vyše 50 % dostupných liekov a sama zabezpečuje viac ako 80 % metabolizmu lenvatinibu *in vitro* [13].

Pri izoforme CYP1A1 došlo k výraznejšiemu poklesu pri 10-násobnej koncentrácii lenvatinibu oproti substrátu (obrázok 13, strana 49). O tejto izoforme bolo preukázané, že taktiež zabezpečuje premenu lenvatinibu [14]. K silnejšiemu inhibičnému účinku (55% aktivita) došlo pri naštartovaní reakcie EROD substrátom (7-etoxyresorufin). Pri naštartovaní reakcie NADPH došlo k poklesu aktivity na 70 %.

Tento nárast inhibičného účinku pri dlhšej preinkubácii CYP1A1 s lenvatinibom a naštartovaní reakcie substrátom by mohol byť spôsobený vplyvom ireverzibilnej inhibície (tzv. „mechanism-based“), pri ktorej dochádza k pevnému kovalentnému naviazaniu reaktívneho medziproduktu na enzým, čo sa následne prejaví znížením aktivity. Tento jav však v rámci bakalárskej práce študovaný nebol.

Izoforma CYP1A2 pravdepodobne nemá v metabolizme lenvatinibu dôležitú úlohu, avšak bolo preukázané, že podobne ako CYP1A1 a CYP3A4 je schopná tvorby desmetyl-lenvatinibu [14]. Pri koncentrácii lenvatinibu rovnkej koncentrácii substrátu nedošlo k žiadnej zmene aktivity CYP1A2 a podobne tomu bolo aj pri koncentrácii 10-násobne vyššej (obrázok 14, strana 50).

Na rozdiel od väčšiny cytochrómov P450 sa konštitutívna expresia izoformy CYP1B1 v pečeni, kde prebieha časť metabolizmu lenvatinibu, nezistila [12], [96]. Napriek tomu sú ale informácie o pôsobení lenvatinibu na túto izoformu rovnako dôležité, keďže CYP1B1 sa v zvýšenej miere vyskytuje v obličkách, kde premena lenvatinibu prebieha taktiež [12], [97]. Pri skúmaní vplyvu lenvatinibu na CYP1B1 nebola pozorovaná výrazná zmena aktivity pri koncentrácii lenvatinibu rovnkej koncentrácii substrátu. Pri koncentrácii lenvatinibu 10-násobne vyššej oproti koncentrácii substrátu došlo k zníženiu aktivity enzýmu (obrázok 15, strana 51). Pri naštartovaní reakcie NADPH sa aktivita znížila na 40 %, zatiaľ čo pri naštartovaní reakcie substrátom, kde bol lenvatinib preinkubovaný s CYP1B1 a NADPH o 5 minút dlhšie, klesla aktivita enzýmu na 33 %. Kvôli výraznému poklesu aktivity bola následne stanovená aj hodnota koncentrácie lenvatinibu spôsobujúcej zníženie aktivity CYP1B1 na 50 % (IC_{50}), a to na 13,1 μ M (obrázok 16, strana 52). Toto stanovenie prebehlo pri koncentrácii substrátu (7-etoxyresorufin) 2 μ mol/l a koncentrácii CYP1B1 5,0 nmol/l. Z výsledkov je zrejmé, že lenvatinib spôsobuje pokles aktivity ľudského CYP1B1, avšak vzhľadom na hodnotu IC_{50} nejde o silný inhibítor.

Pri izoformách CYP2B6 a CYP2E1 nebol pozorovaný výrazný vplyv lenvatinibu na ich aktivitu (obrázok 17, strana 53 a obrázok 20, strana 56), pričom v štúdií z roku 2022 bolo preukázané, že izoforma CYP2B6 je schopná oxidácie lenvatinibu a jej úlohu v procese metabolizmu lenvatinibu netreba ignorovať a to hlavne v prítomnosti inhibítorov CYP3A [14].

Naopak pri izoforme CYP2C9 bol pozorovaný inhibičný účinok lenvatinibu na aktivitu tohto enzýmu (obrázok 19, strana 55). Ide o izoformu vyskytujúcu sa prevažne v pečeni, o ktorej nebolo preukázané, že sa podieľa na metabolizme lenvatinibu [14],

[37]. Pri naštartovaní reakcie NADPH-GS došlo k poklesu aktivity na 60 %, zatiaľ čo pri naštartovaní reakcie substrátom, kedy sa lenvatinib preinkuboval s CYP2C9 a NADPH 10 minút, sa aktivita znížila len na 84 %. Rozdiel v aktivite izoformy CYP2C9 v tejto práci skúmaný nebol, avšak dôvodom môže byť inhibičný účinok lenvatinibu na aktivitu CYP2C9 a zároveň účasť tohto enzýmu v metabolizme lenvatinibu, pri ktorom už produkty premeny inhibičný účinok nevykazujú. Takýto účinok zatiaľ však nikde preukázaný nebol.

Pri CYP2C8 bol taktiež pozorovaný inhibičný účinok lenvatinibu na aktivitu tejto izoformy (obrázok 18, strana 54). Podobne ako pri CYP2C9 nebolo v štúdií z roku 2022 zistené, že by sa táto izoforma podieľala na metabolizme lenvatinibu, pričom tieto dva enzýmy zdieľajú spolu viac ako 80 % aminokyselinovej identity [14], [98]. K podobnému poklesu aktivity došlo v oboch prípadoch prevedenia reakcie, pričom aktivita klesla na 65 % pri naštartovaní reakcie NADPH-GS a 72 % pri naštartovaní reakcie substrátom.

V rámci tejto bakalárskej práce bol skúmaný vplyv protinádorového liečiva lenvatinibu na aktivitu ľudských izoformiem cytochrómu P450 *in vitro*. Mierny inhibičný účinok lenvatinibu na aktivitu cytochrómu P450 bol pozorovaný pri niekoľkých izoformách. K poklesu aktivity došlo pri izoformách CYP1B1, CYP1A1 a CYP3A4, pričom o posledných dvoch menovaných bolo preukázané, že sa podieľajú na metabolizme lenvatinibu [14], [78]. Inhibičný účinok bol pozorovaný aj pri izoformách CYP2C8 a CYP2C9, na základe čoho by bolo možné predpokladať, že lenvatinib pôsobí ako mierny inhibítor podrodiny CYP2C. O týchto dvoch izoformách nebolo zatiaľ preukázané, že by sa podieľali na premene lenvatinibu. Práve z tohto dôvodu bude v budúcnosti detailnejšie preskúmaný vplyv lenvatinibu na katalytickú účinnosť tejto podrodiny. Z celkových výsledkov ale vyplýva, že lenvatinib nespôsobuje výraznú zmenu aktivity cytochrómu P450 a preto by nemal mať ani výrazný podiel na interakciách medzi liekmi, ktoré môžu viesť k nežiadúcim účinkom alebo zlyhaniu liečby.

6. Záver

V tejto bakalárskej práci bol študovaný vplyv protinádorového liečiva lenvatinibu na aktivitu ľudských izoformiem cytochrómu P450 1A1, 1A2, 1B1, 2B6, 2C8, 2C9, 2E1 a 3A4 *in vitro*. Na dosiahnutie cieľov práce bolo potrebné optimalizovať väčšinu použitých metód pre separáciu lenvatinibu zo zmesi.

Jednotlivé výsledky sú zhrnuté v nasledujúcich bodoch:

- K poklesu aktivity cytochrómu P450 vplyvom lenvatinibu došlo pri izoformách 1A1 a 1B1 (inhibícia *O*-deetylácie 7-etoxyresorufínu), 2C8 (inhibícia 6 α -hydroxylácie paklitaxelu), 2C9 (inhibícia 4'-hydroxylácie diklofenaku) a 3A4 (inhibícia 6 β -hydroxylácie testosterónu).
- Bola stanovená koncentrácia lenvatinibu spôsobujúca 50% inhibíciu (IC₅₀) *O*-deetylácie 7-etoxyresorufínu katalyzovanej CYP1B1 na 13,1 μ M pri koncentrácii substrátu 2 μ mol/l a koncentrácii CYP1B1 5,0 nmol/l.
- Vplyv lenvatinibu na katalytickú účinnosť CYP podrodiny 2C a 3A bude v budúcnosti detailnejšie preskúmaný.

Zoznam použitej literatúry

- [1] P. S. Roy a B. J. Saikia, "Cancer and cure: A critical analysis", *Indian J. Cancer*, roč. 53, č. 3, s. 441–442, sep. 2016, doi: 10.4103/0019-509X.200658.
- [2] W. Cao, H.-D. Chen, Y.-W. Yu, N. Li, a W.-Q. Chen, "Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020", *Chin. Med. J. (Engl.)*, roč. 134, č. 7, s. 783–791, apr. 2021, doi: 10.1097/CM9.0000000000001474.
- [3] R. A. Weinberg, "How cancer arises", *Sci. Am.*, roč. 275, č. 3, s. 62–70, sep. 1996, doi: 10.1038/scientificamerican0996-62.
- [4] L. R. Lopez, R. M. Bleich, a J. C. Arthur, "Microbiota Effects on Carcinogenesis: Initiation, Promotion, and Progression", *Annu. Rev. Med.*, roč. 72, s. 243–261, jan. 2021, doi: 10.1146/annurev-med-080719-091604.
- [5] G. S. Martin, "Cell signaling and cancer", *Cancer Cell*, roč. 4, č. 3, s. 167–174, sep. 2003, doi: 10.1016/s1535-6108(03)00216-2.
- [6] A. Cuadrado a A. R. Nebreda, "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling", *Biochem. J.*, roč. 429, č. 3, s. 403–417, aug. 2010, doi: 10.1042/BJ20100323.
- [7] S. R. Hubbard a J. H. Till, "Protein tyrosine kinase structure and function", *Annu. Rev. Biochem.*, roč. 69, s. 373–398, 2000, doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.373.
- [8] Z. Du a C. M. Lovly, "Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer", *Mol. Cancer*, roč. 17, č. 1, s. 58, feb. 2018, doi: 10.1186/s12943-018-0782-4.
- [9] B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz, a K. W. Kinzler, "Cancer genome landscapes", *Science*, roč. 339, č. 6127, s. 1546–1558, mar. 2013, doi: 10.1126/science.1235122.
- [10] Z. T. Al-Salama, Y. Y. Syed, a L. J. Scott, "Lenvatinib: A Review in Hepatocellular Carcinoma", *Drugs*, roč. 79, č. 6, s. 665–674, apr. 2019, doi: 10.1007/s40265-019-01116-x.
- [11] Z. Hao a P. Wang, "Lenvatinib in Management of Solid Tumors", *The Oncologist*, roč. 25, č. 2, s. e302–e310, feb. 2020, doi: 10.1634/theoncologist.2019-0407.
- [12] A. Gupta, B. Jarzab, J. Capdevila, R. Shumaker, a Z. Hussein, "Population pharmacokinetic analysis of lenvatinib in healthy subjects and patients with cancer", *Br. J. Clin. Pharmacol.*, roč. 81, č. 6, s. 1124–1133, jún. 2016, doi: 10.1111/bcp.12907.
- [13] *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012. Cit: 08. november 2021. [Online]. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547852/>
- [14] K. Vavrová, R. Indra, P. Pompach, Z. Heger, a P. Hodek, "The impact of individual human cytochrome P450 enzymes on oxidative metabolism of anticancer drug lenvatinib", *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.*, roč. 145, s. 112391, jan. 2022, doi: 10.1016/j.biopha.2021.112391.

- [15] P. Manikandan a S. Nagini, "Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review", *Curr. Drug Targets*, roč. 19, č. 1, s. 38–54, 2018, doi: 10.2174/1389450118666170125144557.
- [16] T. Omura a R. Sato, "A new cytochrome in liver microsomes", *J. Biol. Chem.*, roč. 237, s. 1375–1376, apr. 1962.
- [17] F. P. Guengerich, M. R. Waterman, a M. Egli, "Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function", *Trends Pharmacol. Sci.*, roč. 37, č. 8, s. 625–640, aug. 2016, doi: 10.1016/j.tips.2016.05.006.
- [18] S. Rendic a F. P. Guengerich, "Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals", *Chem. Res. Toxicol.*, roč. 28, č. 1, s. 38–42, jan. 2015, doi: 10.1021/tx500444e.
- [19] J. D. Rudolf, C.-Y. Chang, M. Ma, a B. Shen, "Cytochromes P450 for natural product biosynthesis in *Streptomyces*: sequence, structure, and function", *Nat. Prod. Rep.*, roč. 34, č. 9, s. 1141–1172, aug. 2017, doi: 10.1039/c7np00034k.
- [20] M. Stiborová, J. Hudeček, J. Páca Jr, V. Martínek, a J. Páca, "Enzymy metabolizující kontaminatny životního prostředí", *Chem. Listy*, č. 98, s. 876 – 890, 2004.
- [21] M. Stiborová, J. Hudeček, P. Hodek, a E. Frei, "Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví", *Chem. Listy*, č. 93, s. 229–237, 1999.
- [22] I. G. Denisov, T. M. Makris, S. G. Sligar, a I. Schlichting, "Structure and chemistry of cytochrome P450", *Chem. Rev.*, roč. 105, č. 6, s. 2253–2277, jún. 2005, doi: 10.1021/cr0307143.
- [23] F. P. Guengerich, M. V. Martin, C. D. Sohl, a Q. Cheng, "Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase", *Nat. Protoc.*, roč. 4, č. 9, s. 1245–1251, 2009, doi: 10.1038/nprot.2009.121.
- [24] F. P. Guengerich, "Cytochrome P450 research and The Journal of Biological Chemistry", *J. Biol. Chem.*, roč. 294, č. 5, s. 1671–1680, feb. 2019, doi: 10.1074/jbc.TM118.004144.
- [25] P. C. Nair, R. A. McKinnon, a J. O. Miners, "Cytochrome P450 structure-function: insights from molecular dynamics simulations", *Drug Metab. Rev.*, roč. 48, č. 3, s. 434–452, aug. 2016, doi: 10.1080/03602532.2016.1178771.
- [26] D. R. Nelson, "Cytochrome P450 nomenclature, 2004", *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, roč. 320, s. 1–10, 2006, doi: 10.1385/1-59259-998-2:1.
- [27] J. Lu, X. Shang, W. Zhong, Y. Xu, R. Shi, a X. Wang, "New insights of CYP1A in endogenous metabolism: a focus on single nucleotide polymorphisms and diseases", *Acta Pharm. Sin. B*, roč. 10, č. 1, s. 91–104, jan. 2020, doi: 10.1016/j.apsb.2019.11.016.
- [28] F. Klomp, C. Wenzel, M. Drozdik, a S. Oswald, "Drug-Drug Interactions Involving Intestinal and Hepatic CYP1A Enzymes", *Pharmaceutics*, roč. 12, č. 12, s. E1201, dec. 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12121201.
- [29] R. Thier, T. Brüning, P. H. Roos, a H. M. Bolt, "Cytochrome P450 1B1, a new keystone in gene-environment interactions related to human head and neck cancer?", *Arch. Toxicol.*, roč. 76, č. 5–6, s. 249–256, jún. 2002, doi: 10.1007/s00204-002-0349-3.

- [30] T. R. Sutter *et al.*, "Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2", *J. Biol. Chem.*, roč. 269, č. 18, s. 13092–13099, máj. 1994.
- [31] G. I. Murray, W. T. Melvin, W. F. Greenlee, a M. D. Burke, "Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1", *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, roč. 41, s. 297–316, 2001, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.297.
- [32] G. I. Murray *et al.*, "Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1", *Cancer Res.*, roč. 57, č. 14, s. 3026–3031, júl. 1997.
- [33] M. A. Faiq, R. Dada, R. Sharma, D. Saluja, a T. Dada, "CYP1B1: a unique gene with unique characteristics", *Curr. Drug Metab.*, roč. 15, č. 9, s. 893–914, 2014, doi: 10.2174/1389200216666150206130058.
- [34] M. T. Skaanild a C. Friis, "Porcine CYP2A polymorphisms and activity", *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, roč. 97, č. 2, s. 115–121, aug. 2005, doi: 10.1111/j.1742-7843.2005.pto_148.x.
- [35] H. Wang a L. M. Tompkins, "CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme", *Curr. Drug Metab.*, roč. 9, č. 7, s. 598–610, sep. 2008, doi: 10.2174/138920008785821710.
- [36] S.-L. Mo, Y.-H. Liu, W. Duan, M. Q. Wei, J. R. Kanwar, a S.-F. Zhou, "Substrate specificity, regulation, and polymorphism of human cytochrome P450 2B6", *Curr. Drug Metab.*, roč. 10, č. 7, s. 730–753, sep. 2009, doi: 10.2174/138920009789895534.
- [37] Y. Chen a J. A. Goldstein, "The transcriptional regulation of the human CYP2C genes", *Curr. Drug Metab.*, roč. 10, č. 6, s. 567–578, júl. 2009.
- [38] M. R. Botton *et al.*, "Structural variation at the CYP2C locus: Characterization of deletion and duplication alleles", *Hum. Mutat.*, roč. 40, č. 11, s. e37–e51, nov. 2019, doi: 10.1002/humu.23855.
- [39] P. Feng a Z. Liu, "Complex gene expansion of the CYP2D gene subfamily", *Ecol. Evol.*, roč. 8, č. 22, s. 11022–11030, okt. 2018, doi: 10.1002/ece3.4568.
- [40] J. E. Freeman a C. R. Wolf, "Evidence against a role for serine 129 in determining murine cytochrome P450 Cyp2e-1 protein levels", *Biochemistry*, roč. 33, č. 47, s. 13963–13966, nov. 1994, doi: 10.1021/bi00251a002.
- [41] F. P. Guengerich, "Cytochrome P450 2E1 and Its Roles in Disease", *Chem. Biol. Interact.*, roč. 322, s. 109056, máj. 2020, doi: 10.1016/j.cbi.2020.109056.
- [42] A. I. Cederbaum, "Alcohol metabolism", *Clin. Liver Dis.*, roč. 16, č. 4, s. 667–685, nov. 2012, doi: 10.1016/j.cld.2012.08.002.
- [43] S. R. Penzak a C. Rojas-Fernandez, "4 β -Hydroxycholesterol as an Endogenous Biomarker for CYP3A Activity: Literature Review and Critical Evaluation", *J. Clin. Pharmacol.*, roč. 59, č. 5, s. 611–624, máj. 2019, doi: 10.1002/jcph.1391.
- [44] N. Hohmann, W. E. Haefeli, a G. Mikus, "CYP3A activity: towards dose adaptation to the individual", *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, roč. 12, č. 5, s. 479–497, máj. 2016, doi: 10.1517/17425255.2016.1163337.

- [45] T. Lynch a A. P. Neff, "The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions, and Adverse Effects", *Am. Fam. Physician*, roč. 76, č. 3, s. 391–396, aug. 2007.
- [46] O. Pelkonen, M. Turpeinen, J. Hakkola, P. Honkakoski, J. Hukkanen, a H. Raunio, "Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status", *Arch. Toxicol.*, roč. 82, č. 10, s. 667–715, okt. 2008, doi: 10.1007/s00204-008-0332-8.
- [47] A. Kamel a S. Harriman, "Inhibition of cytochrome P450 enzymes and biochemical aspects of mechanism-based inactivation (MBI)", *Drug Discov. Today Technol.*, roč. 10, č. 1, s. e177-189, 2013, doi: 10.1016/j.ddtec.2012.09.011.
- [48] S. Maâlej, I. Drira, R. Ben Mefteh, H. Fennira, M. Bourguiba, a A. Ben Kheder, "[Isoniazid-induced visual hallucinosis]", *Presse Medicale Paris Fr. 1983*, roč. 35, č. 3 Pt 1, s. 425–426, mar. 2006, doi: 10.1016/s0755-4982(06)74609-7.
- [49] G. Hoppe, "Gestoden, an innovative progestogen", *Adv. Contracept. Off. J. Soc. Adv. Contracept.*, roč. 3, č. 2, s. 159–166, jún. 1987, doi: 10.1007/BF01890704.
- [50] K. P. Delaune a K. Alsayouri, "Physiology, Noncompetitive Inhibitor", v *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021. Cit: 08. november 2021. [Online]. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545242/>
- [51] S. Hubbard, "Hubbard, S. R. Protein tyrosine kinases: autoregulation and small-molecule inhibition. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 735-741", *Curr. Opin. Struct. Biol.*, roč. 12, s. 735–41, jan. 2003, doi: 10.1016/S0959-440X(02)00383-4.
- [52] R. Bose, M. A. Holbert, K. A. Pickin, a P. A. Cole, "Protein tyrosine kinase-substrate interactions", *Curr. Opin. Struct. Biol.*, roč. 16, č. 6, s. 668–675, dec. 2006, doi: 10.1016/j.sbi.2006.10.012.
- [53] R. Trenker a N. Jura, "Receptor tyrosine kinase activation: From the ligand perspective", *Curr. Opin. Cell Biol.*, roč. 63, s. 174–185, apr. 2020, doi: 10.1016/j.ceb.2020.01.016.
- [54] S. J. Saouaf, A. L. Burkhardt, a J. B. Bolen, "Nonreceptor protein tyrosine kinase involvement in signal transduction and immunodeficiency disease", *Clin. Immunol. Immunopathol.*, roč. 76, č. 3 Pt 2, s. S151-157, sep. 1995, doi: 10.1016/s0090-1229(95)90036-5.
- [55] K. Neet a T. Hunter, "Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families", *Genes Cells*, roč. 1, č. 2, s. 147–169, 1996, doi: 10.1046/j.1365-2443.1996.d01-234.x.
- [56] A. Y. Tsygankov, "Non-receptor protein tyrosine kinases", *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, roč. 8, s. s595-635, máj. 2003, doi: 10.2741/1106.
- [57] W. Jin, "Regulation of Src Family Kinases during Colorectal Cancer Development and Its Clinical Implications", *Cancers*, roč. 12, č. 5, s. 1339, máj. 2020, doi: 10.3390/cancers12051339.
- [58] A. Thomas, A. Rajan, a G. Giaccone, "Tyrosine kinase inhibitors in lung cancer", *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, roč. 26, č. 3, s. 589–605, viii, jún. 2012, doi: 10.1016/j.hoc.2012.02.001.

- [59] Q. Jiao, L. Bi, Y. Ren, S. Song, Q. Wang, a Y.-S. Wang, “Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance”, *Mol. Cancer*, roč. 17, č. 1, s. 36, feb. 2018, doi: 10.1186/s12943-018-0801-5.
- [60] K. S. Bhullar *et al.*, “Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions”, *Mol. Cancer*, roč. 17, s. 48, feb. 2018, doi: 10.1186/s12943-018-0804-2.
- [61] R. J. Thomson, M. Moshirfar, a Y. Ronquillo, “Tyrosine Kinase Inhibitors”, v *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. Cit: 07. máj 2022. [Online]. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563322/>
- [62] L. Huang, S. Jiang, a Y. Shi, “Tyrosine kinase inhibitors for solid tumors in the past 20 years (2001-2020)”, *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol*, roč. 13, č. 1, s. 143, okt. 2020, doi: 10.1186/s13045-020-00977-0.
- [63] X. Liu, P. Wang, C. Zhang, a Z. Ma, “Epidermal growth factor receptor (EGFR): A rising star in the era of precision medicine of lung cancer”, *Oncotarget*, roč. 8, č. 30, s. 50209–50220, júl. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.16854.
- [64] X. Du, Y. Shao, H.-F. Qin, Y.-H. Tai, a H.-J. Gao, “ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC)”, *Thorac. Cancer*, roč. 9, č. 4, s. 423–430, apr. 2018, doi: 10.1111/1759-7714.12613.
- [65] M. Touat, E. Ileana, S. Postel-Vinay, F. André, a J.-C. Soria, “Targeting FGFR Signaling in Cancer”, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, roč. 21, č. 12, s. 2684–2694, jún. 2015, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2329.
- [66] M. Shibuya, “VEGFR and type-V RTK activation and signaling”, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, roč. 5, č. 10, s. a009092, okt. 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a009092.
- [67] K. Suyama a H. Iwase, “Lenvatinib: A Promising Molecular Targeted Agent for Multiple Cancers”, *Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent.*, roč. 25, č. 1, s. 1073274818789361, dec. 2018, doi: 10.1177/1073274818789361.
- [68] K. Okamoto *et al.*, “Distinct binding mode of multikinase inhibitor lenvatinib revealed by biochemical characterization”, *ACS Med. Chem. Lett.*, roč. 6, č. 1, s. 89–94, jan. 2015, doi: 10.1021/ml500394m.
- [69] D. S. Boss *et al.*, “A phase I study of E7080, a multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumours”, *Br. J. Cancer*, roč. 106, č. 10, s. 1598–1604, máj. 2012, doi: 10.1038/bjc.2012.154.
- [70] A. Nair *et al.*, “FDA Supplemental Approval Summary: Lenvatinib for the Treatment of Unresectable Hepatocellular Carcinoma”, *The Oncologist*, roč. 26, č. 3, s. e484–e491, mar. 2021, doi: 10.1002/onco.13566.
- [71] A. Nair *et al.*, “FDA Approval Summary: Lenvatinib for Progressive, Radio-iodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer”, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, roč. 21, č. 23, s. 5205–5208, dec. 2015, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1377.
- [72] M. Capozzi *et al.*, “Lenvatinib, a molecule with versatile application: from preclinical evidence to future development in anti-cancer treatment”, *Cancer Manag. Res.*, roč. 11, s. 3847–3860, máj. 2019, doi: 10.2147/CMAR.S188316.

- [73] K. Inoue, H. Mizuo, S. Kawaguchi, K. Fukuda, K. Kusano, a T. Yoshimura, "Oxidative metabolic pathway of lenvatinib mediated by aldehyde oxidase", *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, roč. 42, č. 8, s. 1326–1333, aug. 2014, doi: 10.1124/dmd.114.058073.
- [74] S. Kitamura, K. Sugihara, a S. Ohta, "Drug-metabolizing ability of molybdenum hydroxylases", *Drug Metab. Pharmacokinet.*, roč. 21, č. 2, s. 83–98, apr. 2006, doi: 10.2133/dmpk.21.83.
- [75] R. C. Shumaker, J. Aluri, J. Fan, G. Martinez, G. A. Thompson, a M. Ren, "Effect of rifampicin on the pharmacokinetics of lenvatinib in healthy adults", *Clin. Drug Investig.*, roč. 34, č. 9, s. 651–659, sep. 2014, doi: 10.1007/s40261-014-0217-y.
- [76] J. Li *et al.*, "Influences of ABC transporter and CYP3A4/5 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of lenvatinib in Chinese healthy subjects", *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, roč. 76, č. 8, s. 1125–1133, aug. 2020, doi: 10.1007/s00228-020-02879-z.
- [77] S. Mollazadeh, A. Sahebkar, F. Hadizadeh, J. Behravan, a S. Arabzadeh, "Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors", *Life Sci.*, roč. 214, s. 118–123, dec. 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.048.
- [78] R. Shumaker, M. Ren, J. Aluri, C. E. Dutcus, C. Rance, a C. He, "An Open-Label Phase 1 Study to Determine the Effect of Lenvatinib on the Pharmacokinetics of Midazolam, a CYP3A4 Substrate, in Patients with Advanced Solid Tumors", *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, roč. 45, č. 3, s. 373–383, 2020, doi: 10.1007/s13318-020-00607-7.
- [79] H. Yagishita, S. Minami, Y. Akamine, S. Kato, K. Iijima, a M. Miura, "Drug interactions between warfarin and lenvatinib in a patient with the CYP2C9*1/*3 and VKORC1-1639G/A genotype", *J. Clin. Pharm. Ther.*, roč. 44, č. 6, s. 977–980, 2019, doi: 10.1111/jcpt.13030.
- [80] "Food and Drug Administration. Center for drug evaluation and research lenvatinib clinical pharmacology and biopharmaceutics Review. 2014".
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2015/206947Orig1s000ClinPharmR.pdf
(cit 22. máj 2022).
- [81] D. Rekić *et al.*, "Clinical Drug-Drug Interaction Evaluations to Inform Drug Use and Enable Drug Access", *J. Pharm. Sci.*, roč. 106, č. 9, s. 2214–2218, sep. 2017, doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.016.
- [82] M. Carpenter, H. Berry, a A. L. Pelletier, "Clinically Relevant Drug-Drug Interactions in Primary Care", *Am. Fam. Physician*, roč. 99, č. 9, s. 558–564, máj. 2019.
- [83] J. P. van den Berg *et al.*, "Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions in anaesthesia. A review of current knowledge and how it can be used to optimize anaesthetic drug administration", *Br. J. Anaesth.*, roč. 118, č. 1, s. 44–57, jan. 2017, doi: 10.1093/bja/aew312.
- [84] C. Tannenbaum a N. L. Sheehan, "Understanding and preventing drug-drug and drug-gene interactions", *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, roč. 7, č. 4, s. 533–544, júl. 2014, doi: 10.1586/17512433.2014.910111.
- [85] L. E. Shapiro a N. H. Shear, "Drug interactions: Proteins, pumps, and P-450s", *J. Am. Acad. Dermatol.*, roč. 47, č. 4, s. 467–484; quiz 485–488, okt. 2002, doi: 10.1067/mjd.2002.126823.

- [86] B. Otáhálová, "Inhibice enzymové aktivity cytochromů P450 endokrinním disruptorem 17 α -ethinylestradiolem", *Univerzita Karlova, Diplomová práce*, 2020, [Online]. Dostupné na: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/119831>
- [87] M. D. Burke a R. T. Mayer, "Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene", *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, roč. 2, č. 6, s. 583–588, dec. 1974.
- [88] J. J. Chen, G. S. Chen, a N. J. Bunce, "Inhibition of CYP 1A2-dependent MROD activity in rat liver microsomes: An explanation of the hepatic sequestration of a limited subset of halogenated aromatic hydrocarbons", *Environ. Toxicol.*, roč. 18, č. 2, s. 115–119, 2003, doi: 10.1002/tox.10107.
- [89] L. M. Hesse *et al.*, "CYP2B6 Mediates the In Vitro Hydroxylation of Bupropion: Potential Drug Interactions with Other Antidepressants", *Drug Metab. Dispos.*, roč. 28, č. 10, s. 1176–1183, okt. 2000.
- [90] C. Rodríguez-Antona *et al.*, "Characterization of novel CYP2C8 haplotypes and their contribution to paclitaxel and repaglinide metabolism", *Pharmacogenomics J.*, roč. 8, č. 4, s. 268–277, aug. 2008, doi: 10.1038/sj.tpj.6500482.
- [91] S. Schmidt, H. Hoffmann, L.-A. Garbe, a R. J. Schneider, "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection of diclofenac and related compounds in water samples", *J. Chromatogr. A*, roč. 1538, s. 112–116, feb. 2018, doi: 10.1016/j.chroma.2018.01.037.
- [92] R. Peter, R. Böcker, P. H. Beaune, M. Iwasaki, F. P. Guengerich, a C. S. Yang, "Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1", *Chem. Res. Toxicol.*, roč. 3, č. 6, s. 566–573, dec. 1990, doi: 10.1021/tx00018a012.
- [93] J. A. Krauser a F. P. Guengerich, "Cytochrome P450 3A4-catalyzed Testosterone 6 β -Hydroxylation Stereochemistry, Kinetic Deuterium Isotope Effects, and Rate-limiting Steps **", *J. Biol. Chem.*, roč. 280, č. 20, s. 19496–19506, máj. 2005, doi: 10.1074/jbc.M501854200.
- [94] H. Zhang *et al.*, "Effect of Cytochrome b5 Content on the Activity of Polymorphic CYP1A2, 2B6, and 2E1 in Human Liver Microsomes", *PLoS ONE*, roč. 10, č. 6, s. e0128547, jún. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0128547.
- [95] R. Shumaker, J. Aluri, J. Fan, G. Martinez, G. A. Thompson, a M. Ren, "Effects of ketoconazole on the pharmacokinetics of lenvatinib (E7080) in healthy participants", *Clin. Pharmacol. Drug Dev.*, roč. 4, č. 2, s. 155–160, 2015, doi: 10.1002/cpdd.140.
- [96] T. K. H. Chang, J. Chen, V. Pillay, J.-Y. Ho, a S. M. Bandiera, "Real-time polymerase chain reaction analysis of CYP1B1 gene expression in human liver", *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.*, roč. 71, č. 1, s. 11–19, jan. 2003, doi: 10.1093/toxsci/71.1.11.
- [97] F. Li, W. Zhu, a F. J. Gonzalez, "Potential role of CYP1B1 in the development and treatment of metabolic diseases", *Pharmacol. Ther.*, roč. 178, s. 18–30, okt. 2017, doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.03.007.
- [98] M. Ridderström, I. Zamora, O. Fjellström, a T. B. Andersson, "Analysis of selective regions in the active sites of human cytochromes P450, 2C8, 2C9, 2C18, and 2C19 homology models using GRID/CPCA", *J. Med. Chem.*, roč. 44, č. 24, s. 4072–4081, nov. 2001, doi: 10.1021/jm0109107.

