

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Michal Fedák

Vliv pH na oxidaci vandetanibu

Effect of pH on vandetanib oxidation

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Radek Indra, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení:

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

V Praze dne:

Podpis:

Michal Fedák

Poděkování:

Rád by som sa poďakoval môjmu školiteľovi, Mgr. Radku Indrovi, Ph.D., za jeho ochotu, čas a cenné rady, ktoré mi pri vypracovaní tejto bakalárskej práce veľmi pomohli. Ďalej by som chcel poďakovať mojej rodine a priateľom, ktorí ma neustále podporujú a motivujú.

Tato práce byla podporována grantovou agenturou České republiky (grant 18-10251S)

Abstrakt:

Vandetanib je protinádorové léčivo využívající se zejména pro cílenou léčbu medulárního karcinomu štítné žlázy. Působí jako inhibitor tyrosinkinasy a vyznačuje se selektivitou vůči receptorům vaskulárního endoteliálního růstového faktoru 2 (VEGFR-2), epidermálního růstového faktoru (EGFR) a inhibuje také tyrosinkinasonou aktivitu přesmyku během transfekce (RET). V organismu lidí a také experimentálních zvířat je vandetanib metabolizován pomocí cytochromů P450 (CYP) a flavinmonooxygenasy (FMO). Pomocí CYP je vandetanib oxidován za vzniku N-desmethylvandetanibu. Působením FMO se z vandetanibu tvoří vandetanib N-oxid.

V této bakalářské práci byl studován vliv pH na oxidaci vandetanibu pomocí CYP a FMO obsažených v potkaních jaterních mikrosomech indukovaných různými činidly.

Získaná data ukazují, že ve většině sérií jsou optimální hodnoty pH oxidace vandetanibu jak pomocí CYP, tak FMO dosti podobné. Největší množství N-desmethylvandetanibu bylo pozorováno hlavně při pH 8,5. Vandetanib N-oxid byl v největší míře tvořen také ve většině sérií při stejné hodnotě pH.

Výsledky naznačují, že N-desmethylvandetanib je tvořen v největší míře při hodnotách pH, které nespádají do intervalu pH pro optimální aktivitu CYP. Vysvětlení pro toto zjištění poskytuje zřejmě fakt, že zastoupení vandetanibu v jeho neutrální formě, která je efektivně oxidovaná CYP, přibývá při vyšších hodnotách pH. Maximální množství vandetanib N-oxidu bylo pozorováno ve většině sérií při hodnotách pH, které spadají do intervalu pro optimální aktivitu FMO.

Klíčová slova: vandetanib, cytochromy P450, flavinmonooxygenasy

Abstract:

Vandetanib is anticancer drug used mainly for targeted therapy of medullary thyroid carcinoma. It acts as inhibitor of tyrosine kinase and shows selectivity for vascular endothelial growth factor 2 (VEGFR-2) and epidermal growth factor (EGFR). It also inhibits rearranged during transfection (RET) tyrosine kinase activity. Vandetanib is metabolized by cytochromes P450 (CYPs) and flavin-containing monooxygenases (FMOs) in organism of humans as well as experimental animals. CYPs oxidize vandetanib to N-desmethylvandetanib. FMOs are responsible for the formation of vandetanib N-oxide.

This bachelor thesis studies effect of pH on vandetanib oxidation by CYPs a FMOs present in rat hepatic microsomes induced by different agents.

Collected data show that in majority of series, optimal pH levels for oxidation of vandetanib by CYPs and FMOs are similar to a large extend. The highest amount of N-desmethylvandetanib was observed mostly at the pH 8,5. Vandetanib N-oxide was also produced in the highest quantity at the same level of pH in majority of series.

Results suggest that N-desmethylvandetanib is formed at levels of pH which do not fit in interval of pH for optimal CYP activity. This finding is apparently due to a fact that presence of vandetanib in its neutral form, which is effectively oxidized by CYP, increases at higher pH levels. In majority of series maximum amount of vandetanib N-oxid was observed at levels of pH that fit in interval for optimal FMO activity.

Keywords: vandetanib, cytochromes P450, flavin-containing monooxygenases

Obsah

Abstrakt:	4
Abstract:.....	5
Obsah.....	6
Použité zkratky.....	8
1 Teoretický úvod.....	9
1.1 Rakovina.....	9
1.1.1 Charakteristické znaky rakoviny	9
1.1.2 Karcinogeneze.....	9
1.1.3 Faktory způsobující vznik rakoviny	11
1.2 Štítná žláza	11
1.2.1 Nádory štítné žlázy	12
1.3 Léčba rakoviny	13
1.4 Inhibitory tyrosinkinas.....	14
1.4.1 Vandetanib	14
1.5 Biotransformace xenobiotik.....	16
1.5.1 První fáze biotransformace	16
1.5.2 Druhá fáze biotransformace.....	16
1.6 Cytochromy P450	17
1.6.1 Klasifikace cytochromů P450	17
1.6.2 Struktura cytochromu P450	18
1.6.3 Katalytický mechanismus cytochromů P450	18
1.7 Flavinmonooxygenasy	21
1.7.1 Katalytický mechanismus flavinmonooxygenas	21
2 Cíl práce	23
3 Materiál a metody	24
3.1 Přístroje	24
3.2 Chemikálie a biologické materiály	24
3.2.1 Použité metody.....	25
4 Výsledky	26
4.1 Vliv pH na oxidaci vandetanibu cytochromy P450 a flavinmonooxygenasamy obsažených v potkaních jaterních mikrosomech bez přidaného induktoru	26
4.2 Vliv pH na oxidaci vandetanibu cytochromy P450 a flavinmonooxygenasamy obsažených v potkaních jaterních mikrosomech indukovaných Sudanem I.....	27
4.3 Vliv pH na oxidaci vandetanibu cytochromy P450 a flavinmonooxygenasamy obsažených v potkaních jaterních mikrosomech indukovaných fenobarbitalem	29

4.4	Vliv pH na oxidaci vandetanibu cytochromy P450 a flavinmonooxygenasamy obsažených v potkaních jaterních mikrosomech indukovaných ethanolem.....	30
4.5	Vliv pH na oxidaci vandetanibu cytochromy P450 a flavinmonooxygenasamy obsažených v potkaních jaterních mikrosomech indukovaných pregnenolon-16α-karbonitrilem.....	31
4.6	Souhrnné vyhodnocení výsledků ze všech sérií měření.....	32
5	Diskuze	34
6	Závěr.....	38
7	Použitá literatura.....	39

Použité zkratky

CT	výpočetní tomografie (z ang. Computed tomography)
CYP	cytochrom P450
DMSO	dimethylsulfoxid
EtAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor (z ang. Epidermal growth factor receptor)
FAD	flavinadenindinukleotid
FDA	Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z ang. Food and Drug administration)
FMN	flavinmononukleotid
FMO	flavinmonooxygenasa
Kon	kontrolní mikrosomy
MRI	magnetická rezonance (z ang. Magnetic resonance imaging)
NADPH	nikotinamidadenosindinukleotidfosfát
N-des	N-desmethylvandetanib
N-ox	vandetanib N-oxid
PCN	pregnenolon-16 α -karbonitril
RET	přesmyk během transfekce (z ang. Rearranged during transfection)
Sud I	Sudan I
UV-VIS	ultrafialově-viditelná (z ang. ultraviolet-visible)
VEGFR-2	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor 2 (z ang. Vascular endothelial growth factor receptor 2)

1 Teoretický úvod

1.1 Rakovina

Rakovina je onemocnění, při němž buňky nabývají schopnost se nekontrolovaně množit a růst. Za normálních okolností se lidské buňky dělí a rostou, za účelem tvorby nových buněk dle potřeby organismu. U rakoviny však dochází k narušení tohoto, jinak přísně regulovaného procesu a výskytu různých anomálií. Staré, nebo poškozené buňky přežívají, i když by měli zaniknout a nové buňky se tvoří i v době, kdy to není žádoucí. V mnoha případech se tyto nežádoucí buňky seskupují a tvoří nádory, které můžou v průběhu času růst a začít ovlivňovat funkce tkání a orgánů[1,2].

Podle míry nebezpečí rozlišujeme dva typy nádorů: benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné). Benigní nádory jsou neinvazivní, ale častokrát relativně velké nádory, které po odstranění obvykle nedorostou. Maligní nádory mají schopnost šířit se do okolních tkání, nebo skrze krevní, případně lymfatický systém do vzdálenějších částí těla, což je činí víc život ohrožující oproti nádorům benigním[2,3].

1.1.1 Charakteristické znaky rakoviny

Pojem rakovina představuje širokou škálu jedinečných patologických stavů. Existuje však několik znaků, které mají tyto stavy společné. V současné době existuje 8 charakteristických znaků, vyskytujících se u většiny forem rakoviny člověka, přičemž každý z nich má specifickou úlohu v procesu vzniku, rozvoje a zachování nádorů[4]:

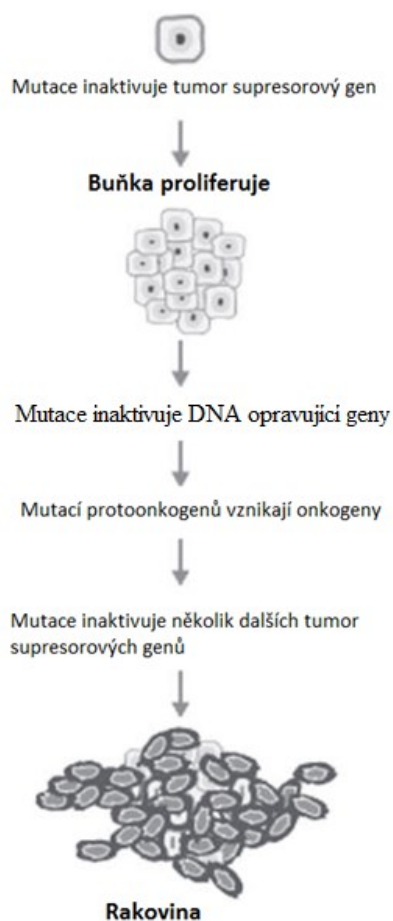
- Udržení proliferační signalizace
- Vyhýbání se růstové supresy
- Zabraňování buněčné smrti
- Umožnění replikační nesmrtelnosti
- Indukce angiogeneze
- Aktivace invaze a metastází
- Narušení buněčné energetiky a metabolismu
- Vyhýbání se imunitnímu zničení

1.1.2 Karcinogeneze

Zdravé buňky jsou základní stavební jednotky tvořící lidské tělo. Vyznačují se přirozenou schopností růst, množit se a komunikovat. Buněčné dělení je proces, při kterém buňka replikuje všechny svoje komponenty, které jsou následně segregovány, přičemž dochází k vzniku dvou geneticky ekvivalentních buněk[1]. Před samotným rozdělením musí dojít k replikaci a segregaci genetického materiálu (genomu) dané buňky. Oba tyto procesy, jak replikace, tak rozdělení genomu jsou kontrolovány klíčovými regulátory buněčného cyklu, které poskytují systém kontrol pro všechny čtyři fáze cyklu (G1, S, G2 a M)[1,5].

Geny, které mají za úkol zastavit, případně oddálit proces buněčného dělení se nazývají tumor supresorové geny. Protoonkogeny jsou geny, které naopak přirozeně podporují buněčné dělení. Tyto dvě skupiny genů tvoří jen malou část celkového genomu, ale hrají hlavní roli v procesu karcinogeneze[3].

Jestliže jsou protoonkogeny aktivovány, nebo mutují, nastává jejich přeměna na onkogeny, které vedou k zvýšené proliferaci. Pokud dochází k mutacím, které vedou k inaktivaci tumor supresorových genů může také dojít k nekontrolovanému buněčnému dělení. Dojde-li k akumulaci mutací v obou těchto skupinách genů, může buňka začít podléhat maligním transformacím, což vede k její přeměně na buňku rakovinovou (viz. Obr.1). Dochází k narušení správného průběhu buněčného cyklu a schopnosti buňky komunikovat s okolním prostředím. Narušení regulace buněčného cyklu umožní tvorbu abnormálního množství buněk v těle. Abnormální interakce s okolím zas umožňuje rakovinným buňkám měnit tvar a transportovat se v rámci organismu [1,3].



Obrázek 1: Procesy vedoucí k rozvoji rakoviny. K vytvoření rakoviny je za potřebí aby došlo k mutacím několika genů. Převzato a upraveno [1].

1.1.3 Faktory způsobující vznik rakoviny

Faktory způsobující vznik rakoviny mohou být různé povahy a mnohdy se vzájemně potencují. Tyto faktory můžeme rozdělit do tří základních skupin: chemické, fyzikální a biologické [6].

Chemické látky, které vedou ke vzniku rakoviny, se nazývají karcinogeny. Patří sem například aromatické uhlovodíky obsažené v dehtu, dusitany, vinylchlorid používaný při výrobě plastů, nebo také aflatoxin tvořený plísní *Aspergillus flavus* vyskytující se na obilí [6,7]. Mezi významné karcinogeny se řadí také látky obsažené v cigaretovém kouři, přičemž u kuřáků se vytvoření karcinomů objevuje teprve po delší době expozice. Tyto látky reagují přímo s DNA, avšak změny, které způsobují, se nepřenášejí na další generace. K přenosu mutačního poškození dochází pouze u genů zárodečných buněk (spermie, vajíčko)[6].

Mezi fyzikální vlivy patří ionizující záření, jako například rentgenové záření, respektive všechny typy krátkovlnného záření. Zvýšené vystavení slunečnímu záření, zejména UV-B vede k zvýšení rizika vzniku kožních nádorů [6]. Vlákná azbestu mohou poškodit buňky epitelu plic a přeměnit je v buňky rakovinné. Tento proces je zdlouhavý a běžně dochází k rozvoji rakoviny po 15 až 35 letech od prvotní expozice[8].

Za biologické faktory způsobující rakovinu jsou považovány zejména viry, které se souhrnně nazývají onkoviry. Mezi nejznámější zastupitele této skupiny virů patří například EB virus (virus Epstein-Baarové), nebo také virus Rousova sarkomu, který patří také mezi retroviry. Onkoviry nesou genetickou informaci (onkogen), která je schopna indukovat transformaci buňky na buňku nádorovou [6].

1.2 Štítná žláza

Štítná žláza je umístěna na přední straně krku podél hrtanu a průdušnice. Je tvořena dvěma laloky, které jsou propojené můstkem. Štítná žláza je tvořena téměř kulatými folikuly vystlanými kubickým epitelem [9]. Uvnitř folikulů se nachází koloid, který je bohatý na tyreoglobulin [6,9]. V hypotalamu je produkován thyreolibertin, který stimuluje tvorbu a sekreci thyreotropinu. Tyreoglobulin je působením thyreotropinu konvertován na tyroxin a trijodtyronin, které jsou vázány na tyreoglobulin a uskladněny ve folikulech [9,10]. Účinky těchto hormonů jsou například [9]:

- Zvýšení bazálního metabolismu v téměř všech tkáních – zvyšují teplotu organismu
- Stimulují proteosyntézu a růst
- Stimulují metabolismus cukrů
- Zvyšují mobilizaci a oxidaci tuků, snižují koncentraci cholesterolu

Štítná žláza obsahuje také C- buňky (parafolikulární buňky), které produkují hormon kalcitonin. Kalcitonin se podílí na snižování hladiny vápníku v krvi a potlačuje resorpci z kostí [6].

1.2.1 Nádory štítné žlázy

Nádory štítné žlázy rozdělujeme podle stejných kritérií jako v jiných lokalizacích na benigní a maligní.

Benigní nádory štítné žlázy jsou poměrně časté, přičemž naprosto převažujícím je folikulární adenom štítné žlázy. Je to benigní nádor epitelového původu, který je opouzdřený tkání štítné žlázy a dosahuje různé velikosti. Jeho schopnost syntetizovat hormony štítné žlázy je oproti okolní štítné žláze nízká [10]. V některých adenomech jsou přítomny oxyfilní buňky s granulovanou cytoplazmou (Hürtleho buňky), které se vyznačují vysokým zastoupením mitochondrií. Specifickým typem adenomu štítné žlázy je tzv. toxický adenom, který je na rozdíl od většiny nádorů hormonálně aktivní a vyvolává tyreotoxikózu.

Maligní nádory štítné žlázy jsou poměrně vzácné. Hlavním zástupcem této skupiny nádorů štítné žlázy je karcinom štítné žlázy. Jedná se o epitelový maligní nádor vycházející z buněk epitelu folikulů štítné žlázy[10], kromě medulárního karcinomu, který se odvozuje od parafolikulárních buněk (C- buněk) štítné žlázy[6,11]. Typy karcinomů vyskytujících se v štítné žláze [6]:

- **Papilární karcinomy:** Mohou vést ke zvětšení štítné žlázy. Většina nádorů roste ve žláze, nebo tvoří metastázy v krčních lymfatických uzlinách. Je možné je identifikovat přítomností papilárních struktur s buňkami, které mají v jádru jemně rozptýlený chromatin (matricová jádra). Další významnou cytologickou známkou je překrývání jader sousedních buněk.
- **Folikulární karcinomy:** V diferencovaných nádorech se strukturně podobá adenomu. Pro stanovení tohoto karcinomu je důležitý nález invaze nádorů do cév a prorůstání vazivového pouzdra nádorem.
- **Medulární karcinomy:** Odvozují se od C-buněk, přičemž nádor se může vyskytovat v podobě soliterního nádorového uzlu v jednom laloku, nebo může postihovat oba laloky současně.
- **Anaplastické karcinomy:** Patří k nejagresivnějším nádorům. Tvoří se převážně u starších osob a jsou poměrně vzácné.

Papilární, folikulární a medulární karcinomy se vyznačují pomalým růstem, kdežto anaplastické karcinomy jsou většinou rychle a invazivně se šířící[11].

1.3 Léčba rakoviny

Nádorová onemocnění jsou známa již z doby prehistorické, no větší pozornosti se jim dostalo teprve v průběhu minulého století. Až do 20. let 20. století byla jedinou možností léčba chirurgickým zákrokem[12].

Chirurgického zákroku se využívá zejména pro odstranění většiny tuhých nádorů[1,4]. Zavedení různých zobrazovacích technik, jako například MRI (z angl. magnetic resonance imaging), CT (z angl. computed tomography), nebo ultrazvuku umožnilo zvolit individuální přístup k chirurgické léčbě daného nádoru[4]. Po odstranění nádoru touto metodou je možné provést rozbor tkáně, a určit zda byl tumor odstraněn úplně. Odstranění co největšího množství nádorů snižuje šanci opětovného vzniku rakoviny [1]. Chirurgický zákrok se může skládat z několika částí [11]:

- Biopsie tkáně pro stanovení diagnózy
- Odstranění maligního tkaniva spolu s částí zdravé tkáně
- Znovunastolení plnohodnotné funkčnosti. To se může pohybovat od uzavření primární rány, až po rekonstrukci kostí a měkké tkáně.

V závislosti na tom, jak moc je daný tumor rozvinutý je možné kombinovat chirurgickou léčbu s chemoterapií, nebo radioterapií.

Léčba chemoterapií je systematický proces a zaměřuje se především na kontrolu šíření metastáz [13]. Začátky léčby touto metodou se datují do 40. let minulého století, kdy došlo k objevu alkylačních látek. V průběhu následujících 20 let se však chemoterapie dostala mezi nejužívanější metody léčby nádorových onemocnění[12]. V průběhu chemoterapie jsou pacientovi podány léky (cytostatika), které mají za úkol likvidovat rakovinné buňky, které v těle zůstaly po chirurgickém zákroku. Využívají se rozličné léky a často se volí i jejich kombinace[1]. Cytostatika mají na rozdíl od ostatních léčiv velmi malou terapeutickou šíři a omezenou stabilitu po převedení do roztoku. Pacienti mají také různou rychlost metabolismu daného cytostatika, což může zapříčinit výskyt nežádoucích účinků[14]. Léčiva používané při chemoterapii můžeme rozdělit do následujících skupin[11]:

- Léky působící na strukturu DNA (antimetabolity, alkylační látky, interkalační činidla, inhibitory topoizomeras)
- Léky ovlivňující průběh mitózy (vincristine, vinblastine, paclitaxel)
- Léky způsobující apoptózu (bortezomib)
- Inhibitory přenosu signálu (imatinib, gefitinib)

Obecně platí, že nádorové buňky chemosenzitivních nádorů, jsou více náchylné na apoptické stimuly než buňky zdravých tkání. To při chemoterapii vede k upřednostnění eliminace nádorových buněk. Díky preferenci dělicích se buněk však mohou být do značné míry likvidovány také zdravé buňky s vysokou mitotickou aktivitou. Nádorové buňky mají obvykle delší trvání buněčného cyklu oproti buňkám zdravým. Zdravá buněčná populace je tedy schopná rychlejší regenerace. Tato skutečnost umožňuje provádění chemoterapie v pravidelných intervalech, což výrazně přispívá k eliminaci co největšího množství nádorových buněk[12].

Některé léky jako například cisplatina, nebo 5-fluorouracil můžou vykazovat synergický efekt v kombinaci s radioterapií[13].

Radioterapie využívá působení ionizujícího záření k léčbě nádorových onemocnění. Ionizující záření mohou poskytovat rentgenové paprsky, paprsky elektronů, beta, nebo gama záření produkované při rozkladu radioaktivních izotopů [11]. Radiace zabíjí buňky tím, že poškozuje jejich DNA, přičemž všechny buňky vystavené působení záření budou poškozené. Radioterapie se většinou provádí působením externího záření na tkáň obsahující tumor. Takto cílenou radioterapii je možné aplikovat pouze tehdy, kdy je nádor přístupný pro paprsek daného záření a nenachází se v blízkosti důležité tkáně, která by mohla být působením záření poškozena[1].

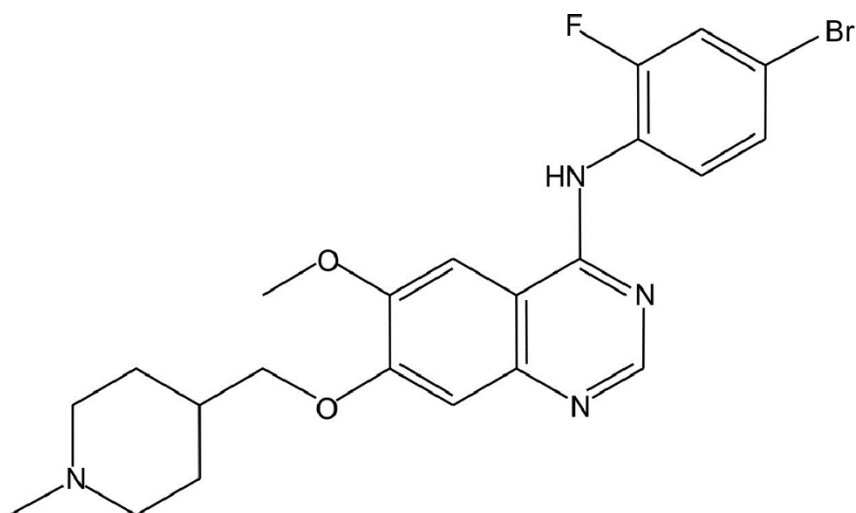
Při cílené terapii se využívají takové látky, které zabraňují růstu a šíření rakoviny tím, že interagují se specifickými molekulami, které se účastní nádorového bujení. První látkou z této skupiny léčiv, která prokázala klinický význam, byla monoklonální protilátka rituximab. Cílem jeho působení je protein CD20, který je exprimován u více než 95% lymfomů B buněk. V roce 1997 byl rituximab schválen Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Dokázalo se tak, že monoklonální protilátky jsou schopny efektivně a hlavně šetrněji, oproti konvenční chemoterapii, léčit nádorová onemocnění[15].

1.4 Inhibitory tyrosinkinas

Široká škála tyrosinkinas představuje klíčový cíl při léčbě rakoviny. Průlomem ve vývoji těchto léčiv bylo v roce 2000 schválení imatinibu[12,15]. Jeho cílem je inhibice chimérického fúzního onkoproteinu BCR-ABL, tím že zablokuje jeho vazebné místo pro ATP. Znemožní tak fosforylaci proteinů, které spouštějí signální dráhy vedoucí k zvýšené proliferaci a blokaci apoptózy[12]. Od objevení imatinibu bylo FDA schváleno více než 25 inhibitorů tyrosinkinas. Tyto látky poskytují zřetelné výhody oproti mnohým monoklonálním protilátkám. Jako příklad lze uvést nižší výrobní náklady, komfortní orální podání, nebo také schopnost cíleně působit na větší množství signalizačních drah[15].

1.4.1 Vandetanib

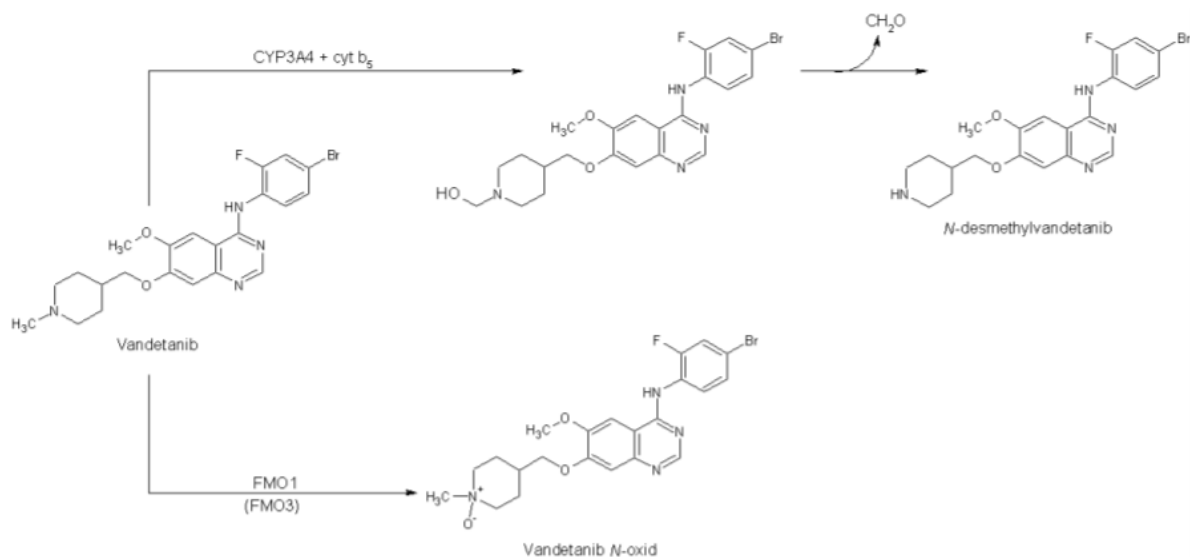
Vandetanib (Caprelsa, ZD6474, Zactima, *N*-(4-bromo-2-fluorophenyl)-6-methoxy-7-[(1-methylpiperidin-4-yl)methoxy]quinazolin-4-amine) (viz. Obr. 2, s. 15) je protinádorové léčivo, působící jako inhibitor tyrosinkinas. Vyznačuje se selektivitou vůči receptorům vaskulárního endoteliálního růstového faktoru 2 (VEGFR-2), receptorům epidermálního růstového faktoru (EGFR) a inhibuje také tyrosinkinasovou aktivitu přesmyku během transfekce (RET). Všechny tyto receptory jsou součástí signalizačních drah zabezpečujících angiogenezi a nádorový růst[16]. Vandetanib se využívá na léčbu medulárního karcinomu štítné žlázy[17]. Léčba vandetanibem je obvykle pacienty dobře tolerována, ale v některých případech se mohou objevit zdravotní komplikace. Mezi nejběžnější vedlejší účinky patří například bolest hlavy, průjem a zvracení[18].



Obrázek 2: Strukturální vzorec vandetanibu, převzato a upraveno [19]

1.4.1.1 Metabolismus vandetanibu

I když metabolismus inhibitorů tyrosinkinas byl doposud jen částečně objasněn, metabolismus vandetanibu byl zkoumán zejména firmou AstraZeneca[20], která zároveň stojí za vývojem tohoto léčiva[21]. Ukázalo se, že oxidace vandetanibu jak u lidí, tak u experimentálních zvířecích modelů, poskytuje stejné produkty. Za hlavní metabolity se považují N-desmethylvandetanib a vandetanib-N-oxid, které byly stanoveny v plazmě, moči a stolici lidí a také experimentálních zvířat [22]. Studie provedeny firmou AstraZeneca prokázali, že hlavními enzymy účastnící se metabolismu vandetanibu jsou cytochromy P450 3A4 (CYP3A4) a flavinmonooxygenasy (FMO)[23]. V myších, potkanech a také u lidí byl identifikován glukuronidový konjugát, O-desmethylvandetanib glukuronid, jako minoritní metabolit druhé fáze biotransformace[20,24]. Zatímco CYP 3A4 je u lidí považován za hlavní enzym oxidující vandetanib na N-desmethylvandetanib (N-demethylace), FMO exprimované v lidských játrech (FMO3) a ledvinách (FMO1) jsou zodpovědné za tvorbu vandetanib N-oxidu (N-oxidace) (viz. Obr. 3, s. 16)[20]. Jak N-desmethylvandetanib, tak i vandetanib N-oxid prokázaly *in vitro* farmakologickou aktivitu pro vaskulární endoteliální růstový faktor a epidermální růstový faktor. N-desmethylvandetanib vykazuje podobnou účinnost jako vandetanib, ale vandetanib N-oxid je 50 × méně aktivní[23].



Obrázek 3: Metabolismus vandetanibu pomocí CYP 3A4 za přítomnosti cytochromu b5 (N-demethylace), kdy v prvním kroku dochází k α-C-hydroxylaci. Vzniklý meziprodukt se následně rozpadá na formaldehyd a N-desmethylvandetanib. V druhém případě je znázorněn vznik vandetanib N-oxidu pomocí FMO1/ FMO3 (N-oxidace). Převzato a upraveno[20]

1.5 Biotransformace xenobiotik

Pod pojmem xenobiotika rozumíme cizorodé látky, které vstupují do organismu a nemají žádnou fyziologickou funkci[25]. Cílem biotransformace xenobiotik je jejich přeměna na metabolity, které jsou lépe odstraňovány z organismu. Biotransformací ale může také dojít k aktivaci xenobiotika. Aktivace pro-léčiv za vzniku účinných léčiv je příkladem aktivace xenobiotika s pozitivním vlivem na organismus. Naopak negativní dopad na organismus má aktivace, při které vznikají z původně neškodných látek, toxické metabolity. Hlavními místy, kde dochází k biotransformaci, jsou játra a intestinální trakt, ale může k ní docházet i v plicích, nebo ledvinách[26]. Biotransformační reakce bývají rozdělené do dvou fází.

1.5.1 První fáze biotransformace

První fáze biotransformace, také označovaná jako konverze, zahrnuje především oxidační, redukční a hydrolytické reakce[25]. Cílem této fáze je zvýšení polárního charakteru daného xenobiotika tím, že se do něj zavádí, nebo jsou odkrývány funkční skupiny (-OH, -SH, -NH₂). Tyto funkční skupiny pak mohou vystupovat v druhé fázi biotransformace jako místo konjugace[26].

1.5.2 Druhá fáze biotransformace

V druhé fázi biotransformace dochází ke konjugaci xenobiotika upraveného v první fázi s endogenní sloučeninou (UDP-glukuronová kyselina, glutathion, aminokyseliny)[25,26]. Některé xenobiotika jsou schopny vstoupit přímo do druhé fáze, bez toho aby musely být upraveny v první fázi[26].

Velké množství xenobiotik je metabolizováno v několika krocích, než je organismus schopen jejich eliminace. I strukturně poměrně jednoduché xenobiotika mohou být

přeměňovány řadou různých enzymů např. acetanilid. Biotransformační dráhy mohou být někdy obousměrné. Například oxidací terciárního aminu působením flavinmonooxygenas (FMO) vzniká N-oxid. Produkt této reakce může být díky reduktasové aktivitě cytochromu P450 redukován zpět na výchozí terciární amin. Obousměrný charakter vykazuje také hydrolytické štěpení konjugátů z druhé fáze biotransformace na původní xenobiotikum[25].

1.6 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) patří mezi hemoproteiny. Jsou to pigmenty[27], které v redukovaném stavu a při navázání oxidu uhelnatého vykazují v UV-VIS (z ang. ultraviolet-visible) spektru absorpční maximum při 450 nm, na základě čehož byla tato nadrodina hemoproteinů pojmenována[25,28]. Savčí cytochromy P450 hrají důležitou roli v metabolismu jak endogenních látek, tak xenobiotik[28]. Cytochromy P450 jsou kromě jejich významu z hlediska metabolismu látek, zajímavé také pro vysoký počet substrátů, katalytických aktivit a indukovatelností. Vyskytují se ve vysokém počtu isoformech a byly stanoveny zatím ve všech eukaryotních organismech[25].

V lidském genomu se vyskytuje kolem 57 genů kódujících cytochromy P450, přičemž 18 z nich jsou schopné metabolizovat xenobiotika[25,28]. Cytochromy P450 se účastní metabolismu 70-80% všech léčiv[28].

1.6.1 Klasifikace cytochromů P450

Na základě lokalizace v buňce můžeme cytochromy P450 rozdělit do tří kategorií[28]:

- Mitochondriální cytochromy P450- Jsou odpovědné za metabolismus steroidů
- Mikrosomální cytochromy P450- Jsou vázány k endoplazmatickému retikulu
- Rozpustné cytoplazmatické cytochromy P450- Převážně se vyskytují v prokaryotech

Na základě podobnosti v sekvenci aminokyselin apoproteinu se nadrodina cytochromů P450 člení na rodiny, podrodiny a isoformy.

Do jedné rodiny patří proteiny, které se shodují v 40% aminokyselinové sekvenci. Číslo příslušné rodiny se uvádí na prvním místě v názvu. Pokud je shoda v sekvenci aminokyselin vyšší než 60-70 %, zařazují se dané proteiny do jedné podrodiny. Podrodina je v názvu daného cytochromu označovaná velkým písmenem za číslem rodiny. Konkrétní isoforma se zapisuje číslem na třetím místě za písmenem podrodiny.

Isoformy se liší v aminokyselinové sekvenci, což má za následek rozličnou preferenci určitých substrátů, nebo citlivost vůči konkrétním inhibitorům. Může však nastat situace kdy je jeden substrát biotransformován pomocí několika cytochromů P450. Někdy je dokonce možné, že substrát metabolizován různými isoformami dává vzniknout jednomu produktu.

Zastoupení jednotlivých isoformech se mezi jednotlivými organismy liší. Pozorování mezidruhové substrátové selektivity různých isoformech poukazuje na to, že některé podrodiny jsou značně konzervativní (1A, 2E). To znamená, že substrátová selektivita je zachována i u druhů, které jsou od sebe evolučně vzdálené.

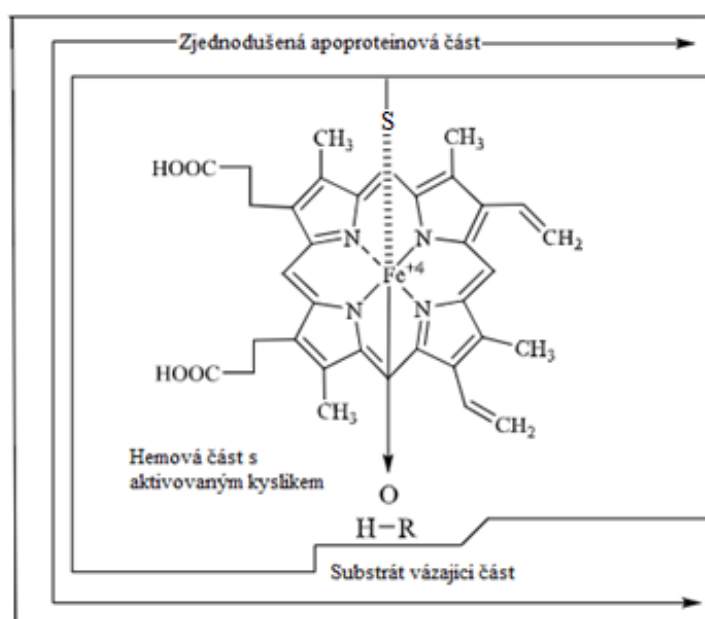
Většina isoformech však vykazuje značné rozdíly v aktivitě, afinitě a zastoupení. Tyto rozdílné vlastnosti a zastoupení jednotlivých CYP mají za následek odlišnosti ve funkcích jednotlivých isoformech na metabolismu xenobiotik u různých druhů organismů [25].

Cytochromy, které se účastní metabolismu xenobiotik, patří do CYP1, CYP2 a CYP3 rodin. Tyto rodiny navíc vykazují částečně se překrývající substrátovou specifitu. Většina léčiv je biotransformována pomocí CYP3A4, 2D6, 2C9, 2C19 a 1A2[28].

1.6.2 Struktura cytochromu P450

Prokaryotní CYP se nacházejí volně rozpuštěné v cytosolu. U vyšších organizmů jsou lokalizovány zejména na hladkém endoplasmatickém retikulu a v menší míře také v membránách mitochondrií[25,29]. Cytochromy P450 vyskytující se u eukaryot mají strukturu relativně kompaktního trojbokého hranolu ukotveného na membráně, přičemž je orientován do cytosolu.

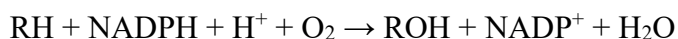
Apoprotein je tvořen jedním polypeptidovým řetězcem (45-55 kDa) a protoporphyrinem IX, který obsahuje koordinované železo (viz. Obr. 4). Atom železa je lokalizován v centru protoporphyrinového kruhu, ke kterému je vázán pomocí čtyř ligandů. Thiolátový anion z cysteinu apoproteinu představuje pátý axiální ligand. Jako šestý ligand bývá koordinována molekula vody [25].



Obrázek 4: Zjednodušená struktura CYP. Atom železa je koordinován čtyřmi vazbami s protoporphyrinovým kruhem. Pátou vazbu tvoří s thiolátovým anionem cysteinu apoproteinu. Šestou vazbu tvoří s reaktivní formou kyslíku, která reaguje se substrátem. Převezato a upraveno[27].

1.6.3 Katalytický mechanismus cytochromů P450

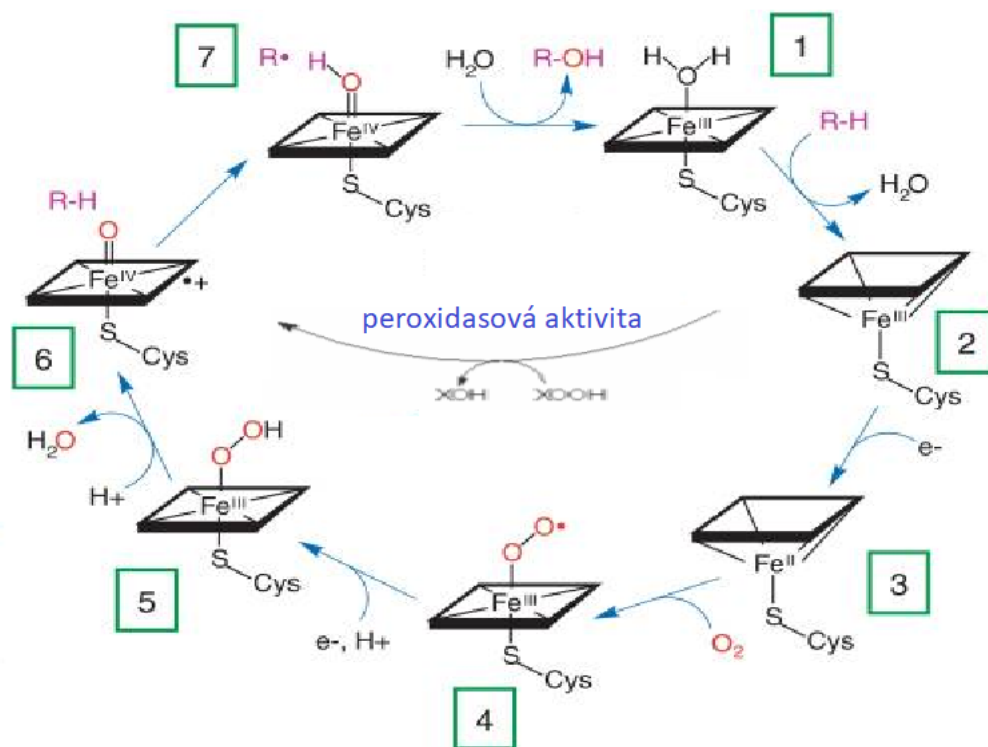
CYP se zařazují mezi monooxygenasy. Cytochromy P450 vystupují jako terminální oxidasy v podskupině monooxygenas, zvané oxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí[29]. Monooxygenasy vážou vzdušný kyslík, který štěpí, přičemž jeden atom kyslíku inkorporují do molekuly hydrofobního substrátu a druhý atom je redukován na vodu. Mechanismus monooxygenasové aktivity CYP vůči substrátu (RH) je možné souhrnně zapsat následovně[30]:



Jako kofaktor, poskytující elektrony pro redukci CYP, je využíván NADPH. Přenos elektronů je umožněn spoluúčastí enzymu NADPH:CYP reduktasa. Tento enzym o molekulové hmotnosti kolem 80 kDa, obsahuje ve své molekule jak flavinadeninindinukleotid (FAD), tak flavinmononukleotid (FMN). Přítomnost těchto složek umožňuje enzymu působit jako dělič elektronového páru a redukovat tak CYP ve dvou krocích.

Kromě NADPH:CYP reduktasy umožňuje přenos elektronů na CYP také systém cytochromu b₅ a cytochrom b₅ reduktasy. Na rozdíl od NADPH:CYP reduktasy využívá tato dvojice jako kofaktor NADH a nikoli NADPH[25,29].

Samotný reakční cyklus cytochromů P450 je víceřadový proces (viz. Obr. 5, s. 20), který probíhá uspořádaným mechanismem. V klidovém stavu je hemové železo trojmocné (ferri forma). Zároveň je hexakoordinované, nachází se tedy v nízkospinovém stavu. Šestou vazbu může tvořit buď s kyslíkem vody, nebo inertním ligandem. Ve chvíli kdy vnikne substrát do aktivního místa enzymu, dochází k vytěsnění šestého ligandu železa. Dochází tak ke konformační změně enzymu a železo se stává pentakoordinované, tedy přechází do vysokospinového stavu. Navázání substrátu umožní jednoelektronovou redukci CYP interakcí s NADPH:CYP reduktasou. Hemové železo se tedy redukuje z trojmocného na dvojmocné (ferro forma), zůstává však pořád pentakoordinováno. V této formě může enzym vázat molekulární kyslík, ale také jiné ligandy. Pokud dojde k navázání molekulárního kyslíku, tvoří se ternární ferri-superoxidový komplex, ve kterém je železo opět hexakoordinované a v nízkospinovém stavu [29]. Tento komplex je následně redukován NADPH:CYP reduktasou, nebo také NADH:cytochrom b₅ reduktasou[25,29]. Kyslík je tak aktivován ve formě peroxidového anionu. Takto vzniklý komplex CYP s biatomickou molekulou kyslíku po proběhnutí druhé redukce, je zcela aktivní forma CYP. Dochází v ní k rozštěpení vazby mezi atomy kyslíku. Jeden atom kyslíku je redukován na vodu a druhý zůstává vázán na železo hemu ve formě ferrioxenového komplexu. Tento komplex je stabilizován pomocí mezomerního posunu elektronu z thiolátové síry cysteinu na kyslík. Následně je z molekuly substrátu vytrhnutý vodíkový atom působením vzniklého kyslíkového radikálu. Vzniká tak radikál substrátu a hydroxylový radikál vázaný na hemové železo. Rekombinací těchto dvou radikálů vzniká hydroxyderivát substrátu, který enzym opouští a nativní forma CYP[29].



Obrázek 5: Schéma katalytického mechanismu cytochtomu P450. Převzato a upraveno[31,29]. (1) Aktivní místo CYP v klidovém stavu s navázanou molekulou vody. (2) Molekula vody je vytěsněna substrátem a dochází ke změně konformace enzymu. (3) Přijetí elektronu se trojmocné železo redukuje na dvojmocné. (4) Molekula kyslíku se váže na železo aktivního centra. (5) Redukce ferrisuperoxidového komplexu. (6) Rozštěpení vazby mezi atomy kyslíku. Jeden atom kyslíku je redukován a eliminován ve formě vody. Druhý atom tvoří ferrioxenový komplex. (7) Oxidace a následné vytěsnění substrátu z enzymu, který se vrací do nativní konformace.

Za přítomnosti oxidačních činidel (organické hydroperoxydy), vykazují cytochromy P450 peroxidasovou aktivitu. Dochází tak k tzv. peroxidasové zkratce, kdy se z komplexu 2 dostáváme rovnou do kroku 6 (viz. Obr. 5). Tato reakce probíhá neuspořádaným mechanismem. Vazba peroxidu tedy není závislá na vazbě substrátu[25,29]. Pokud je přítomen substrát, dochází k zavedení atomu kyslíku z hydroperoxidu do jeho molekuly[25]. Oxidace substrátů peroxidasovou aktivitou má oproti oxidaci za přítomnosti NADPH a kyslíku obvykle nižší účinnost[29]. Tuto sníženou účinnost způsobují reaktivní fragmenty degradovaného hemu, které vznikají při působení například H_2O_2 na hem cytochromu P450. Tyto fragmenty se kovalentně vážou do aktivního centra enzymu a ireverzibilně ho tak inaktivují[32].

1.7 Flavinmonooxygenasy

Flavinmonooxygenasy (FMO) jsou stejně jako cytochromy P450 monooxygenasami [29]. Jsou to membránové proteiny, které se vyskytují na hladkém endoplasmatickém retikulu. K nejvýraznější expresi dochází v játrech, ale jsou přítomny také v jiných tkáních[25]. Lidský genom obsahuje pět funkčních genů kódujících FMO, konkrétně FMO1, FMO2, FMO3, FMO4 a FMO5. Existuje také šestý gen kódující FMO6, který však neposkytuje správně upravenou mRNA a je proto považován za pseudogen[33].

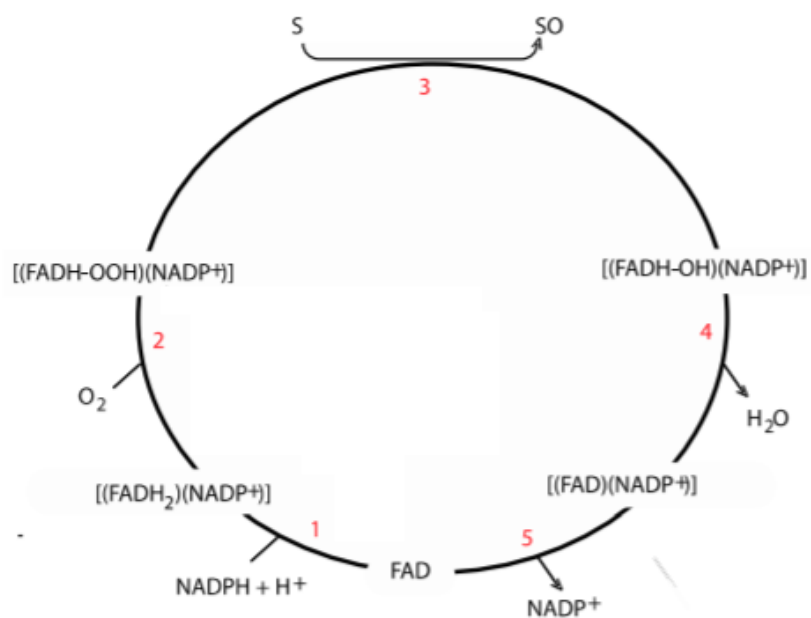
1.7.1 Katalytický mechanismus flavinmonooxygenas

I když FMO stejně jako CYP patří do skupiny monooxygenas, mechanismy jejich katalytického účinku se od sebe liší. Flavinmonooxygenasy obsahují jako prostetickou skupinu flavinadenin nukleotid (FAD). Pro katalytickou aktivitu vyžadují přítomnost NADPH jako kofaktoru a kosubstrátu v podobě kyslíku. FMO katalyzují oxidaci substrátů, které obsahují ve své struktuře nukleofilní heteroatomy. Nejčastější heteroatomy vyskytující se v molekule substrátu jsou dusík a síra, méně časté jsou fosfor, nebo selen[25,33].

Na rozdíl od CYP, FMO jsou schopny přijímat elektrony přímo z NADPH, tedy nevyžadují přítomnost žádného dodatečného proteinu při oxidaci substrátu. Jako další rozdíl je možné uvést to, že FMO interagují se substrátem pouze v jednom reakčním kroku[25]. FMO jsou schopny aktivovat kyslík ve formě stabilního C4a-hydroperoxyflavinu (FADH-OOH), bez přítomnosti navázaného substrátu (viz. Obr.6, str. 22)[33,34].

V prvním kroku cyklu dochází k navázání NADPH na molekulu enzymu a následné dvouelektronové redukci FAD na FADH₂. Poté se molekulární kyslík váže na redukováný flavin za vzniku C4a-hydroperoxyflavinu, který je stabilizován NADP⁺. Ve třetím kroku vstupuje substrát do aktivního místa enzymu, kde je oxidován, přičemž dává vzniknout C4a-hydroflavinu (FADH-OH)[33]. Tento nukleofilní atak substrátu na C4a-hydroperoxyflavin vede k tomu, že jeden atom molekulového kyslíku je přenesen do molekuly substrátu a druhý atom tvoří vodu[34]. Dále je voda z C4a-hydroflavinu uvolněna, čímž dochází k regeneraci FAD. V posledním kroku dochází k uvolnění NADP⁺.

Za rychlost určující kroky při reakcích katalyzovaných FMO jsou považovány uvolnění vody z FADH-OH a uvolnění NADP⁺[33,34].



Obrázek 6: Schéma katalytického mechanismu flavinmonooxygenas. Převzato a upraveno[33].(1) NADPH se váže k enzymu a redukuje FAD. (2) Vazba molekulárního kyslíku a jeho následná redukce za tvorby C4a-hydroperoxyflavinu. (3) Oxidace substrátu (S) dává vzniknout C4a-hydroflavinu. (4) Uvolnění vody a regenerace FAD. (5) Uvolnění NADP⁺.

2 Cíl práce

Tato bakalářská práce měla za cíl studovat vliv pH na oxidaci vandetanibu cytochromy P450 a flavinmonooxygenasami potkaních jaterních mikrosomů. Úkolem bylo nalezení pH optima metabolismu vandetanibu jak pomocí cytochromů P450, tak flavinmonooxygenas.

3 Materiál a metody

3.1 Přístroje

Analytické váhy Discovery	Ohaus, Švýcarsko
Automatické pipety Research plus	Eppendorf, Německo
Centrifuga Centrifuge 5418 (uhlový rotor)	Eppendorf, Německo
HPLC systém Ultimate 3000:	Thermo Scientific Dionex
• Čerpadlo: RS Pump	
• Vzorkovač: RS Autosampler	
• Termostat: RS Column Compartment	
• UV/VIS detektor: RS Diode Array Detector	
• Detektor fluorescence: RS Fluorescence Detector	
Inkubátor: Thermomixer Compact	Eppendorf, Německo
Kolona: Nucleosil 100-5, C18, 5 µm, 4,6 × 250 mm	Macherey Nagel, Německo
Rotačná vakuová odparka Labconco	CentriVap Concentrator, USA
Sonikátor Elmasonic E30H	P-lab, Česká republika
Vortex mixer	Labnet, USA

3.2 Chemikálie a biologické materiály

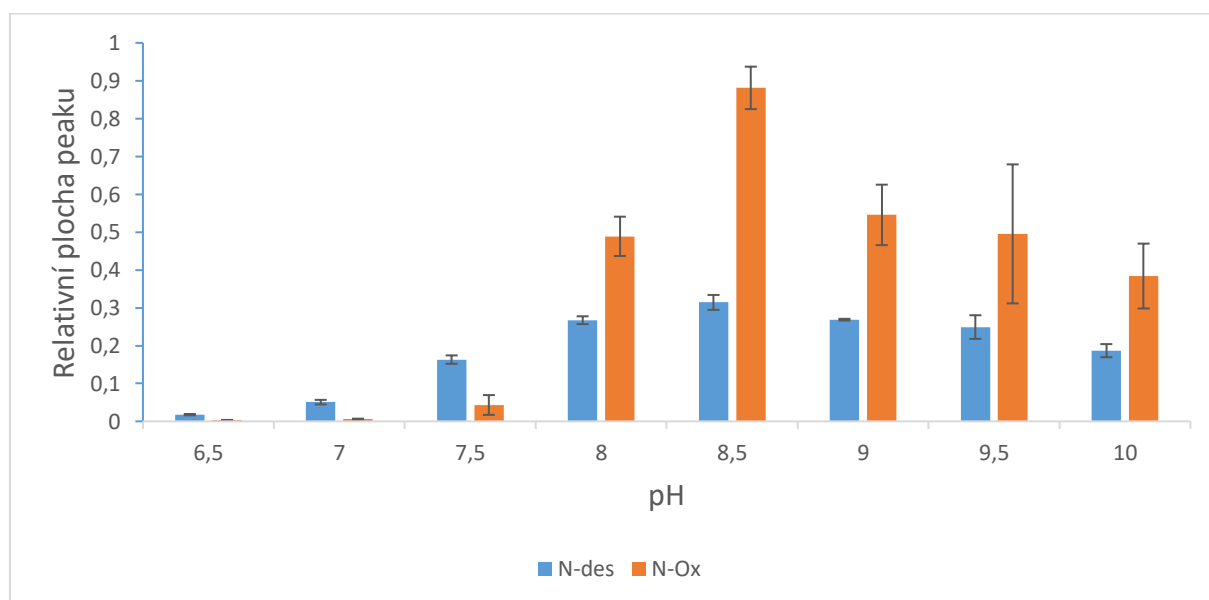
Acetonitril – HPLC Far UV-Gradient grade	VWR, USA
Dichlormethan G. R.	Lachner, Česká republika
DMSO pure (Dimethylsulfoxid)	Lachner, Česká republika
Ethylacetát	Lachner, Česká republika
Fenacetin	Sigma Aldrich, USA
KH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	Lachner, Česká republika
Methanol	VWR, USA
NADPH	Sigma Aldrich, USA
Potkaní jaterní mikrosomy s induktorem:	
• Sudan I; 30,1 mg/ml proteinů mikrosomální frakce	
• fenobarbital; 29,4 mg/ml proteinů mikrosomální frakce	
• pregnenolon-16α-karbonitril; 25,7 mg/ml proteinů mikrosomální frakce	
• ethanol; 21,6 mg/ml proteinů mikrosomální frakce	
• bez přidaného induktoru (kontrola); 36,8 mg/ml proteinů mikrosomální frakce	
Vandetanib	LC laboratories, USA

4 Výsledky

4.1 Vliv pH na oxidaci vandetanibu cytochromy P450 a flavinmonooxygenasamy obsažených v potkaních jaterních mikrosomech bez přidaného induktoru

Pro tuto sérii měření byly použity potkaní jaterní mikrosomy bez přidaného induktoru. V potkaních játrech jsou za běžných podmínek produkovány hlavně cytochromy 2C podrodiny (přibližně 55% ze všech CYP), v menším množství pak CYP2E1, CYP 3A, 2D, 2A, 2B a 1A[35]. Ze zjištění R. Indry[16], lze předpokládat, že v této sérii se nejvíce na N-demethylaci vandetanibu podíleli cytochromy podrodiny 2C, zejména CYP2C11 isoforma a v menší míře cytochromy P450 podrodiny 3A. Z FMO je v potkaních játrech nejvíce zastoupený enzym FMO1 a připisuje se mu také největší vliv na produkci vandetanib N-oxidu[16].

Maximální množství vznikajícího N-desmethylvandetanibu (N-des) a vandetanib N-oxidu (N-ox) bylo v této sérii pozorováno při pH 8,5 pro oba metabolity (viz. Obr. 7).



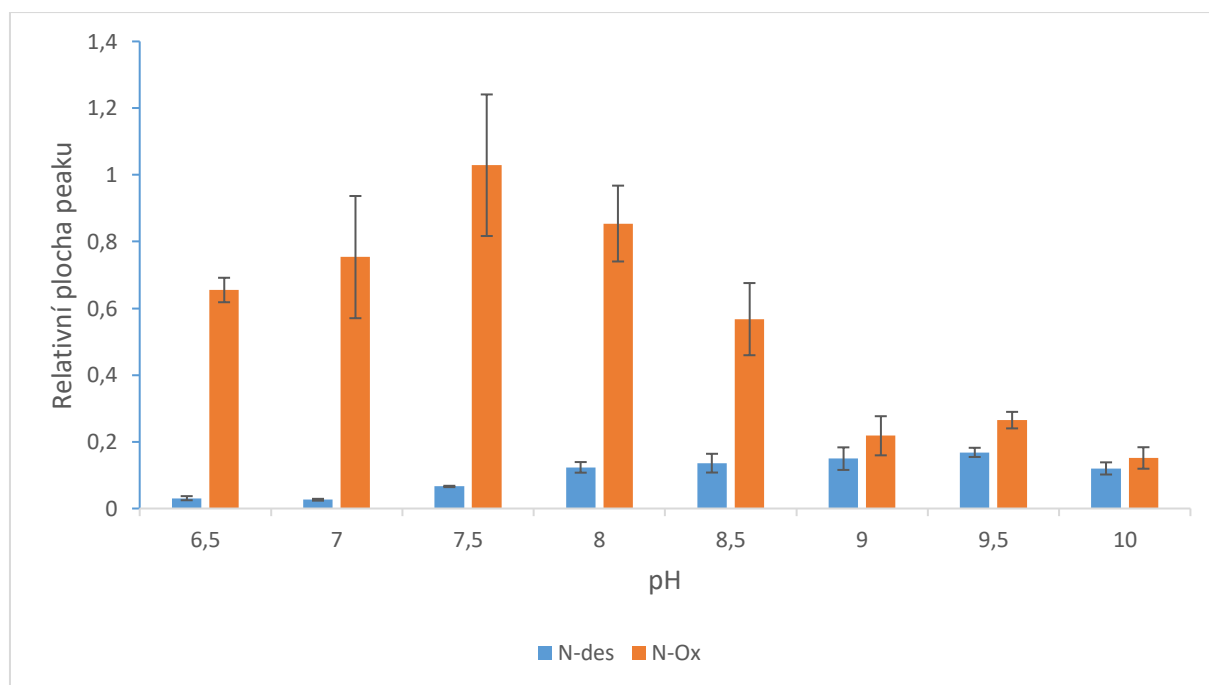
Obrázek 7: Hodnoty relativních ploch peaků (vztažené k fenacetinu) N-desmethylvandetanibu a vandetanib N-oxidu při uvedených hodnotách pH, pro sérii využívající neindukované mikrosomy. Použité hodnoty relativních ploch peaků pro oba produkty oxidace vandetanibu jsou aritmetickými průměry tří paralelních měření, pro které je uvedena také směrodatná odchylka.

4.2 Vliv pH na oxidaci vandetanibu cytochromy P450 a flavinmonooxygenasamy obsažených v potkaních jaterních mikrosomech indukovaných Sudanem I

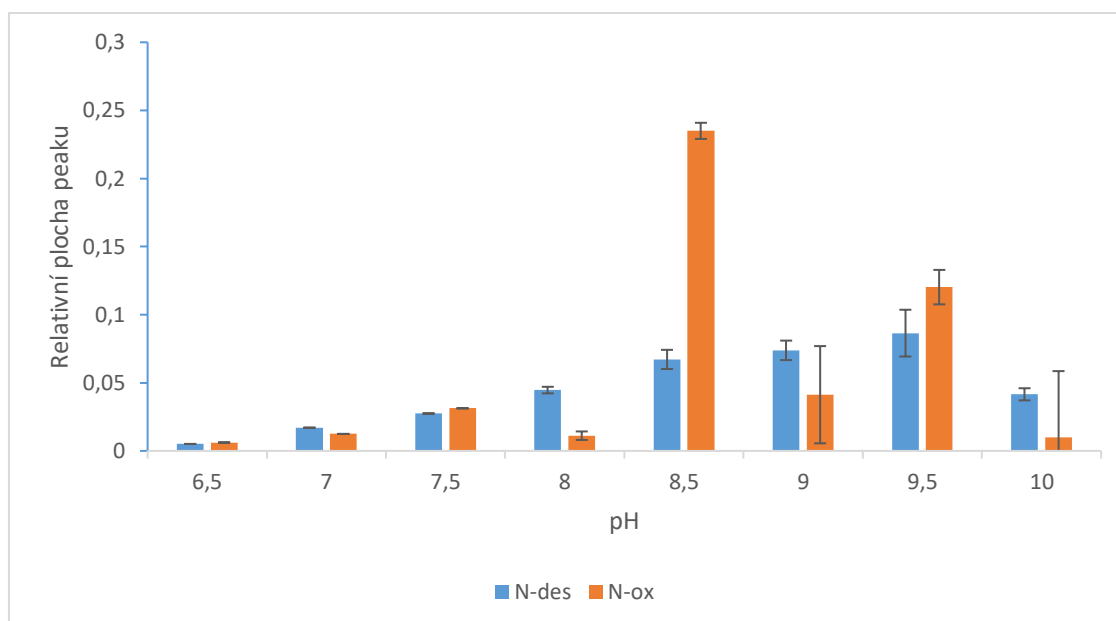
V této sérii byli použity potkaní jaterné mikrosomy, do kterých byl přidán Sudan I (fenylazo-2-naftol). Účelem byla indukce exprese genů pro CYP1A1, který je majoritním enzymem účastnícím se metabolismu tohoto azobarviva [36]. V menší míře se CYP1A1 rovněž podílí na oxidaci vandetanibu za vzniku N-desmethylvandetanibu [20]. Sudan I je odpovědný také za indukci cytochromu b₅[37], který se přirozeně vyskytuje v potkaních jaterních mikrosomech[38].

Z naměřených hodnot (viz. Obr. 8 a Obr. 9, s. 28) je možné vidět nárůst množství vznikajícího N-desmethylvandetanibu (N-des) až po hodnotu pH 9,5 při obou použitých extrakčních činidlech.

Maximální množství vyprodukovaného vandetanib N-oxidu (N-ox) je pozorováno při pH 7,5 za použití ethylacetátu (viz. Obr. 8). Při použití dichlormethanu jako extrakčního činidla, je však největší množství tohoto produktu pozorováno při pH 8,5 (viz. Obr. 9, s. 28), co se víc přibližuje výsledkům dalších sérií.



Obrázek 8: Hodnoty relativních ploch peaků (vztažené k fenacetinu) N-desmethylvandetanibu a vandetanib N-oxidu při uvedených hodnotách pH, využívající mikrosomy indukované Sudanem I a extrakční činidlo ethylacetát. Použité hodnoty relativních ploch peaků pro oba produkty oxidace vandetanibu jsou aritmetickými průměry tří paralelních měření, pro které je uvedena také směrodatná odchylka.

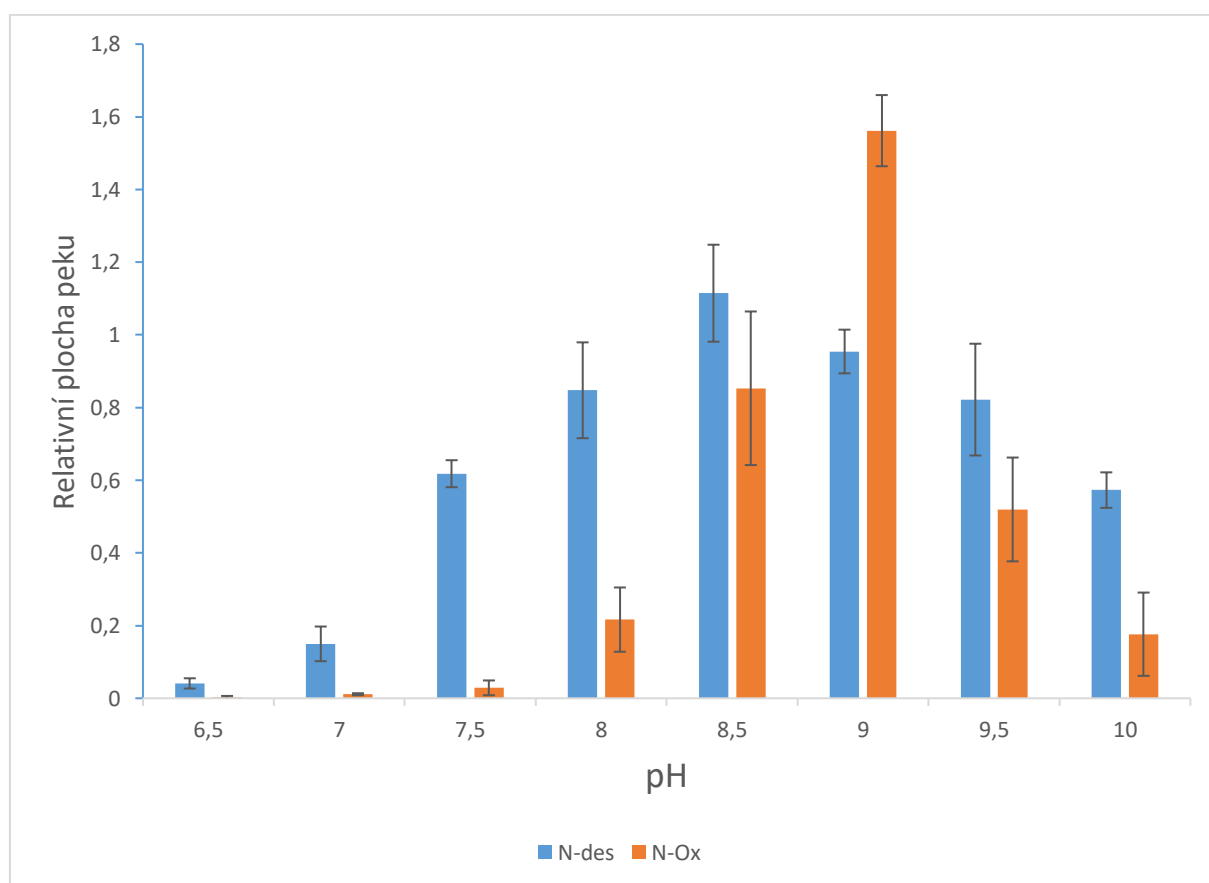


Obrázek 9: Hodnoty relativních ploch peaků (vztažené k fenacetinu) *N*-desmethylvandetanibu a vandetanib *N*-oxidu při uvedených hodnotách pH, využívající mikrosomy indukované Sudanem I a extrakční činidlo dichlormethan. Použité hodnoty relativních ploch peaků pro oba produkty oxidace vandetanibu jsou aritmetickými průměry tří paralelních měření, pro které je uvedena také směrodatná odchylka.

4.3 Vliv pH na oxidaci vandetanibu cytochromy P450 a flavinmonooxygenasamy obsažených v potkaních jaterních mikrosomech indukovaných fenobarbitalem

V této sérii měření byli použity potkaní jaterní mikrosomy s přidaným fenobarbitalem. Fenobarbital byl použit za účelem indukce zejména CYP2B podrodiny a v menší míře také CYP3A[39] a CYP 2C [16].

Z naměřených hodnot relativních ploch peaků (viz. Obr. 10) je patrné, že množství vzniklého N-desmethylvandetanibu (N-des) roste do pH 8,5. Množství vandetanib N-oxidu (N-ox) přibývá až do pH 9.

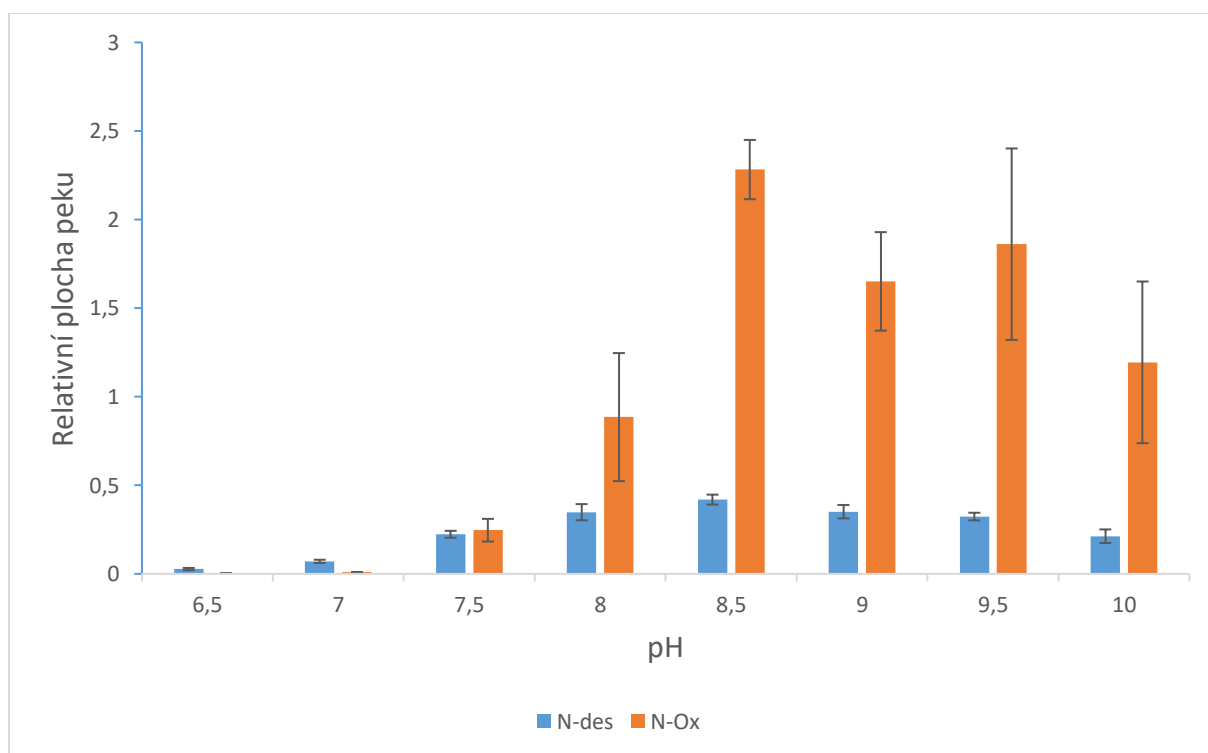


Obrázek 10: Hodnoty relativních ploch peaků (vztahené k fenacetinu) N-desmethylvandetanibu a vandetanib N-oxidu při uvedených hodnotách pH, využívající mikrosomy indukované fenobarbitalem. Použité hodnoty relativních ploch peaků pro oba produkty oxidace vandetanibu jsou aritmetickými průměry tří paralelních měření, pro které je uvedena také směrodatná odchylka.

4.4 Vliv pH na oxidaci vandetanibu cytochromy P450 a flavinmonooxygenasami obsažených v potkaních jaterních mikrosomech indukovaných ethanolem

V této sérii měření byli použity potkaní jaterní mikrosomy s přidaným ethanolem. Ethanol sloužil jako induktor pro CYP2E1 [36,40].

Na základě naměřených dat (viz. Obr. 11) je možné konstatovat, že maximální množství vzniklého N-desmethylvandetanibu (N-des) bylo pozorováno při pH 8,5. Při stejné hodnotě pH bylo rovněž vyprodukováno maximální množství vandetanib N-oxidu (N-ox).

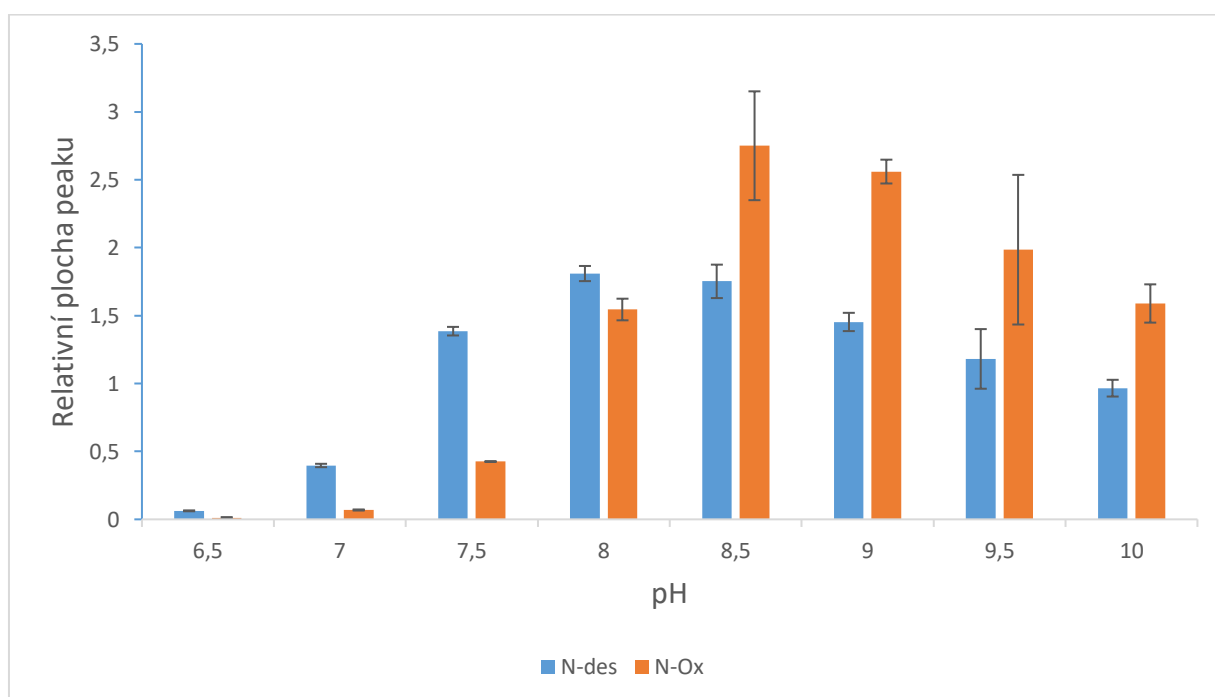


Obrázek 11: Hodnoty relativních ploch peaků (vztahované k fenacetinu) N-desmethylvandetanibu a vandetanib N-oxidu při uvedených hodnotách pH, pro sérii využívající mikrosomy indukované ethanolem. Použité hodnoty relativních ploch peaků pro oba produkty oxidace vandetanibu jsou aritmetickými průměry tří paralelních měření, pro které je uvedena také směrodatná odchylka.

4.5 Vliv pH na oxidaci vandetanibu cytochromy P450 a flavinmonooxygenasami obsažených v potkaních jaterních mikrosomech indukovaných pregnenolon-16 α -karbonitrilem

Pro tuto sérii měření byli použity potkaní jaterní mikrosomy, do kterých byl přidán pregnenolon-16 α -karbonitril, jakožto induktor CYP3A podrodiny[41]. Této podrodině CYP je za podrodinou 2C připisované druhé místo v účasti na oxidaci vandetanibu, za vzniku N-desmethylvandetanibu v potkaních játrech [16].

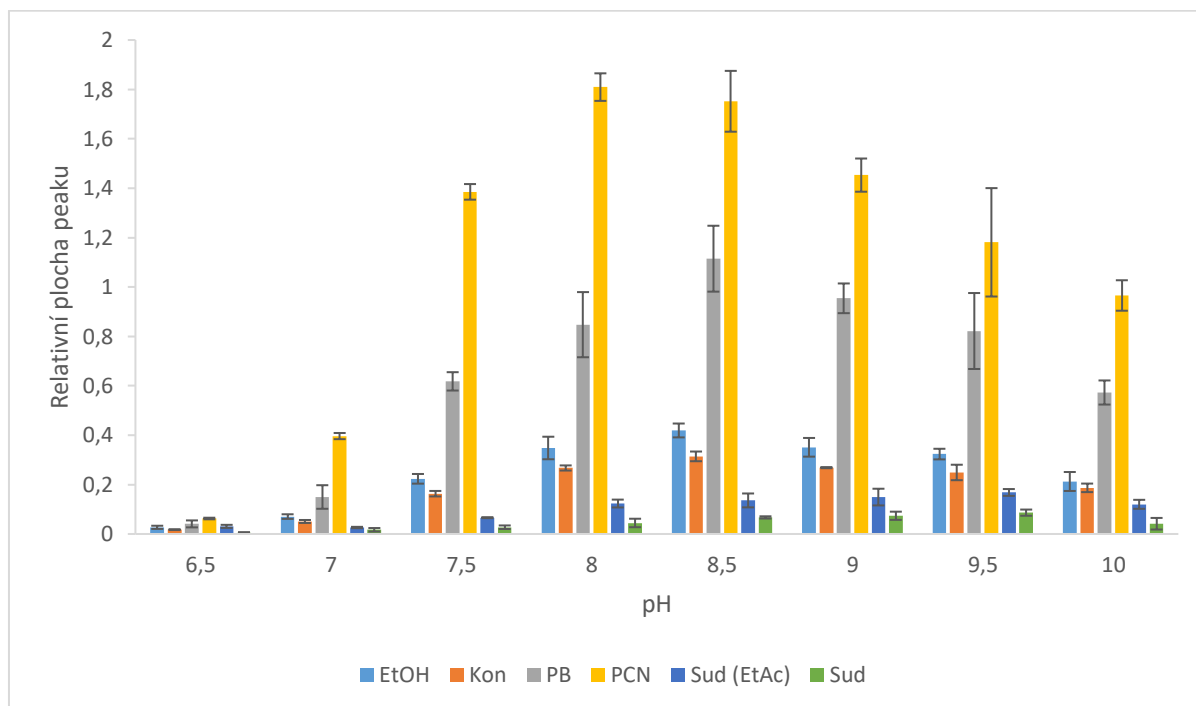
Naměřené hodnoty relativních ploch peaků (viz. Obr. 12) ukazují, že maximální množství N-desmethylvandetanibu (N-des) vzniklo při pH 8. Nárůst množství vznikajícího vandetanib N-oxidu (N-ox) je možné pozorovat až do pH 8,5.



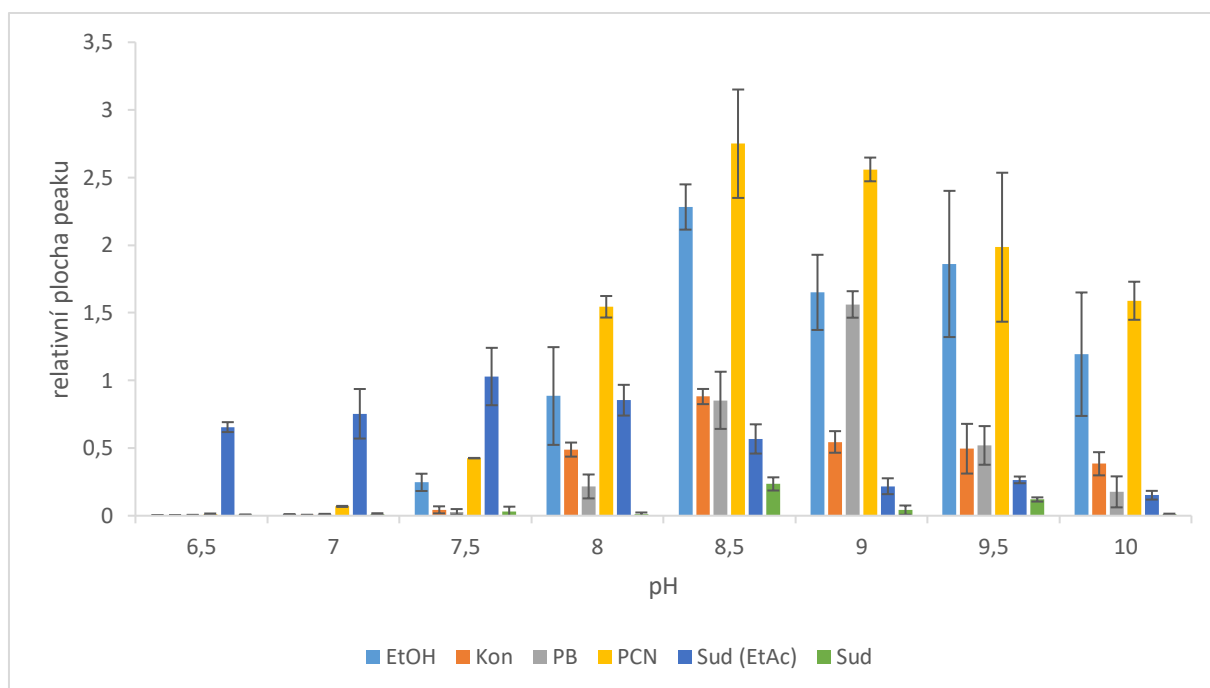
Obrázek 12: Hodnoty relativních ploch peaků (vztážené k fenacetinu) N-desmethylvandetanibu a vandetanib N-oxidu při uvedených hodnotách pH, pro sérii využívající mikrosomy indukované pregnenolon-16 α -karbonitrilem. Použité hodnoty relativních ploch peaků pro oba produkty oxidace vandetanibu jsou aritmetickými průměry tří paralelních měření, pro které je uvedena také směrodatná odchylka.

4.6 Souhrnné vyhodnocení výsledků ze všech sérií měření

Pro přehlednost a možnost lepšího porovnání, byly výsledky ze všech sérií rozříděny do dvou grafů podle vznikajícího metabolitu vandetanibu (viz. Obr.13 a Obr.14 s. 33).



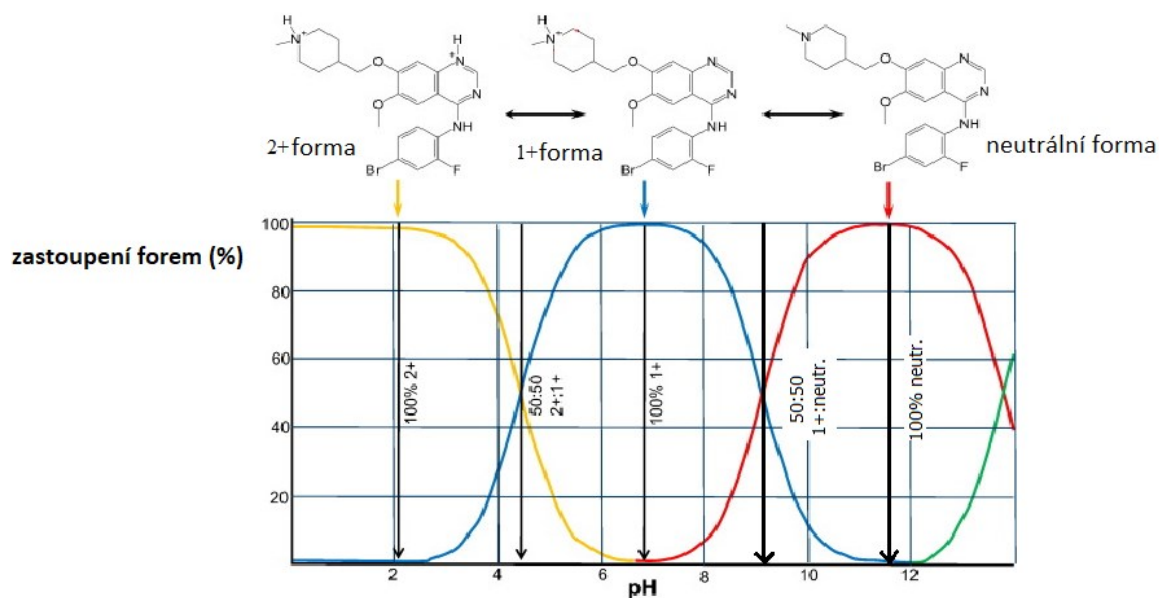
Obrázek 13: Hodnoty relativních ploch peaků (vztažené k fenacetinu) N-desmethylvandetanibu při uvedených hodnotách pH, pro všechny série (EtOH- mikrosomy indukované ethanolem; Kon- kontrolní mikrosomy; PB- mikrosomy indukované fenobarbitalem; PCN- mikrosomy indukované pregnenolon-16 α -karbonitrilem; Sud- mikrosomy indukované Sudanem I) využívající dichlormethan jako extrakční činidlo, a také sérii využívající mikrosomy indukované Sudanem I a ethylacetát jako extrakční činidlo (Sud (EtAc)). Použité hodnoty relativních ploch peaků jsou aritmetickými průměry tří paralelních měření, pro které je uvedena také směrodatná odchylka.



Obrázek 14: Hodnoty relativních ploch peaků (vztažené k fenacetinu) vandetanib *N*-oxidu při uvedených hodnotách pH, pro všechny série (EtOH- mikrosomy indukované ethanolem; Kon- kontrolní mikrosomy; PB- mikrosomy indukované fenobarbitalem; PCN- mikrosomy indukované pregnenolon-16 α -karbonitrilem; Sud- mikrosomy indukované Sudanem I) využívající dichlormethan jako extrakční činidlo, a také sérii využívající mikrosomy indukované Sudanem I a ethylacetát jako extrakční činidlo. Použité hodnoty relativních ploch peaků jsou aritmetickými průměry tří paralelních měření, pro které je uvedena také směrodatná odchylka.

5 Diskuze

Je známo, že pH optimum pro CYP se obecně pohybuje v rozmezí pH 7,2 až 7,6, kdežto pH optimum FMO se nachází v oblasti pH 8,4 až 9,2[42]. Vandetanib by se měl při fyziologickém pH (7,4) vyskytovat z velké části v kladně nabitě 1+ formě a pouze v malém množství v jeho formě neutrální (viz. Obr. 15). S rostoucím pH se zastoupení kladně nabitě formy snižuje a naopak přibývá forma nenabitá[44]. Na to aby bylo umožněné navázání vandetanibu do aktivního centra a jeho následná účinná oxidace pomocí CYP je nutné, aby byla molekula vandetanibu ve své neutrální formě[43].



Obrázek 15: Teoretické zastoupení jednotlivých forem vandetanibu při různých hodnotách pH. Převzato a upraveno[44].

V sérii, ve které byly použity mikrosomy bez přidaného induktoru, by se měly na tvorbě N-desmethylvandetanibu podílet zejména CYP2C a 3A podrodiny. Maximální množství tohoto metabolitu bylo pozorováno při pH 8,5 (viz. Obr. 7, s. 26). V této sérii je rovněž možné pozorovat, že při pH 7,5 je N-desmethylvandetanib majoritním produktem oxidace vandetanibu, což se neshoduje s výsledkem v práci R.Indry[20], kde byl při pH 7,4 více produkován vandetanib N-oxid. Toto zjištění by mohlo být způsobeno použitím jiných kontrolních mikrosomů, které se mohli lišit zastoupením jednotlivých enzymů, a tedy i poměrem množství vzniklých metabolitů.

Při pH 8,5 bylo v této sérii naměřeno největší množství vandetanib N-oxidu. Toto pH spadá do uváděného intervalu pro optimální aktivitu FMO (viz. výše).

Cytochrom b_5 může stimulovat tvorbu N-desmethylvandetanibu pomocí CYP3A4 tím, že se váže na jiné než aktivní místo CYP3A4 a působí jako jeho aktivátor. Při této interakci nedochází ke změně enzymové kinetiky[20]. Při metabolismu vandetanibu pomocí CYP1A1 však byl za přítomnosti cytochromu b_5 pozorován opačný, tedy inhibiční efekt [38].

V sérii využívající potkaní jaterní mikrosomy indukované Sudanem I, bylo pozorováno nejmenší množství vznikajícího N-desmethylvandetanibu ze všech sérií (viz. Obr. 13, s. 32).

V rámci této série byl jako extrakční činidlo, kromě dichlormethanu (viz. Obr. 9, s. 28), použit také ethylacetát (viz. Obr. 8, s. 27) pro vzájemné porovnání.

Co se týče N-desmethylvandetanibu, je jeho nárůst možné pozorovat při obou použitých extrakčních činidlech až do pH 9,5 (viz. Obr. 8, s. 27 a Obr. 9, s. 28). Tento výsledek je překvapivý, protože jak již bylo výše zmíněno pH optimum pro CYP se nachází v intervalu pH 7,2 až 7,6. Jak však naznačují výsledky již dříve zmíněné práce V. Ličku [38], za přítomnosti cytochromu b_5 bylo pozorováno snížení aktivity CYP1A1. Vandetanib se s rostoucím pH vyskytuje více ve své neutrální formě, která je schopná se vázat do aktivního centra CYP a následně tak může podstoupit příslušnou oxidační reakci. Je tedy možné, že inhibiční vliv cytochromu b_5 a vyšší zastoupení nenabitě formy vandetanibu při vyšším pH, by mohli odůvodnit tento výsledek. pH optimum pro metabolismus vandetanibu pomocí inhibovaného CYP1A1 se v této sérii pravděpodobně posunulo do vyšších hodnot pH, protože s rostoucím pH přibývá množství vhodného substrátu, co v této sérii hraje zřejmě klíčovou roli.

U vandetanib N-oxidu byly pozorovány značné rozdíly mezi měřeními využívající jednotlivé extrakční činidla. U měření využívajícího ethylacetát byl nárůst tohoto produktu pozorován do pH 7,5 (viz. Obr. 8, s. 27), čím se dosti liší od výsledků ostatních měření. Není jasné proč v tomto měření dosahovalo zastoupení vandetanib N-oxidu maxima při této hodnotě pH, protože FMO by za těchto podmínek neměli být výrazně aktivní. Za využití dichlormethanu bylo největší množství vandetanib N-oxidu pozorováno při pH 8,5 (viz. Obr. 9, s. 28), což se více shoduje s dalšími měřeními. Hodnoty množství vandetanib N-oxidu jsou nicméně v této sérii poněkud nesourodé, což je překvapivé, uvažíme-li, že trend přírůstku N-desmethylvandetanibu byl u obou použitých extrakčních činidel podobný.

Série, ve které byly použity potkaní jaterní mikrosomy indukované fenobarbitalem, vykazuje po sérii využívající jako induktor pregnenolon-16 α -karbonitril, druhou největší produkci N-desmethylvandetanibu (viz. Obr. 13, s. 32). Fenobarbital nejvíc indukuje podrodinu CYP2B[39], která se metabolismu vandetanibu v potkaních játrech neúčastní[16]. V menší míře však byla prokázána indukce CYP3A[39] a 2C[16] podrodiny, které se naopak výrazně podílejí na oxidaci tohoto léčiva[16]. Indukcí dvou posledně zmíněných podrodin tedy může být vysvětlena vysoká produkce N-desmethylvandetanibu v této sérii. Maximum tohoto metabolitu bylo pozorováno při pH 8,5.

Vandetanib N-oxid byl, podle naměřených hodnot, nejvíce produkován při pH 9. Tato hodnota je obsažená ve výše vzpomenutém intervalu optimálních pH pro aktivitu FMO.

Série využívající potkaní jaterní mikrosomy indukované ethanolem, by měla obsahovat zejména CYP2E1[16,36,40]. Tato isoforma se však metabolismu vandetanibu neúčastní[16]. Kromě indukce této isoformy však byla prokázána také indukce CYP3A podrodiny[40], která se naopak, jak již bylo zmíněno výše, účastní na oxidaci tohoto léčiva výrazným podílem. Maximální množství N-desmethylvandetanibu bylo v této sérii pozorováno při pH 8,5.

Při stejném pH, které je obsaženo v pH intervalu pro optimální aktivitu FMO, bylo rovněž naměřené největší množství vandetanib N-oxidu.

V sérii měření, ve které byly použity potkaní jaterní mikrosomy indukované pregnenolon-16 α -karbonitrem by měla podle očekávání hrát klíčovou roli v N-demethylaci vandetanibu CYP3A podrodina. Podle zjištění R. Indry [20] je CYP3A4 schopen katalyzovat N-demethylaci vandetanibu efektivněji než ostatní CYP, díky schopnosti navázání dvou molekul vandetanibu

do svého aktivního centra, čím vykazuje pozitivní kooperativitu. Dochází tak ke změně enzymové kinetiky z hyperbolické na sigmoidální. V potkaních játrech však přítomnost CYP3A4 isoformy prokázána nebyla[45]. Pokud by však i isoformy CYP3A podrodiny exprimovány v potkaních játrech vykazovali podobnou schopnost jako CYP3A4, mohlo by to vysvětlit, proč je ze všech sérií právě v této pozorováno největší množství vznikajícího N-desmethylvandetanibu.

Jak je možné vidět na obrázku č. 12, s. 31, množství vzniklého N-desmethylvandetanibu roste do hodnoty pH 8. V porovnání s výsledky práce O. Čillíkové [43], ve které N-desmethylvandetanibu přibývalo až do hodnoty pH 8,5 je možné pozorovat menší neshodu. Rozdíl mezi množstvím N-desmethylvandetanibu vyprodukovaného při hodnotě pH 8 a 8,5 je však u obou měření poměrně malý. Na tomto místě je ale důležité zdůraznit, že v našem měření byly použity potkaní jaterní mikrosomy s přidáním induktorem, kdežto ve vzpomínané práci byli použity lidské rekombinantní CYP3A4 s přidáním cytochromem b₅. Tato skutečnost tedy pravděpodobně může být důvodem rozdílů v získaných výsledcích.

Množství vyprodukovaného vandetanib N-oxidu dosahuje v této sérii maxima při pH 8,5. Tato hodnota pH spadá do výše uvedeného intervalu optimálních pH pro aktivitu FMO.

Jak je možné vidět na Obr. 13, s. 32 a Obr. 14, s. 33, při pH 6,5 vzniká téměř ve všech sériích jen minimální množství obou produktů oxidace vandetanibu. Molekula vandetanibu by se při této hodnotě pH měla vyskytovat zejména ve své nabitě 1+ a z části dokonce v 2+ formě (viz. Obr. 15, s. 34). Jak již bylo zmíněno výše, CYP nedokážou efektivně vázat do svého aktivního centra a následně metabolizovat nabitě molekuly vandetanibu. Intervaly optimálních hodnot pH jak pro CYP, tak pro FMO (viz. výše) nezahrnují toto pH, což je dalším důvodem nízkého množství naměřených produktů.

Při pH 7 bylo ve většině sérií pořád pozorováno jen minimální množství vandetanib N-oxidu, jakožto produktu oxidace pomocí FMO, kterých interval pH pro optimální aktivitu je pořád dosti vzdálený od této hodnoty.

U N-desmethylvandetanibu je však v některých sériích (zejména PB a PCN) možné pozorovat nárůst množství tohoto produktu. Při tomto pH se vandetanib také vyskytuje hlavně v nabitě 1+ formě, ale pomalu jsme se přiblížili k spodní hranici intervalu optimálních hodnot pH pro aktivitu CYP (7,2-7,6). Ve vzpomínaných dvou sériích měření (PB a PCN), ve kterých dochází k největšímu nárůstu N-desmethylvandetanibu oproti pH 6,5 dochází k indukci CYP3A podrodiny (u PB také CYP2C), které se značně podílí na tvorbě tohoto produktu. Je tedy možné, že i při tomto pH jsou CYP schopné uskutečnit tuto metabolickou přeměnu i za předpokladu, že se vandetanib vyskytuje majoritně ve své nabitě 1+ formě (viz. Obr. 15, s. 34).

Ve všech sériích dochází k poměrně výraznému nárůstu množství vznikajícího N-desmethylvandetanibu při pH 7,5 v porovnání s hodnotami naměřenými při pH 7. Tato hodnota pH se nachází v již zmíněném intervalu pH optima pro CYP (7,2-7,6) a lze tedy předpokládat, že CYP jsou při tomto pH neaktivnější. Za těchto podmínek se však molekula vandetanibu ještě pořád vyskytuje převážně ve své nabitě 1+ formě, ale z menší části je přítomná už také nenabitá forma (viz. Obr. 15, s. 34), která je efektivně metabolizována CYP. Právě vysoké zastoupení nabitě formy vandetanibu má za následek, že pomocí CYP při pH 7,5 není vandetanib metabolizován v největší možné míře.

Při tomto pH lze oproti pH 7 pozorovat rovněž nárůst množství vandetanib N-oxidu. V sériích indukovaných ethanolem a PCN je tento rozdíl poměrně výrazný (viz. Obr. 14, s. 33), což je překvapivé, protože FMO by při této hodnotě pH neměly vykazovat vysokou aktivitu. V sérii Sud (EtAc) byl dokonce vandetanib N-oxid produkován v největší míře (již diskutováno výše).

Nárůst množství N-desmethylvandetanibu pokračuje ve všech sériích i při pH 8. Při tomto pH bylo v sérii indukované pregnenolon-16 α -karbonitrilem vyprodukováno největší množství tohoto metabolitu (viz. Obr.12, s. 31). Tato hodnota pH se již opět nenachází v optimálním intervalu pro aktivitu CYP, zvyšuje se však zastoupení neutrální formy vandetanibu (viz. Obr. 15, s. 34).

V porovnání s hodnotami naměřenými při pH 7,5 je při pH 8 možné pozorovat výrazný nárůst množství vandetanib N-oxidu. Za tento jev může být odpovědná skutečnost, že jsme se přiblížili k rozmezí pH pro optimální aktivitu FMO (8,4-9,2).

Při pH 8,5 bylo pozorováno maximum N-desmethylvandetanibu v sériích indukovaných fenobarbitalem, ethanolem, a také v sérii bez přidaného induktoru (viz. Obr. 13, s. 32). Nenabitě formy vandetanibu opět přibývá (viz. Obr. 15, s. 34) a jak naznačují výsledky, cytochromy P450 jsou při této hodnotě pH ještě dostatečně aktivní.

Při tomto pH byly naměřeny rovněž největší množství vandetanib N-oxidu v sériích Sud I, PCN, EtOH, a také Kon (viz. Obr. 14, s. 33). Jelikož pH 8,5 spadá do intervalu optimálních pH pro aktivitu FMO, jsou tyto výsledky v souladu s předpokladem.

Pokles vyprodukovaného N-desmethylvandetanibu je při pH 9 pozorován ve všech sériích (viz. Obr. 13, s. 32), kromě série indukované Sudanem I (diskutováno výše), kde nárůst množství tohoto metabolitu pokračuje.

Při tomto pH bylo naměřené největší množství vandetanib N-oxidu v sérii indukované fenobarbitalem, čím se mírně liší od většiny ostatních (viz. Obr. 14, s. 33). Jak však bylo již uvedeno, tato hodnota pH pořád spadá do intervalu optimálních pH pro aktivitu FMO. Proto není tento výsledek nijak zvlášť překvapivý.

Klesající trend množství N-desmethylvandetanibu pokračuje i při pH 9,5 v sériích PCN, PB, EtOH a Kon (viz. Obr. 13, s. 32). Při tomto pH je však pozorováno maximum tohoto metabolitu v sérii indukované Sudanem I a to jak při použití ethylacetátu, tak při použití dichlormethanu (tento výsledek již byl diskutován výše).

Ve většině sérií klesá oproti pH 9 také množství vandetanib N-oxidu (viz. Obr. 14, s. 33). V sériích EtOH, Sud I a Sud (EtAc) však dochází v porovnání s pH 9 k zvýšení produkce tohoto metabolitu. pH 9,5 se již nenachází v intervalu optimálních hodnot pro aktivitu FMO a tento jev je tedy překvapivý.

Při pH 10 je pozorován pokles množství obou metabolitů vandetanibu ve všech sériích bez výjimek. Při tomto pH se sice vandetanib vyskytuje hlavně v neutrální formě (viz. Obr. 15, s. 34), ale intervaly optimálních pH jak pro CYP, tak FMO nezahrnují tuto hodnotu a lze tedy předpokládat, že enzymová aktivita bude u obou skupin enzymů poměrně nízká, což se patřičně projevilo v produkci jednotlivých metabolitů.

6 Závěr

V této bakalářské práci byl sledován vliv pH na metabolismus vandetanibu pomocí cytochtomů P450 a flavinmonooxygenas obsažených v potkaních jaterních mikrosomech. Předmětem bylo nalezení optimálního pH pro oxidaci vandetanibu jak pomocí CYP, tak FMO.

Série využívající mikrosomy indukované Sudanem I

- Největší množství N-desmethylvandetanibu bylo v této sérii pozorováno při pH 9,5 při obou použitých extrakčních činidlech.
- Největší množství vandetanib N-oxidu bylo pozorováno při pH 8,5 při použití dichlormethanu jako extrakčního činidla.
- Při použití ethylacetátu jako extrakčního činidla bylo největší množství vandetanib N-oxidu pozorováno při pH 7,5

Série využívající mikrosomy indukované pregnenolon-16 α -karbonitrilem

- Největší množství N-desmethylvandetanibu bylo v této sérii pozorováno při pH 8.
- Maximální množství vyprodukovaného vandetanib N-oxidu bylo pozorováno při pH 8,5.

Série využívající mikrosomy indukované fenobarbitalem

- Maximální množství N-desmethylvandetanibu bylo pozorováno při pH 8,5.
- Největší množství vandetanib N-oxidu bylo pozorováno při pH 9.

Série využívající mikrosomy indukované ethanolem

- Největší množství N-desmethylvandetanibu bylo v této sérii pozorováno při pH 8,5.
- Maximální množství vyprodukovaného vandetanib N-oxidu bylo pozorováno při pH 8,5.

Série využívající mikrosomy bez přidaného induktoru

- Maximální množství N-desmethylvandetanibu bylo v této sérii pozorováno při pH 8,5.
- Největší množství vandetanib N-oxidu bylo pozorováno při pH 8,5.

Porovnáním množství jednotlivých produktů vandetanibu byly stanoveny optimální hodnoty pH pro metabolismus tohoto léčiva v příslušných sériích měření jak pomocí CYP, tak FMO.

Získané výsledky naznačují, že vandetanib by neměl být efektivně metabolizován v nádorech tvořících kyselé prostředí. Účinnost působení vandetanibu by tedy měla být v těchto nádorech vysoká. Pokud by se ukázal tento předpoklad jako pravdivý, mohlo by to pomoci při rozhodování, zda je použití tohoto léčiva vhodné pro léčbu daného nádoru.

7 Použitá literatura

- 1 Miller, M. E. (2018) Cancer, Momentum Press, New York.
- 2 (2007, September 17) What Is Cancer? - National Cancer Institute, cgvArticle. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> [cit. 16. 2. 2021]
- 3 Nádorové onemocnění, úvod a základní pojmy | Genotoxicita a karcinogeneze | Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity. https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html#nazvoslovi [cit. 17. 2. 2021]
- 4 Kerr, D. J. and Aaronson, N. K. (2016) Oxford textbook of oncology Third edition., Oxford University Press.
- 5 Margaret Knowles and Peter Selby. (2005) Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer, OUP Oxford, New York.
- 6 Mačák, J., Dvořáčková, J. and Mačáková, J. (2012) Patologie 2., dopl. vyd., Grada.
- 7 Bártová, J. (2015) Přehled patologie 1. elektronické vydání., Karolinum.
- 8 Understanding Asbestos-Caused Lung Cancer. Mesothelioma Cent. - Vital Serv. Cancer Patients Fam. <https://www.asbestos.com/cancer/lung-cancer/> [cit. 20. 2. 2021]
- 9 Rokyta, R. (2015) Fyziologie a patologická fyziologie : pro klinickou praxi 1. vydání., Grada Publishing.
- 10 Kršek, M. (2011) Endokrinologie 1. elektronické vydání., Galén.
- 11 Neal, A. J. and Hoskin, P. J. (2009) Clinical Oncology, CRC Press LLC, London, GBR, UNITED KINGDOM.
- 12 Klener, P. and Klener Jr., P. (2009) Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii 1. elektronické vydání., Grada.
- 13 Casciato, D. A. and Territo, M. C. (2012) Manual of clinical oncology Seventh edition., Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.
- 14 Vorlíček, J., Krejčí, M. and Zdeněk, A. (2011) Obecná onkologie 1. elektronické vydání., Galén.
- 15 Lacroix, M. (2016) Targeted Therapies in Cancer: an Update, Nova Science Publishers, Inc, New York.
- 16 Indra, R., Pompach, P., Vavrová, K., Jáklová, K., Heger, Z., Adam, V., Eckschlager, T., Kopečková, K., Arlt, V. M. and Stiborová, M. (2020) Cytochrome P450 and flavin-containing monooxygenase enzymes are responsible for differential oxidation of the anti-

- thyroid-cancer drug vandetanib by human and rat hepatic microsomal systems. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **74**.
- 17 Hadoux, J. and Schlumberger, M. (2017) Chemotherapy and tyrosine-kinase inhibitors for medullary thyroid cancer. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **31**, 335–347.
 - 18 Martin, P., Oliver, S., Kennedy, S.-J., Partridge, E., Hutchison, M., Clarke, D. and Giles, P. (2012) Pharmacokinetics of Vandetanib: Three Phase I Studies in Healthy Subjects. *Clin. Ther.* **34**, 221–237.
 - 19 Tanihara, Y., Masuda, S. and Inui, K. (2021) Inhibitory effects of vandetanib on creatinine transport via renal organic cation transporter OCT2. *Eur. J. Pharm. Sci.* **158**.
 - 20 Indra, R., Pompach, P., Martínek, V., Takáčsová, P., Vavrová, K., Heger, Z., Adam, V., Eckschlager, T., Kopečková, K., Arlt, V. M. and Stiborová, M. (2019) Identification of Human Enzymes Oxidizing the Anti-Thyroid-Cancer Drug Vandetanib and Explanation of the High Efficiency of Cytochrome P450 3A4 in its Oxidation. *Int. J. Mol. Sci., MDPI, Switzerland* **20**.
 - 21 Karras, S., Anagnostis, P. and Krassas, G. E. (2014) Vandetanib for the treatment of thyroid cancer: an update. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol., Taylor & Francis* **10**, 469–481.
 - 22 Martin, P., Oliver, S., Kennedy, S.-J., Partridge, E., Hutchison, M., Clarke, D. and Giles, P. (2012) Pharmacokinetics of Vandetanib: Three Phase I Studies in Healthy Subjects. *Clin. Ther., Elsevier* **34**, 221–237.
 - 23 Martin, P., Oliver, S., Robertson, J., Kennedy, S.-J., Read, J. and Duvauchelle, T. (2011) Pharmacokinetic Drug Interactions with Vandetanib during Coadministration with Rifampicin or Itraconazole. *Drugs R. D.* **11**, 37–51.
 - 24 Mohamed W. Attwa, Adnan A. Kadi, Hany W. Darwish, Sawsan M. Amer, and Nasser S. Al-shakliah. (2018) Identification and characterization of in vivo, in vitro and reactive metabolites of vandetanib using LC–ESI–MS/MS. *Chem. Cent. J., BMC* **12**, 1–16.
 - 25 Skálová, L., a, kol. (2018) *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik 1. elektronické vydání.*, Karolinum.
 - 26 Simmons, M. A. (2012) *Pharmacology : an illustrated review*, Thieme.
 - 27 M. O. Faruk Khan and v Philip. (2018) *Fundamentals of Medicinal Chemistry and Drug Metabolism*, Bentham Science Publishers, Sharjah, UAE.
 - 28 Johannes Kirchmair. (2014) *Drug Metabolism Prediction*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
 - 29 Stiborová, M., Hudeček, J., Martínek, V., Páca Jr., J. and Páca, J. (2004) ENZYMY METABOLIZUJÍCÍ KONTAMINANTY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ. *Chem Listy* **15**.

- 30 Arthur J. Atkinson, J., Darrell R. Abernethy, Charles E. Daniels, Robert Dedrick, and Sanford P. Markey. (2007) *Principles of Clinical Pharmacology*, Academic Press, Amsterdam.
- 31 Ener, M. E., Lee, Y.-T., Winkler, J. R., Gray, H. B. and Cheruzel, L. (2010) Photooxidation of cytochrome P450-BM3. *Proc. Natl. Acad. Sci., National Academy of Sciences* **107**, 18783–18786.
- 32 He, K., Bornheim, L. M., Falick, A. M., Maltby, D., Yin, H. and Correia, M. A. (1998) Identification of the heme-modified peptides from cumene hydroperoxide-inactivated cytochrome P450 3A4. *Biochemistry* **37**, 17448–17457.
- 33 Phillips, I. R. and Shephard, E. A. (2019) Endogenous Roles of Mammalian Flavin-Containing Monooxygenases. *Catalysts, Mdpi, Basel* **9**, 1001.
- 34 Krueger, S. K. and Williams, D. E. (2005) Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacol. Ther.* **106**, 357–387.
- 35 Nedelcheva, V. and Gut, I. (1994) P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica, Taylor & Francis* **24**, 1151–1175.
- 36 Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P. and Frei, E. (2002) Sudan I Is a Potential Carcinogen for Humans. *Cancer Res.* **62**, 5678–5684.
- 37 Stiborová, M., Moserová, M., Mrízová, I., Dračínská, H., Martínek, V., Indra, R., Frei, E., Adam, V., Kizek, R., Schmeiser, H. H., Kubáčková, K. and Arlt, V. M. (2016) Induced expression of microsomal cytochrome b5 determined at mRNA and protein levels in rats exposed to ellipticine, benzo[a]pyrene, and 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I). *Monatshefte Für Chem. - Chem. Mon.* **147**, 897–904.
- 38 Ličko, V. (2020) Vliv cytochromu b5 na aktivitu cytochromů P450.
- 39 Jun Abe, Keiko Ogata, Koji Kimura, Minoru Maeda, Takafumi Yamaguchi, and Toru Utsumi. (2019) The effects on the endocrine system under hepatotoxicity induction by phenobarbital and di(2-ethylhexyl)phthalate in intact juvenile male rats. *J. Toxicol. Sci.* **44**, 459.
- 40 Kostrubsky, V. E., Strom, S. C., Wood, S. G., Wrighton, S. A., Sinclair, P. R. and Sinclair, J. F. (1995) Ethanol and Isopentanol Increase CYP3A and CYP2E in Primary Cultures of Human Hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys., Elsevier, United States* **322**, 516–520.
- 41 Franklin, M. R., Phillips, J. D. and Kushner, J. P. (2000) CYP3A-inducing agents and the attenuation of uroporphyrin accumulation and excretion in a rat model of porphyria cutanea tarda. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1325–1331.

- 42 Chung, W.-G. and Buhler, D. R. (2004) Differential metabolism of the pyrrolizidine alkaloid, senecionine, in Fischer 344 and Sprague-Dawley rats. *Arch. Pharm. Res.*, Pharmaceutical Society of Korea, Korea (South) **27**, 547–553.
- 43 Čillíková, O. (2020) Metabolismus inhibitorů tyrosinkinas, protinádorových léčiv nové generace.
- 44 Hagan, A., Phillips, G. J., Macfarlane, W. M., Lloyd, A. W., Czuczman, P. and Lewis, A. L. (2017) Preparation and characterisation of vandetanib-eluting radiopaque beads for locoregional treatment of hepatic malignancies. *Eur. J. Pharm. Sci.* **101**, 22–30.
- 45 Cheesman, M. J. and Reilly, P. E. B. (1998) Differential inducibility of specific mRNA corresponding to five CYP3A isoforms in female rat liver by RU486 and food deprivation: Comparison with protein abundance and enzymic activities. *Biochem. Pharmacol.* **56**, 473–481.