

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta

Ústav farmakologie



Mgr. Kristýna Krasulová

**STUDIUM INTERAKCÍ LÉČIV S ENZYMY
METABOLISMU CIZORODÝCH LÁTEK**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.

Olomouc 2017

PALACKY UNIVERSITY OLMOUC

Faculty of Medicine and Dentistry

Department of Pharmacology



Mgr. Kristýna Krasulová

**DRUG INTERACTION WITH XENOBIOTIC-
METABOLIZING ENZYMES**

THESIS

Supervisor: prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.

Olomouc 2017

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Kristýna Krasulová
Název práce:	Studium interakcí léčiv s enzymy metabolismu cizorodých látek
Název práce v angličtině:	Drug interaction with xenobiotic-metabolizing enzymes
Studijní program:	Lékařská farmakologie
Pracoviště:	Ústav farmakologie
Školitel:	prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.
Rok obhajoby:	2017
Klíčová slova:	cytochromy P450, enzymová inhibice, chirální léčiva, stereospecifita, lékové interakce
Klíčová slova v angličtině:	cytochromes P450, enzyme inhibition, chiral drugs, stereospecificity, drug-drug interaction

Tato práce byla podpořena vnitřními granty IGA UPOL (LF_2014_008; LF_2015_004; LF_2016_006; LF_2017_012), Grantovou agenturou České republiky (13-01809S) a Národním programem udržitelnosti LO1304.

Prohlašuji, že jsem uvedenou disertační práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Pavla Anzenbachera, DrSc. s využitím odborné literatury a laboratorního zázemí lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Mgr. Kristýna Krasulová

Jsem seznámena s tím, že tato disertační práce je majetkem Univerzity Palackého v Olomouci (autorský zákon č. 121/2000 Sb., § 60 odst. 1) a bez jejího souhlasu nesmí být obsah práce použit v jiné publikaci. Souhlasím se zpřístupněním této práce v Univerzitní knihovně Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Mgr. Kristýna Krasulová

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli panu prof. RNDr. Pavlu Anzenbacherovi, DrSc. Vážím si jeho cenných rad a času, které mi během studia věnoval. Poskytl mi kvalitní pracovní zázemí plné inspirujících podnětů, které ve mně vyvinuly vztah k vědeckému bádání. Na tomto má také podíl celý kolektiv Ústavu farmakologie, který nám studentům vytvořil klidné a podporující prostředí.

Vřelé díky patří tedy i všem mým kolegům za předání zkušeností, za mnohé rady, trpělivý přístup a přátelské zázemí, které mi pomohli při vypracování této disertační práce a dalších odborných publikací. Poděkování patří také PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. za jeho pomoc s molekulovým dokováním.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své blízké rodině a přátelům za jejich podporu během mého celého studia a za pohodovou domácí atmosféru.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. CÍL PRÁCE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 Metabolismus xenobiotik	11
3.2 Cytochromy P450	11
3.2.1 Nomenklatura	14
3.2.2 Katalytický mechanismus	14
3.2.3 Přehled forem lidských cytochromů P450 zapojených do metabolismu léčiv	15
3.3 Lékové interakce	24
3.3.1 Lékové interakce na úrovni absorpce a distribuce	25
3.3.2 Lékové interakce na úrovni exkrece	25
3.3.3 Lékové interakce na úrovni metabolismu	26
3.3.4 Lékové interakce na úrovni genů	32
3.3.5 Predikce lékových interakcí cytochromů P450 <i>in vitro</i>	34
3.4 Stereoisomerie léčiv	34
3.4.1 Stereoisomerie	35
3.4.2 Chirální léčiva	35
3.4.3 Stereospecifický metabolismus léčiv	36
3.4.4 Stereospecifické lékové interakce	38
3.5 Přehled zkoumaných chirálních léčiv	40
3.5.1 Azolová antimykotika	40
3.5.2 Čisté enantiomery	42
3.5.3 Dihydropyridinové blokátory vápníkových kanálů	45
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
4.1 Chemikálie a přístrojové vybavení	47
4.1.1 Chemikálie	47
4.1.2 Enzymy	48
4.1.3 Přístrojové vybavení	49
4.1.4 Software	50
4.2 Metody	51
4.2.1 Stanovení aktivity lidských jaterních mikrosomálních P450	51

4.2.2	Inhibiční potenciál enantiomerů daných chirálních látek na enzymovou aktivitu P450 <i>in vitro</i>	52
4.2.3	Charakterizace inhibice: mechanismus inhibice a stanovení K_i	59
4.2.4	<i>In silico</i> metody: Molekulové modelování.....	61
5.	VÝSLEDKY	63
5.1	Inhibiční potenciál optických isomerů azolových antimykotik na enzymovou aktivitu P450 v lidských jaterních mikrosomech	63
5.1.1	<i>Cis</i> -enantiomery ketokonazolu.....	63
5.1.2	<i>Cis</i> -diastereoisomery itraconazolu	66
5.2	Inhibiční potenciál enantiomerů chirálních léčiv dostupných na trhu v podobě čistých enantiomerů na enzymové aktivity P450 v lidských jaterních mikrosomech	67
5.2.1	Tamsulosin a jeho R- a S-enantiomery	67
5.2.2	Tolterodin a jeho R- a S- enantiomery	70
5.2.3	Citalopram a jeho R- a S- enantiomery	71
5.2.4	Zopiklon a jeho R- a S- enantiomery	71
5.2.5	Modafinil a jeho S- a R- enantiomery	72
5.3	Inhibiční potenciál enantiomerů dihydropyridinových blokátorů vápníkových kanálů na enzymové aktivity P450 v lidských jaterních mikrosomech	75
5.3.1	R- a S- enantiomery amlodipinu.....	75
5.3.2	α -enantiomery benidipinu.....	80
5.3.3	Enantiomery felodipinu	80
5.3.4	Enantiomery isradipinu	81
5.4	Molekulové modelování	82
5.4.1	Interakce R- a S- tamsulosinu s aktivním místem CYP3A4	82
5.4.2	Interakce R- a S-amlodipinu s aktivním místem CYP3A4	84
5.5	Interakce R- a S- amlodipinu se specifickým genotypem P450	85
6.	DISKUZE	86
7.	ZÁVĚRY	94
8.	SOUHRN	97
9.	SUMMARY	99
10.	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ	115

SEZNAM ZKRATEK

acetyl-CoA	acetylkoenzym A
AhR	aryl hydrokarbonový receptor
AML	amlodipin
ARNT	AhR jaderný translokátor
BEN	benidipin
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CIT	citalopram
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FAD	flavin adenin dinukleotid
FDA	<i>American Food and Drug Administration</i>
FEL	felodipin
FMN	flavin mononukleotid
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GR	glukokortikoidní receptor
HNF4 α	hepatocytární nukleární faktor α
ISR	isradipin
ITZ	itrakonazol
ITZ-A	(+)-2R,4S,2'R-itrakonazol
ITZ-B	(+)-2R,4S,2'S-itrakonazol
ITZ-C	(-)-2S,4R,2'S-itrakonazol
ITZ-D	(-) 2S,4R,2'R-itrakonazol
KET	ketokonazol
K _m	Michaelisova konstanta
MDZ	midazolam
MOD	modafinil
MS	mikrosomy
NADPH	redukována forma nikotinamidadenindinukleotid fosfátu
P450	cytochromy P450
PXR	pregnanový X receptor
RXR	retinoidní X receptor
TAM	tamsulosin
TOL	tolterodin
TST	testosteron
UGT	UDP-glukuronosyltransferasy
V _{max}	maximální rychlost reakce
ZOP	zopiklon

1. ÚVOD

Vzhledem k neustále se rozšiřujícímu spektru onemocnění, lidská populace stále více spoléhá na účinky léčiv, ať už užívaných k léčbě onemocnění nebo k prevenci. Léčiva však mohou být jak přínosná, tak i škodlivá. Současné podání více léčiv najednou může způsobit lékové interakce, které mohou vést k jinému než očekávanému terapeutickému účinku léčiva nebo až k toxicitě.

Riziko závažných lékových interakcí nastává v případě, pokud se léčiva potkají při své metabolické cestě, ve které hraje hlavní roli univerzální enzymový systém biotransformace léčiv - cytochromy P450. Prohlubování znalostí o lékových interakcích pomáhá zvýšit bezpečnost léčby a to mimo jiné i na úrovni cytochromů P450.

Cytochromy P450 jsou enzymy složené zejména z chirálních struktur (*L*-aminokyselin) a díky jejich biologickým reakcím podléhají specifickým vztahům mezi strukturou a aktivitou.

To stejné platí i u reakce s chirálními léčivy. Jejich jednotlivé optické isomery mohou vyvolat zcela odlišnou reakci, ať už na úrovni farmakokinetiky či farmakodynamiky. Všeobecně mohou léčiva fungovat jako substráty cytochromů P450. Mohou ale také inhibovat nebo stimulovat jejich aktivitu, což může mít za následek nežádoucí účinky léčiv až selhání terapie.

V současné době je asi polovina léčiv dostupná ve formě racemátu, tedy jako směsi enantiomerů v poměru 1 : 1. Ty jsou však na trhu postupně nahrazovány čistými enantiomery. Farmakologický účinek může být spojen jen s jedním optickým isomerem a neúčinný enantiomer v racemické směsi je pak považován pouze za zbytečný balast. Ten většinou jen zatěžuje organismus, způsobuje nežádoucí účinky a podílí se na lékových interakcích.

Předložená disertační práce se zabývá stereospecifickými interakcemi vybraných chirálních léčiv s nejdůležitějšími enzymy metabolismu, s cytochromy P450. Hlavním cílem bylo určit, zda se optické isomery daného léčiva liší ve svém inhibičním potenciálu vůči enzymové aktivitě již zmíněných enzymů.

2. CÍL PRÁCE

Cílem disertační práce bylo zhodnotit interakce individuálních optických isomerů vybraných chirálních léčiv s nejvýznamnějšími enzymy metabolismu cizorodých látek, včetně léčiv, s cytochromy P450. Cílem bylo porovnat inhibiční potenciál daného léčiva, tj. schopnost ovlivnit katalytickou aktivitu enzymů, charakterizovat schopnost a mechanismus, kterým případně léčivo enzymy inhibuje a rovněž pokusit se posoudit možné využití tzv. enantiomerně čistých léčiv namísto racemátu.

Studium interakcí odlišných chirálních léčiv s cytochromy P450 bylo zaměřeno zejména na následující témata:

- Hodnocení vlivu individuálních enantiomerů chirálních léčiv na enzymovou aktivitu cytochromů P450 obsažených v mikrosomální frakci lidských jater *in vitro*
- Predikce lékových interakcí *in vivo* pomocí stanovení inhibičních konstant
- Ověření výsledků získaných *in vitro* experimenty pomocí *in silico* metod
- Hodnocení inhibičního potenciálu enantiomerů s použitím mikrosomů se specifickým genotypem P450 a se změněnou enzymovou aktivitou

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Metabolismus xenobiotik

V průběhu svého života se každý živý organismus setkává s řadou cizorodých látek, s tzv. xenobiotiky. V našem okolí se vyskytují desetitisíce takovýchto látek, ať už se jedná o polutanty z životního prostředí, pesticidy, složky kosmetických přípravků, průmyslově vyráběné chemikálie či v neposlední řadě také léčiva. Lidský organismus si proto vyvinul důmyslný aparát, jak tyto látky z těla odstranit. Jen málokdy se zde z našeho organismu ale dostávají v nezměněné podobě. Xenobiotika, a tedy i léčiva, se ve většině dějů biotransformují (metabolizují) na neúčinné a snadno vyloučitelné látky. V průběhu detoxikace dochází ve většině případů ke zvýšení jejich polariry a tím k jejich snadnější exkreci. Nicméně některé látky mohou po biotransformaci toxicitu získat. Do tohoto aparátu patří tak celá řada procesů a reakcí. Metabolismus xenobiotik se obvykle uskutečňuje ve dvou fázích: biotransformace a konjugace. Nejprve jsou to mikrosomální enzymy schopné nejčastěji oxidační reakce, typicky cytochromy P450. Zjednodušeně, účelem funkce těchto enzymů je učinit první krok ke snížení lipofily xenobiotik. Na tuto I. fázi navazuje fáze konjugační (II. fáze, Tabulka 1). Díky spojení s malými polárními látkami dochází pak ke snadnějšímu vyloučení cizorodých látek z těla ven. Tomuto schématu však nepodléhají všechna léčiva; některá mohou vstoupit přímo do druhé fáze, jiná mohou být vyloučena již bez konjugace. Metabolismus léčiv je tedy komplexní proces a může zahrnovat i několik cest a různých enzymů.

3.2 Cytochromy P450

Historie významu cytochromů P450 (P450) sahá k počátkům studia metabolismu léčiv, karcinogenů, steroidů, pokračuje ke snahám o purifikaci P450 z lidských jaterních mikrosomů (MS), tvorby cDNA klonů, studia genových polymorfismů a genové regulace, až po aplikaci získaných poznatků do medicínské praxe. Zejména

posledních 30 let přineslo v tomto oboru informační boom. Předpokládá se, že se P450
enzymy

Tabulka 1 Přehled hlavních enzymů zasahujících do I. a II. fáze metabolismu léčiv s jejich typickými substráty

Fáze metabolismu	Enzym	Charakteristika reakce	Příklady léčiv- substrátů
I.	Cytochromy P450	Monooxygenace	Ibuprofen, warfarin, omeprazol, amiodaron, amitriptylin, metoprolol...
	Peroxidasy	Oxidace látek za přítomnosti peroxidů	Paracetamol, cyklofosfamid, doxorubicin, daunorubicin.
	Flavinové monooxygenasy	Monooxygenace sloučenin s nukleofilním dusíkem nebo heteroatomem síry	Verapamil, chlorpromazin, amitriptylin, itoprid, cimetidin.
	Aminooxidasy	Oxidační deaminace aminů a jejich substrátů	Propranolol, sertralin, citalopram.
	NADPH oxidasa	Produkce superoxidu a ROS z kyslíku a NADPH, spojeno s mnoha patologickými stavy	
	NAD(P)H-oxidoreduktasy	Katalyzující oxidoredukce mezi dvěma substráty	Chinony
	Reduktasy	Redukční reakce aldehydů, ketonů a sekundárních alkoholů	Haloperidol, polycyklické aromatické sloučeniny.
II.	UDP-glukuronosyltransferasy (UGT)	Glukuronidace	Paracetamol, oxazepam, morfin, flukonazol.
	Sulfottransferasy	Sulfatace	Paracetamol, salbutamol, dobutamin.
	Glutation-S-transferasy	Konjugace s glutationem	Doxorubicin, paracetamol, cisplatina, chlorambucil, nitroglycerin.
	N-acetyltransferasy	Přenos acetylové skupiny z acetyl-CoA	Isoniazid, sulfonamidy.
	Metyltransferasy	O-, N-, S-metylace	Adrenalin, L-DOPA, isoprenalin, 6-merkaptopurin.
	Acyltransferasy	Konjugace s aminokyselinami	Aspirin

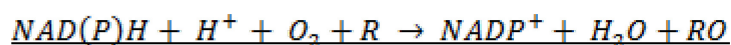
vyskytují v každém buněčném organismu, jelikož byly doposud nalezeny jak v archebakteriích, tak i v rostlinách a u všech živočišných druhů. Poprvé byly nalezeny v roce 1958 v mikrosomální frakci potkaních jater, ale jejich funkce byla objasněna až v roce 1963. Jedná se o velmi důležitý enzymatický systém hemových proteinů s monooxygenázovou funkcí, jehož hlavním úkolem je převážně detoxikace organismu od xenobiotik, buněčný metabolismus a udržování homeostázy [2]. Jelikož je organismus neustále vystavován různým cizorodým látkám, ať už léčivům nebo polutantům z našeho prostředí, je přínos P450 pro správnou funkci organismu nevyčíslitelný.

3.2.1 Nomenklatura

Název „cytochromy P450“ napovídá, že se jedná o enzymy, proteiny obsahující ve své struktuře hem. Písmeno „P“ odkazuje na slovo pigment a číslo „450“ je vlnová délka spektrálního maxima, které vykazují po redukcí hemového železa a vazbě oxidu uhelnatého [3]. Jelikož substrátů P450 je velmi mnoho a vzájemně se překrývají, jejich nomenklatura je založená na evolučním vývoji jednotlivých P450, tedy na podobnosti aminokyselinové sekvence [4]. Pro identifikaci jednotlivých členů se používá zkratka CYP, která je následována arabskou číslicí označující příslušnost k rodině a písmem odlišující podrodinu. Zkratka končí opět číslem určujícím jednotlivého člena, který by se měl lišit od ostatních alespoň 3 % sekvence [5]. Dle zkratky např. CYP3A4 můžeme odvodit, že tento enzym patří do rodiny 3 a podrodiny A.

3.2.2 Katalytický mechanismus

Cytochromy P450 jsou jedním z nejvšestrannějších enzymových systémů, který provádí celou škálu chemických reakcí. Hrají důležitou roli v přeměně xenobiotik na polárnější látky. Zabudují atom kyslíku do lipofilní molekuly, která je následně lépe rozpustná a schopná exkrece. Oxidace substrátů zahrnuje dva kroky, aktivaci kyslíku a následnou monooxygenaci (hydroxylaci) substrátu [6]. Tuto reakci vyjadřuje schematicky následující rovnice:

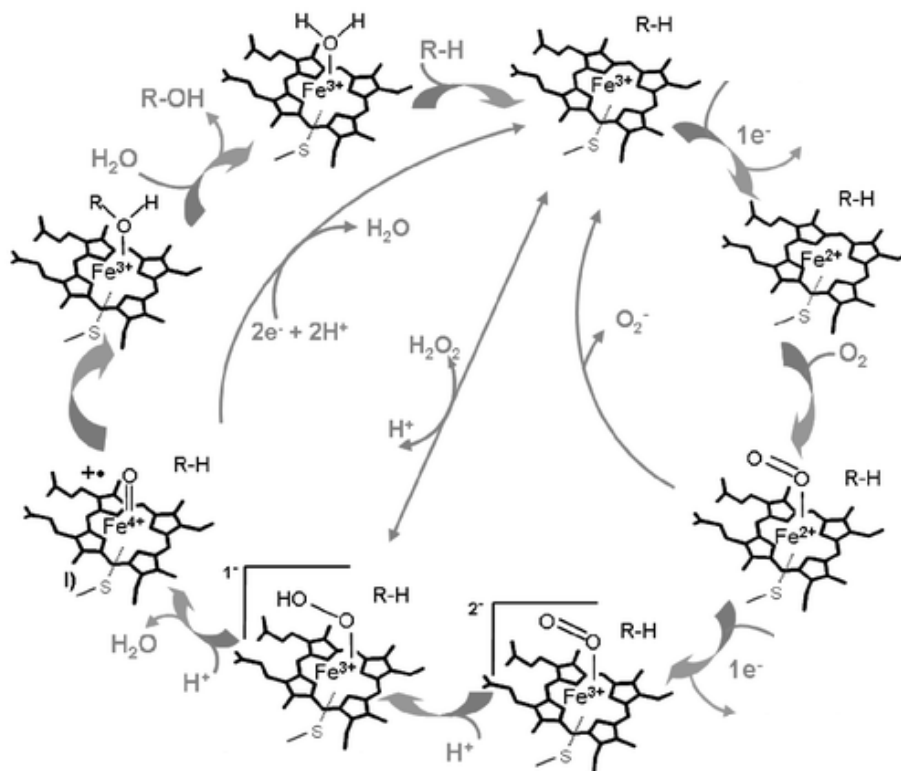


Rovnice 1 Schematická rovnice oxidace katalyzovaná cytochromy P450 [6].

P450 jsou hemoproteiny typu b, kde je železo čtyřmi vazbami vázáno k hemu. Pátým ligandem hemového atomu železa je cysteinový anion síry a šestým ligandem se v průběhu reakce stává molekula kyslíku. Celý katalytický cyklus je poměrně složitou kaskádou jednotlivých kroků, ve kterých spolupracují s cytochromy P450 další složky. Jako přenašeč redukčních ekvivalentů zde pracuje NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktasa se dvěma doménami s flavinovými koenzymy FAD a FMN, případně je v transportu elektronů rovněž účastný cytochrom b₅. V průběhu katalytického děje se postupně redukuje hemové železo a probíhá přenos dvou elektronů přes atom železa na molekulu kyslíku, která se rozštěpí za vzniku vody a reaktivního kyslíkového species, které zprostředkuje vstup aktivovaného atomu kyslíku do molekuly substrátu (Rovnice 2). Výsledkem tohoto děje jsou (z pohledu substrátu) např. alifatické a aromatické hydroxylace, epoxidace, N-dealkylace, O-dealkylace, S-dealkylace, N-hydroxylace, oxidační deaminace, dehalogenace, desulfurace či sulfoxidace.

3.2.3 Přehled forem lidských cytochromů P450 zapojených do metabolismu léčiv

Jednoznačně se jedná o nejvýznamnější rodinu enzymů z pohledu farmakologie. Díky své schopnosti zapojit se do biotransformace téměř $\frac{3}{4}$ všech léčiv a dalších lipofilních xenobiotik, je jejich studium důležitou součástí pro znalost farmakokinetiky, farmakodynamiky a toxikologie. V současné době je známo 57 funkčních genů P450 kódujících 57 enzymů (Tabulka 2) [7]. Podle podobnosti jejich sekvence je můžeme rozdělit do 18 rodin a 44 podrodin [2]. Většina enzymů P450 je zapojená do přeměn endogenních látek, do syntézy cholesterolu, steroidních hormonů, tvorby žlučových kyselin, do tvorby derivátů kyseliny arachidonové, metabolismu vitamínu D či hydroxylací mastných kyselin. Nedostatečná funkce těchto enzymů a jejich interindividuální variabilita mnohdy souvisí s určitým onemocněním či selháním léčby. Příkladem může být rachitida způsobená nedostatečnou funkcí CYP27B1 zapojeného do metabolismu vitamínu D [8]. U některých forem cytochromů P450, lokalizovaných např. v mitochondriích, je uspořádání katalytického cyklu jiné, než je uvedeno v Rovnici 2; např. přenos elektronů je realizován za účasti Fe-S proteinů a jiného typu reduktas.



Rovnice 2 Průběh dějů v katalytickém cyklu mikrosomálního cytochromu P450 [1].

Z hlediska farmakologie jsou zásadní zástupci rodin CYP1, CYP2 a CYP3 a CYP4, které mají další důležitou a unikátní funkci, protože jsou zodpovědné za I. fázi metabolismu xenobiotik (Obrázek 1) [2, 5, 9]. Metabolismus léčiv je tedy závislý na vlastnostech těchto enzymů; jejich genetická variabilita a substrátová specifita ovlivňují osud léčiva v organismu, lékové interakce, nežádoucí účinky i terapeutickou účinnost.

Jednotlivé enzymy se od sebe liší svými apoproteiny a substrátovou specifikou. Vyskytují se na membráně endoplazmatického retikula buněk zejména v játrech, gastrointestinálním traktu, plicích, mozku a ledvinách [5].

3.2.3.1 Rodina CYP1

Tato rodina má tři zástupce, CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1. Pro metabolisms léčiv je pak nejdůležitější forma CYP1A1 a CYP1A2. Genová exprese je regulována pomocí systému aryl hydrokarbonového receptoru (AhR). Celkový podíl této rodiny z P450

činí asi 6-13 %, je ovšem vysoce inducibilní. Mezi typická xenobiotika spouštějící genovou

Tabulka 2 Rozdělení lidských P450 podle hlavní třídy substrátů [2].

Steroly	Xenobiotika	Mastné kyseliny	Eikosanoidy	Vitaminy	Neznámá funkce
1B1 7A1	1A1 1A2	2J2 2U1	4F2 4F3 4F8	2R1 24A1	2A7 2S1
7B1 8B1	2A6 2A13	4A11 4B1	5A1 8A1	26A1 26B1	2W1 4A22
11A1	2B6 2C8	4F11 4F12		26C1 27B1	4F22 4X1
11B1	2C9 2C18	4V2		27C1	4Z1 20A1
11B2	2C19 2D6				
17A1	2E1 2F1				
19A1	3A4 3A5				
21A2	3A7 3A43				
27A1	4F2				
39A1					
46A1					
51A1					

expresi patří polycyklické aromatické uhlovodíky, látky obsažené v cigaretovém kouři, dioxiny, β -naftoflavony, léčivo omeprazol nebo fenobarbital [10]. Naopak snížená aktivita či exprese byla zaznamenána například u lidí se zvýšenými jaterními parametry, C- reaktivním proteinem nebo cholestázou [11]. Základními substráty jsou právě polycyklické aromatické aminy a amidy, dále některá léčiva ze skupiny analgetik (paracetamol), antipsychotika (olanzapin, klozapin), antidepresiva (duloxetin, tricyklická antidepresiva), léčiva kardiovaskulárního systému (propranolol), cholinesterázový inhibitor takrin, hypnotikum zolpidem a mnoho dalších [9].

Typickou reakcí, která se také používá ke stanovení aktivity *in vitro*, je O-deetylce 7-etoxyresorufinu, demetylce kofeinu v poloze 3 a O-deetylce fenacetinu [12]. Lékové interakce bývají způsobené malými molekulami způsobující inhibici enzymové aktivity, jedná se především o interakce fluvoxaminu a α -naftoflavonu s uvedenými substráty CYP1A2 [13]. Geny enzymů této rodiny jsou sice polymorfní, nicméně doposud se neobjevil polymorfismus, který by měl velký význam pro klinickou praxi. Větší problém představuje spíše jejich schopnost aktivovat některé

karcinogeny, například kyselinu aristolochovou, která způsobuje nefrotoxicitu a je také jedním ze spouštěčů rakoviny močových cest [14].

3.2.3.2 Rodina CYP2

Enzymy této rodiny se účastní zejména jaterního metabolismu. Patří sem ale i extrahepatální enzymy a enzymy doposud označované jako tzv. „*orphan*“ (sirotčí) P450, jejichž role v organismu je doposud neznámá. Pro farmakologii jsou nejdůležitějšími enzymy CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP2E1 [2].

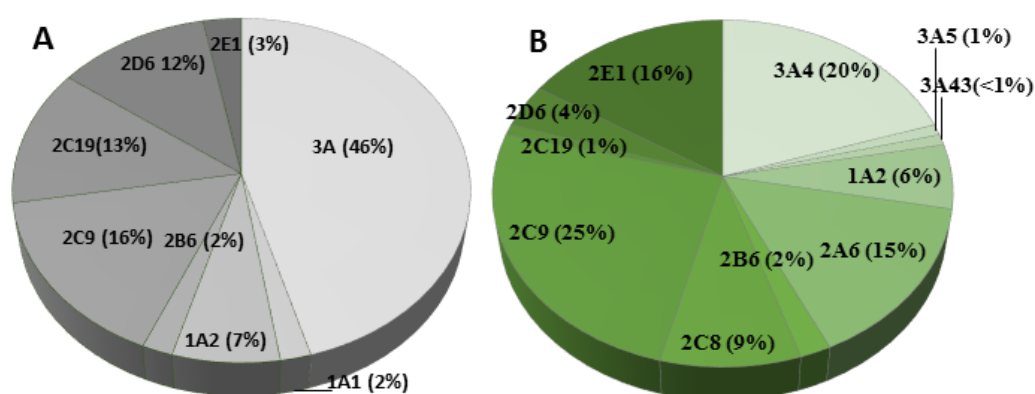
3.2.3.2.1 CYP2A6

Tento P450 je převážně jaterní enzym se zastoupením asi 4 % [15]. Kromě jater se vyskytuje i v nosohltanu či plicích [16]. Regulační mechanismy indukce byly popsány přes pregnanový X receptor (PXR), konstitutivní androstanový receptor (CAR), ale i glukokortikoidní receptor (GR) a estrogenový α receptor [9]. Jedná se o významný enzym z hlediska metabolismu tabáku, přeměňuje totiž nikotin na inaktivní kotinin. Specifickou reakcí pro hodnocení CYP2A6 aktivity je hydroxylace kumarinu v poloze 7 [17]. Mezi další důležité substráty tohoto enzymu patří zejména proléčivo tegafur, které je aktivováno na 5-fluorouracil s protinádorovým působením [18]. Dále se účastní také metabolismu efavirenzu, letrozolu, disulfiramu, fadrozolu, halotanu, pilokarpinu, promazinu nebo valproové kyseliny [19]. Gen kódující CYP2A6 je vysoce polymorfní. Je známo 86 alelických variant včetně varianty *12, která se projeví celkovou ztrátou katalytické aktivity [20]. Genetické varianty CYP2A6 jsou také diskutovány z hlediska kuřáckých návyků a rizika vzniku rakoviny plic, nicméně tento předpoklad zůstává stále sporný [2]. Specifickým inhibitorem této aktivity je například 8-metoxypsoralen, tranlycypromin nebo tryptamin [21, 22].

3.2.3.2.2 CYP2B6

Kolem 1-2 % jaterních P450 tvoří enzym CYP2B6. Můžeme ho ale také najít v plicích, mozku, ledvinách a srdci [2, 9]. Hlavní regulační cesta transkripce vede přes nukleární androstanový receptor CAR, která může být aktivována typicky

rifampicinem, barbituráty či cyklofosfamidem, artemisinem, karbamazepinem a dalšími látkami [9, 23]. CYP2B6 se účastní oxidativního metabolismu léčiv efavirenzu, cyklofosfamidu, bupropionu, artemisininu, propofolu a ketaminu [24]. A právě bupropion je uznávaným specifickým substrátem pro stanovení katalytické aktivity *in vitro* a efavirenz pro studie *in vivo*. Stejně jako ostatní členové této skupiny je polymorfní a existuje 63 alelických variant tohoto genu. Některé z nich jsou spojené s interindividuální variabilitou léku efavirenzu, s rozdíly ve výsledku léčby cyklofosfamidem nebo rozdíly v dávkování metadonu při léčbě závislosti [25-27].



Obrázek 1 (A) Zastoupení individuálních enzymů P450 v metabolismu léčiv [28]. (B) Zastoupení jednotlivých P450 enzymů ve směsných lidských jaterních mikrosomech [29].

3.2.3.2.3 CYP2C

CYP2C8 tvoří společně s CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19 podrodinu CYP2C, ale metabolismu léčiv se účastní především tři enzymy (2C8, 2C9 a 2C19). Každý člen této rodiny je jedinečný ve svém substrátovém portfoliu a rolí v metabolismu xenobiotik. Enzymy této skupiny jsou přítomny převážně v játrech, ale nezanedbatelné množství je přítomno i ve střevě [30].

3.2.3.2.3.1 CYP2C8

Tento enzym je exprimovaný v játrech (6-7 % z P450) a ledvinách a hladina jeho exprese je regulována cestou nukleárních receptorů CAR, PXR, HNF-1 α

a glukokortikoidním receptorem [31, 32]. Přes tyto receptory může také nastat indukce aktivity, zejména působením rifampicinu nebo barbiturátů [33]. Podle webu <http://www.cypalleles.ki.se> je doposud známo 16 alelických variant genu a některé z nich mohou mít vliv i na fenotyp [2]. Pro metabolismus léčiv nemá tak velký význam jako CYP2C9 a CYP2C19, ale účastní se důležité reakce: 6 α -hydroxylace cytostatika paclitaxelu. Ta se také využívá pro stanovení katalytické aktivity *in vitro* [34]. Mimo to má také svůj podíl např. na metabolismu amodiachinu, dasabuviru, imanitibu, loperamidu, pioglitazonu, verapamilu, cerivastatinu, montelukastu. Ovšem celkově by tento seznam obsahoval přes 100 léčiv. Lékové interakce mohou nastat po podání gemfibrozilu, klopidogrelu či obecně s glukuronidovými konjugáty [32].

3.2.3.2.3.2 CYP2C9

CYP2C9 je jedním z nejvíce exprimovaných P450 a nachází se primárně v játrech. Jeho exprese se může navíc zvýšit po aktivaci cest PXR/CAR nebo po aktivaci nukleárních receptorů pro vitamin D [35]. Doposud je známo 65 alel tohoto genu a řada z nich má velký vliv na farmakoterapii. Nejlépe prostudovanými alelami jsou *2 a *3, jejichž fenotypovým projevem je snížená katalytická aktivita známá pod označením pomalý metabolizátor. To se může následně projevit změnou účinku při léčbě především warfarinem, ale rovněž meloxicamem nebo celecoxibem [36-38]. CYP2C9 je zapojen do metabolismu 15 – 20 % léčiv. Nejdůležitějšími substráty oxidovanými za účasti CYP2C9 jsou losartan, fenytoin, cyklofosfamid, tamoxifen, fluvastatin, celecoxib, diklofenak, ibuprofen, tolbutamid, warfarin a další. Významným induktorem CYP2C9 aktivity je rifampicin. Po jeho podání může být navýšená clearance ostatních léků až dvojnásobně. Naopak snížená aktivita je způsobena inhibitory amiodaronem nebo flukonazolem [39].

3.2.3.2.3.3 CYP2C19

Charakteristický substrátem pro CYP2C19 je S-mefenytoin, který se dosud používá k hodnocení jeho aktivity. Díky této reakci byly objeveny i genetické polymorfismy, které dávají za vznik fenotypům označovaným jako pomalý (alela *2 a *3) a extensivní metabolizátor (*17). Tato variabilita v rychlosti metabolismu hraje

významnou roli například u inhibitorů protonové pumpy, např. u omeprazolu [24]. Dalšími substráty jsou klopidogrel, R-warfarin nebo antidepresiva amitriptylin, imipramin a citalopram. U klopidogrelu je potřebná metabolická aktivace za účasti CYP2C19, při které vzniká aktivní metabolit (klopidogrel je typickým proléčivem). U všech zmíněných může být léčba ovlivněna přítomností alel nesoucí pozměněný fenotyp [2]. Podléhá indukci stejnými mechanismy jako ostatní členové skupiny CYP2C.

3.2.3.2.4 CYP2D6

Přibližně 5 % P450 v játrech tvoří CYP2D6. Nachází se však také v plicích nebo centrální nervové soustavě [2]. Jeho procentuální zastoupení se liší a záleží na jeho genetické variabilitě, která je ze všech P450 nejvýznamnější. Populaci můžeme rozdělit podle CYP2D6 fenotypu do 4 skupin na pomalé, intermediární, rychlé a ultra-rychlé metabolizátory. Doposud je známo 165 genetických variant a některé z nich jsou významné pro farmakokinetiku i pro výskyt nežádoucích účinků [24]. U pomalých metabolizátorů nemusí docházet k aktivaci proléčiv. Typicky kodein se nepřemění na morfin a nemá pak analgetický účinek [40]. U ultra-rychlých metabolizátorů zase nedojde k požadovanému účinku antidepresiv, protože urychlený metabolismus léčivo odbourá a způsobí tak v podstatě poddávkování [41]. Mezi základní substráty tohoto enzymu patří léčiva ze skupiny β -blokátorů, antidepresiv, antipsychotik, dále pak kodein, tamoxifen, duloxetin a další. Velký klinický význam mají lékové interakce na základě inhibice, naopak indukci je ovlivněn jen velmi málo. Základním inhibitorem je chinidin, ale zařadili bychom sem i bupropion, fluoxetin a amiodaron [9].

3.2.3.2.5 CYP2E1

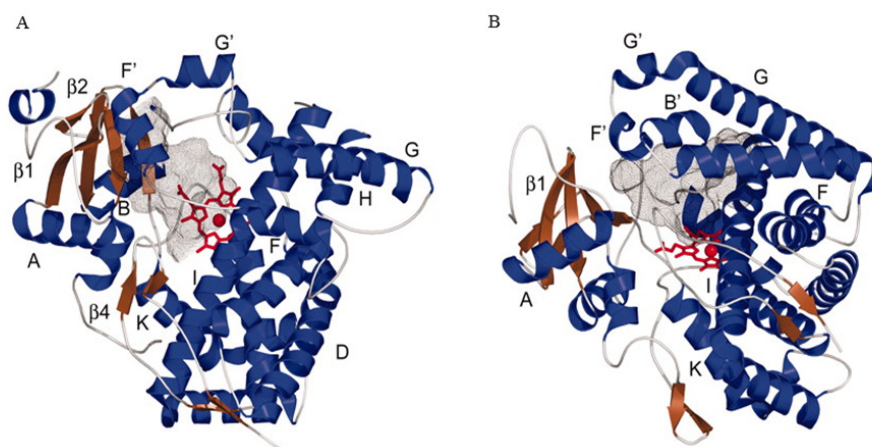
CYP2E1 je exprimovaný jak v játrech, tak v extrahepatální tkáni, v plicích, jícnu, střevě či mozku [2]. Metabolismu léčiv se účastní jen v malé míře, celkem jen asi u 2-3 % léčiv, včetně paracetamolu, halogenových anestetik a chlorzoxazonu. Díky své schopnosti metabolicky aktivovat celou řadu nízkomolekulárních toxických a karcinogenních látek je tento enzym spojen především s hepatotoxicitou. CYP2E1 je

znám jako etanolem indukovatelná forma P450, chronický alkoholismus způsobí totiž jeho indukci a tím pádem i zvýšenou tvorbu hepatotoxických metabolitů (typicky u paracetamolu). S různými genotypy CYP2E1 je také spojen výskyt řady onemocnění, rakoviny plic, střev či jaterní fibrózy [42].

3.2.3.3 Rodina CYP3

Jednoznačně se jedná o nejdůležitější rodinu ze systému P450 tvořenou dominantně CYP3A4, dále CYP3A5 a fetální formou CYP3A7. Nově popsanou formou CYP3A43, jejíž význam pro metabolismus léčiv je stále studován (zdá se, že má významnou roli při metabolismu antipsychotika olanzapinu) [2]. Mezi formami CYP3A4 a CYP3A5 je vysoká podobnost v primární aminokyselinové sekvenci (>85 %). Jejich substrátová specifita se překrývá, a proto bude dále odkazováno na tyto dva enzymy společně jako na CYP3A [43].

Jedná se o nejrozšířenější formu v játrech a střevě, ale má své zastoupení i v mozku, plicích, žaludku a ledvinách. Je popsáno nejméně 43 alel CYP3A4, nicméně nesouvisí tolik s variabilitou v enzymové aktivitě a jejich klinický impakt není doposud příliš vysvětlen [2]. Interindividuální variabilita může být způsobena jinými faktory, jako jsou například etnické rozdíly, věk, či poměrné zastoupení v tenkém střevě a játrech, které se může lišit mezi jednotlivci až 20-ti násobně [15]. Regulace genové exprese je komplexní a je do ní zapojeno mnoho regulačních cest. Některá xenobiotika, například barbituráty, rifampicin a statiny, mohou indukovat CYP3A převážně přes nukleární receptory PXR a CAR, ale podílí se na ní i receptor pro vitamin D nebo PPAR α [9]. Jejich nejdůležitější funkcí je biotransformace léčiv. Účastní se také aktivace karcinogenních látek, jako jsou aflatoxiny, polycyklické aromatické uhlovodíky nebo na biotransformačních procesech endogenních substrátů. CYP3A4 má největší aktivní místo ze všech P450 (Obrázek 2). Aktivní místo také vykazuje velkou flexibilitu, což umožňuje navázání nepřeberného množství různých substrátů, a katalýzu velkého množství metabolických procesů, přehled nalezneme v tabulce (Tabulka 3) [44, 45]. Také proto se pro stanovení aktivity *in vitro* používá větší množství specifických substrátů. Typickými reakcemi jsou 6 β -hydroxylace testosteronu, 1'-hydroxylace midazolamu, N-demethylace erytromycinu, oxidace nifedipinu, N-demethylace diazepamu, C-hydroxylace terfenadinu a oxidace cyklosporinu [46].



Obrázek 2 Struktura molekuly CYP3A4 (A) a CYP2C8 (B) [47]. Aktivní místa obou P450 jsou veliká, ale CYP3A4 je schopný zaujmout několik možných konformací tak, aby se přizpůsobil vazbě různých ligandů. Aktivní místo molekuly CYP2C8 je také prostorné, ale více rigidní, nemá takovou schopnost přizpůsobit se ligandům [2, 44]. Modrá barva znázorňuje α -helixy, šedou barvou mají neuspořádané struktury a hnědá barva reprezentuje β -skládaný list. Červeně je vyznačena molekula hemu, která sídlí v aktivním místě enzymu a hraje dominantní roli při katalytickém cyklu P450.

Inhibice CYP3A je velkým problémem farmaceutického průmyslu a figuruje v celé řadě důležitých a závažných lékových interakcích (Tabulka 3). Řada léčiv se potýká s tímto problémem již v průběhu svého vývoje, a proto je velmi důležité zkoumat potenciální léčiva z tohoto hlediska již od počátku. Mezi život ohrožující lékové interakce zprostředkované inhibicí CYP3A4 patří kombinace inhibitorů CYP3A s terfenadinem nebo astemizolem, způsobující ventrikulární arytmie. Rozvoj rabdomyolýzy při kombinaci inhibitorů CYP3A se statiny nebo vznik hypotenze po kombinaci s dihydropyridinovými blokátory vápníkových kanálů nebo sildenafilem jsou jen dalšími příklady [48].

Tabulka 3 Přehled hlavních substrátů, inhibitorů a induktorů rodiny CYP3A [2].

Substráty	makrolidová antibiotika (klaritromycin), antiarytmika (chinidin), benzodiazepiny (diazepam, midazolam), imunopresiva (cyklosporin, takrolimus), HIV antivirotika (indinavir), blokátory vápníkových kanálů (amlodipin, verapamil), statiny (simvastatin), aripiprazol, haloperidol, sildenafil, tamoxifen a další.
Inhibitory	HIV antivirotika, klaritromycin, ketokonazol, itrakonazol, erytromycin, grapefruitový džus, verapamil, diltiazem, amiodaron, fluvoxamin, troleandomycin, a další.
Induktory	karbamazepin, fenobarbital, fenytoin, třezalka tečkovaná, rifabutin

3.3 Lékové interakce

Farmakologická léčba slouží k terapii, prevenci a snížení výskytu onemocnění. V principu mají mít léčiva příznivý efekt na zdraví člověka. Ale při současném podání dvou či dokonce více léčiv stoupá riziko vzniku lékových interakcí. Léky mohou ovlivňovat farmakokinetiku, tj. absorpci, distribuci, metabolismus, vylučování nebo farmakologický účinek současně podávaných látek. Roste riziko nežádoucích účinků, selhání léčby a zvýšené toxicity. Riziko lékových interakcí stoupá s přibývajícím věkem a s přibývajícím počtem užívaných léků. Pacienti mezi 45 – 64 lety mají asi 67% riziko výskytu lékové interakce. U pacientů starších 65 let to může být až 90 %. Počet případů se exponenciálně zvyšuje, pokud pacient užívá čtyři nebo více léčiv najednou [49].

To, zda se léková interakce projeví, je ovlivněno mnoha faktory. Záleží na vztahu farmakokinetiky a farmakodynamiky, na terapeutickém indexu léčiva, na síle a koncentraci potenciálního inhibitoru či induktoru, na tom, zda je ovlivněna specifická cesta absorpce, distribuce, metabolismu nebo vylučování, zda se jedná o proléčivo nebo přímo účinnou látku nebo zda se projeví farmakogenetika

a v neposlední řadě také na tom, zda a jak se projeví aktuální stav pacienta [50]. Rozsah lékové interakce je individuální. Mohou mít příznivý efekt, na druhou stranu mohou vést i ke stažení léčiva z trhu [51].

3.3.1 Lékové interakce na úrovni absorpce a distribuce

Fyzikálně chemické vlastnosti léčiva a stav organismu rozhodují o způsobu podání léčiva. Ke změnám absorpce, snížení či zvýšení, může docházet vlivem pH organismu, rozpustnosti léčiva, stavu střevní mikroflóry nebo motility střev. Příkladem lékové interakce na úrovni absorpce může být reakce tetracyklinů s antacidami. Ionty železa, vápníku nebo hliníku z antacida tvoří s tetracykliny inaktivní cheláty a snižují sérové hladiny těchto antibiotik [52]. Distribuce léčiva může být ovlivněna zase například objemem extracelulární tekutiny, celkovým objemem vody, množstvím tukové tkáně či poměrem volné a vázané frakce léčiva. Volná frakce je účinná a může procházet biotransformací, naopak vázaná frakce na plazmatických bílkovinách je neúčinná a tvoří depozit. Na plazmatické albuminy s bazickým charakterem se přednostněji váží slabé kyseliny jako je kyselina salicylová či nesteroidní antiflogistika. Na kyslejší α -globuliny se zase váží snadněji látky s bazickým charakterem, typicky jsou to tricyklická antidepresiva. Lékové interakce na úrovni biodistribuce by se mohly projevit vzájemnou kompeticí neboli soutěží dvou léčiv o vazbu na plazmatické proteiny a tedy zvýšenou koncentraci nevázaného léčiva v plazmě [53]. Nicméně v praxi se tento efekt projeví pouze tehdy, když vytěšňovaný lék sníží eliminaci substrátu.

3.3.2 Lékové interakce na úrovni exkrece

Primárním orgánem exkrece látek z organismu jsou ledviny. Do tohoto procesu jsou v menší míře zapojeny i játra, plíce, gastrointestinální trakt, slinění, pot, slzy a mléčné žlázy. K ovlivnění procesu exkrece může dojít snadno změnou pH, tedy změnou ionizace látek, kompeticí látek o transportní přenašeče, změnou tubulární sekrece nebo změnou renálního průtoku [54]. Jednoduchá alkalizace či acidifikace moči může ovlivnit exkreci dalších léčiv. Vitamin C, tedy kyselina askorbová, dokáže okyselit moč, a pokud se do ní dostane i léčivo charakteru slabé kyseliny, například barbiturát,

bude preferovat neionizované uspořádání a bude se snadno reabsorbovat přes lipofilní membránu renálních tubulů. Naopak, v alkalické moči, například po podání furosemidu, bude převyšovat ionizovaná forma, tedy v tucích málo rozpustná a proto snadněji močí vylučitelná [53]. Při léčbě diuretikem spironolaktonem by se mělo vyvarovat jeho kombinaci s β -blokátory a inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu, protože vznikající hyperkalemie by mohla vést až k zástavě srdce [55].

3.3.3 Lékové interakce na úrovni metabolismu

Právě lékové interakce na úrovni metabolismu léčiv jsou klinicky nejzávažnější a nejvýznamnější farmakokinetické lékové interakce vůbec. Jejich následkem bývá zvýšená nutnost hospitalizace, morbidita a bohužel také mortalita. Většina léčiv prochází eliminací, při níž je zapotřebí nejdříve látky chemicky přeměnit na rozpustnější produkty. Tyto polárnější látky se pak neresorbují zpět přes lipidové membrány, ale jsou vylučovány z organismu ledvinami nebo žlučí [54]. Nejběžněji se jedná o lékové interakce na úrovni P450, ale reakce s enzymy II. fáze metabolismu mají také svůj podíl. Zejména glukuronidace může být indukována i inhibována, což může vést ke klinicky významným lékovým interakcím. Například komedikace kyseliny valproové, inhibitoru UDP- glukuronosyltransferázy UGT2B7, a zidovudinu navýší hladinu zidovudinu až na dvojnásobek, s čímž roste riziko vzniku anémie [56].

Lékové interakce a cytochromy P450 jsou dva pojmy, které spolu úzce souvisí. Je celkem logické, že při medikaci dvou či více látek, které sdílí stejnou cestu metabolismu, může docházet k jejich vzájemným interakcím, dochází však také k ovlivnění samotných enzymů. Fyziologické účinky léčiv na enzymy mohou přetrvávat hodiny až měsíce. Nejedná se pouze o interakce podaných léčiv v terapeutické či nadměrné dávce, ale zahrnují se zde i interakce s různými přírodními látkami v potravinách nebo doplňcích stravy.

Významnou roli v interindividuální a intraindividuální variabilitě aktivity cytochromů P450 hrají i environmentální faktory, kam patří mimo jiné právě lékové interakce zahrnující inhibice a indukce enzymových aktivit. Dále jsou to různé biologické faktory, pohlaví nebo fyziologické vlastnosti organismu, jako je hormonální rovnováha, onemocnění, cirkadiální rytmy. A do třetice může být aktivita ovlivněna přítomností genetického polymorfismu v oblasti kódující geny P450.

3.3.3.1 Indukce

Indukce obecně vede ke snížení biologické dostupnosti, zrychlenému metabolismu, popřípadě zesílenému efektu prvního průchodu játry (tzv. *first pass effect*). U tzv. proléčiv může dojít k zesílenému farmakodynamickému efektu [2]. Samotný podaný lék může způsobit zvýšenou aktivitu určité formy P450, kdy pak dochází ve větší míře ke snížení hladiny metabolizované látky a naopak roste koncentrace metabolitů. Indukce se může projevit při současném podání léčiva – induktoru a dalšího léku, metabolizovaného naindukovaným P450. Podkladem pro indukci je zvýšená syntéza P450, tím pádem i zvýšená biotransformace. Příkladem může být selhání imunosupresivní léčby při současné léčbě rifampicinem, barbituráty nebo extraktem třezalky tečkované, které jsou známy pro svoji schopnost indukovat CYP3A4 [57, 58]. Byly popsány také případy selhání orálních kontraceptiv, kdy indukující léky způsobily zvýšenou aktivitu CYP3A4 a metabolismu 17 α -etynylestradiolu [59, 60]. Obecně rifampicin je jeden z nejvýkonnějších induktorů několika lidských P450, včetně rodin CYP2C a CYP3A [57, 61]. Ovšem u látek, kde metabolismus vede ke zvýšené tvorbě reaktivních radikálů, dochází ke zvýšené toxicitě. Příkladem může být hepatotoxicita spojená s dlouhodobým alkoholismem a užitím paracetamolu. Lidský CYP2E1 je zodpovědný za vznik toxického metabolitu N-acetyl-p-benzochinon iminu (NAPBQI). V případě, že je paracetamol užit u alkoholika ráno pro léčbu bolesti hlavy, způsobenou večerním požitím alkoholu, riziko hepatotoxicity je vysoké. Hladina alkoholu je nízká pro inhibici vzniku NAPBQI a hladina enzymu CYP2E1 je indukovaná dlouhodobým užitím etanolu. To vše dohromady způsobí právě zvýšenou syntézu toxického NAPBQI [62].

3.3.3.1.1 Molekulární mechanismy indukce

Indukce metabolismu léků obvykle nastává po zvýšené transkripci genu pro daný enzym, způsobené dlouhodobou expozicí indukčnímu činidlu. Tento proces zprostředkovává převážně skupina intracelulárních receptorů. Indukce má pomalejší nástup než inhibice, protože se jedná se o komplexnější proces. Zahrnuje působení induktoru, syntézu nového enzymu, ale také degradaci enzymu po vysazení induktoru. To znázorňuje například indukce aktivity CYP3A4. Působení indukčního činidla rifampicinu se projevilo na aktivitě enzymu až po 6-ti dnech od počátku léčby, ale do

normálních hodnot se aktivita upravila zase až po 11-ti dnech od vysazení [63]. Nejdůležitějšími receptory regulujícími indukci P450 jsou aryl hydrokarbonový receptor (AhR), pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR). Estrogenový receptor α figuruje v indukci enzymu CYP2A6. Úloha dalších receptorů, jako jsou glukokortikoidní, retinoidní X, PPAR α nebo HNF4 α , není ještě přesně definována [2, 64].

3.3.3.1.1.1 Aryl hydrokarbonový receptor AHR

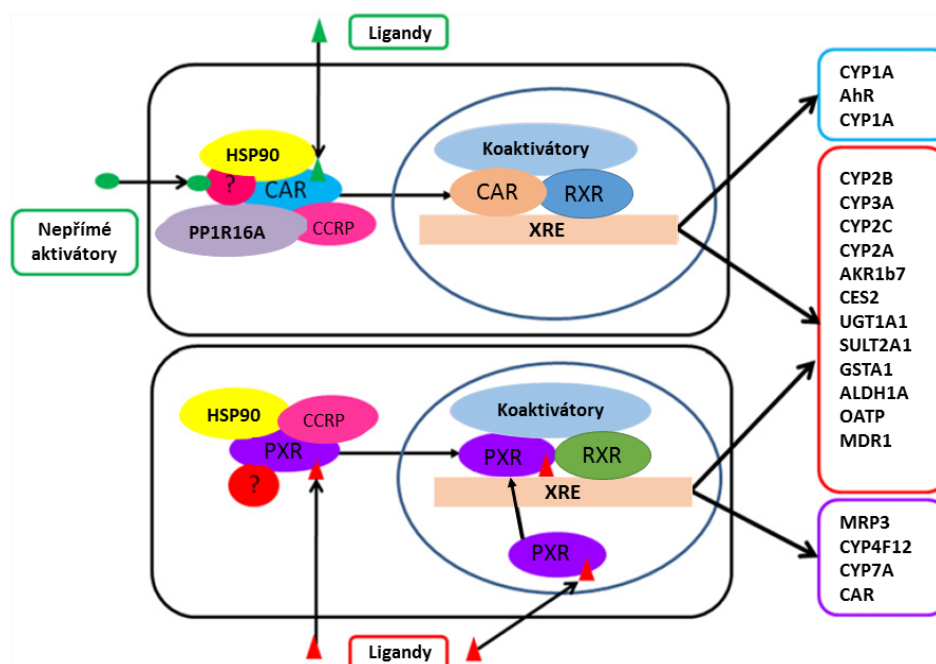
Jedná se o vysoce exprimovaný ligandem aktivovaný transkripční faktor, který indukuje expresi lidských CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 [65]. Volný AhR je přítomen v cytoplazmě v komplexu s chaperonovými proteiny. Po vazbě ligandu se tento transkripční faktor přesune do jádra a vytvoří heterodimer s AhR jaderným translokátorem (ARNT) [66]. Takto vytvořený heterodimer se váže na xenobiotika responzivní elementy genů pro P450 a aktivuje transkripci. Typickými induktory tohoto systému jsou polycyklické aromatické uhlovodíky [64].

3.3.3.1.1.2 Pregnanový X receptor PXR

Pole působení tohoto nukleárního receptoru je široké. Zprostředkovává indukci CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 i CYP3A, ale také některých enzymů II. fáze metabolismu a důležitých transportérů [64, 67]. Většina doposud popsaných klinicky významných lékových interakcí způsobených indukcí CYP3A je zprostředkována právě přes tento nukleární receptor [68]. Exprimován je převážně v játrech a v tenkém střevě. PXR tvoří heterodimer s retinoidním X receptorem (RXR), který má schopnost vázat se na promotor cílových genů (Obrázek 3). Ligandy jsou velmi různorodé, patří sem chemicky i strukturně odlišné endogenní látky, léčiva a další xenobiotika. Příklady aktivujících látek jsou statiny, některá antibiotika (rifampicin), antifungální látky (klotrimazol), léky s protirakovinným účinkem (tamoxifen), hyperforin (třezalka tečkovaná), steroidy, žlučové kyseliny či některé pesticidy [2].

3.3.3.1.1.3 Konstitutivní androstanový receptor

Tento blízce příbuzný receptoru PXR se podílí na transkripční regulaci genů pro CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 a CYP3A, ale také pro enzymy II. fáze a transportéry léčiv. Opět se vyskytuje nejvíce v játrech, ale má zastoupení i v ledvinách [69]. Od ostatních se liší svojí schopností aktivovat se bez ligandu, má tedy konstitutivní aktivitu. V *in vivo* experimentech se nachází v cytosolu v komplexu s dalšími proteiny, a až po navázání ligandu se přesune do jádra a heterodimerizuje s RXR a váže se na xenobiotika responzivní elementy. Ovšem v nesmrtelných buněčných liniích se spontánně akumuluje v jádře a je konstitutivně aktivován, což činí jeho *in vitro* studium obtížným (Obrázek 3). Další překážku jeho studia tvoří absence specifického lidského agonisty, nicméně exogenních ligandů existuje celá řada, příkladem jsou fenobarbital, fenytoin nebo statiny [70].



Obrázek 3 Schéma aktivace cílových genů přes nukleární receptory CAR a PXR. Aktivace CAR probíhá dvěma způsoby: buď přímou aktivací nukleárního receptoru ligandem, tj. vazbou ligandu na nukleární receptor lokalizovaný v cytoplazmě, a následnou translokací komplexu nukleárního receptoru, ligandu a koaktivujících proteinů do jádra. Druhým způsobem je nepřímá aktivace transkripce bez vazby na

nukleární receptor. PXR je naopak aktivován pouze přímou vazbou ligandu. CAR specifické geny jsou uvedeny v modrém boxu, PXR specifické geny ve fialovém boxu, červený box shrnuje společné geny, upraveno dle [70].

3.3.3.2 Inhibice

Inhibice biotransformace vede naopak ke zvýšení koncentrace i účinku podaného léčiva a případně i ke zvýšení jeho toxicity. Inhibice se projeví, pokud současně podaná léčiva sdílí svoji cestu biotransformace, v tomto případě stejný P450. Většinou to znamená nárůst plazmatických hladin se zvýšeným rizikem toxicity. Význam má terapeutický index daného léčiva. Léčiva s nízkou hodnotou terapeutického indexu jsou ke vzniku lékové interakce na této úrovni náchylnější. Patří sem antikoagulační léčba, antidepresiva nebo léčiva ovlivňující kardiovaskulární systém. Inhibice se ovšem může projevit u jakýchkoliv léčiv metabolizovaných systémem P450. Klasickým příkladem je kombinace antihistaminika terfenadinu a silného inhibitoru CYP3A4, ketokonazolu, která může vést až k fatálním ventrikulárním arytmiím [71]. Opačný problém nastává u tzv. proléčiv (prodrug), které potřebují metabolismus pro svoji přeměnu na účinnou látku. Kvůli inhibici enzymu nedochází ke vzniku aktivní látky a tedy ani k terapeutickému efektu.

3.3.3.2.1 Mechanismy inhibice

Obecně můžeme mechanismy inhibice rozdělit do třech kategorií, a to reversibilní, quasi-reversibilní a ireversibilní inhibice [72]. Je ale důležité si uvědomit, že na základě chemické struktury mohou některé molekuly vykazovat více než jeden typ mechanismu inhibice.

3.3.3.2.1.1 Reversibilní inhibice

Reversibilní inhibici mají často na svědomí inhibitory, které obsahují ve své struktuře dusík. Jsou to imidazoly, pyridiny nebo chinoliny. Tyto látky se mohou vázat na hemové

železo, ale také na lipofilní část molekuly P450 [72]. Reversibilní inhibice může být klasifikována na kompetitivní, nekompetitivní, smíšenou nebo akompetitivní (Obrázek 4). Kompetitivní inhibitor se váže na volný enzym a brání vazbě substrátu, často opravdu díky soutěži o vazbu na stejné místo. Obecně to může být analog substrátu, jiný substrát nebo produkt reakce. Naopak nekompetitivní inhibice nemá vliv na vazbu substrátu. Jak inhibitor, tak substrát se vážou nezávisle. Enzym se po vazbě inhibitoru a substrátu stává neaktivním. Předpokládá se, že vazba inhibitoru deformuje enzym tak, že substrát se není schopen navázat do správné pozice ke katalytickému místu enzymu [73]. Přejít mezi těmito dvěma základními typy reversibilní inhibice tvoří tzv. smíšená inhibice. Takový inhibitor má schopnost vázat se jak na volný enzym, tak i na komplex enzym-substrát [74]. Akompetitivní inhibitor se vyznačuje schopností vázat se pouze na vytvořený komplex enzym – substrát, který vyřadí z funkce. S volným enzymem nijak neinteraguje a dá se říct, že tento typ inhibice je vzácný [73].

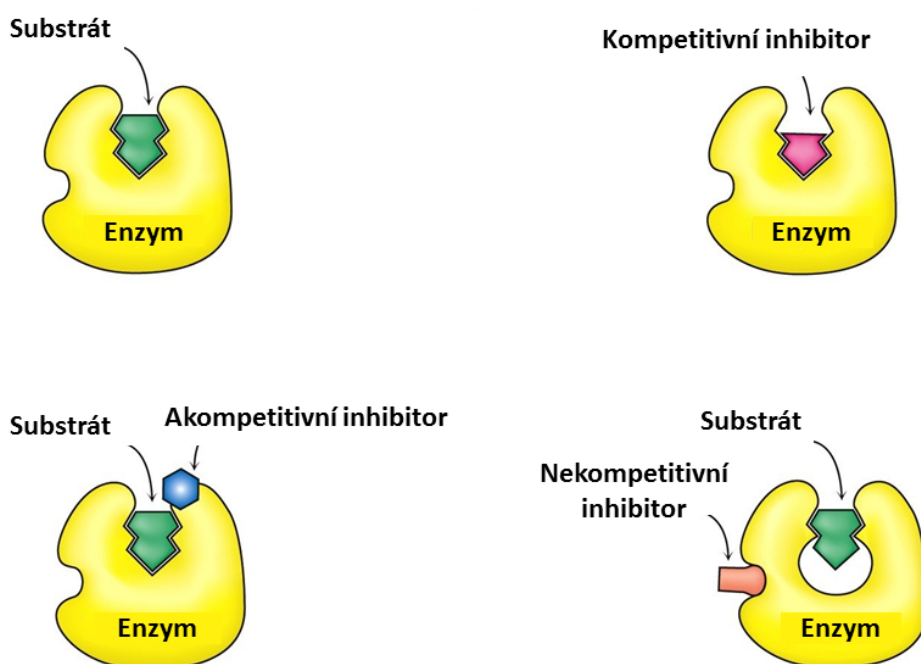
3.3.3.2.1.2 *Quasi-reversibilní inhibice*

V průběhu metabolismu řady léčiv vznikají reaktivní metabolity a cytochromy P450 způsobí tzv. metabolickou aktivaci těchto sloučenin, to znamená, že jejich metabolity mají schopnost tvořit stabilní intermediární komplexy s molekulou hemu P450. Takto vázaný P450 je pak enzymaticky neaktivní, ovšem celý proces se dá zvrátit a funkce P450 se tak obnoví. To však funguje pouze při *in vitro* experimentech. Ve skutečnosti je vzniklý komplex tak stabilní, že nefunkční enzym musí být nahrazen jeho novou syntézou. Typickým příkladem jsou alkylaminy, makrolidová antibiotika, zejména troleandomycin a erytromycin nebo hydraziny [72].

3.3.3.2.1.3 *Ireversibilní inhibice*

Ireversibilní inhibice typicky patří mezi inhibice nazývané „*mechanism-based*“. Vyznačuje se nevratnou inaktivací enzymu způsobenou právě vznikajícími metabolity. Celý proces je koncentračně a časově závislý (time-dependentní). Čím déle je inhibitor vystaven reakci s P450, tím je inhibice silnější. Další podmínkou reakce je přítomnost

systemu NADPH, který dodá potřebné elektrony. Vznik reaktivních metabolitů bývá podmíněn přítomností typických funkčních skupin ve struktuře, kterými jsou terminálníacetyleny, olefiny, furany, tiofeny, epoxidy, aminy, dichlor- a trichlor-etyleny, metylendioxyfenyly, konjugované struktury, hydraziny, isothiokyanáty, thioamidy nebo dithiokarbamáty. Lékové interakce způsobené ireversibilním inhibítorem mívají vážný klinický dopad, protože takto inaktivovaný enzym je nutné nahradit novou syntézou [75, 76].



Obrázek 4 Typy reversibilní inhibice. Znázornění interakce mezi inhibítorem, enzymem a substrátem při kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní inhibice [77].

3.3.4 Lékové interakce na úrovni genů

Genetický polymorfismus je častou příčinou interindividuální variability v odpovědi organismu na léčivo. Většina polymorfismů se sice neprojeví, ale některé mohou způsobit pozmeněnou aktivitu či funkci kódovaného enzymu. Pokud dojde k záměně aminokyseliny v protein-kódující oblasti, může dojít ke změně katalytické aktivity

enzymu. Typickým příkladem je alela CYP2C9*3, kde dochází k I359L záměně a výsledný protein má sníženou funkci na pouhých 10% [78]. Jiným příkladem je mutace v regulační oblasti genu, která způsobuje změny v genové expresi. Tento případ je ale poměrně vzácný. Naopak, pokud se nachází mutace v oblasti rozhraní intronu a exonu, může dojít k chybnému sestřihu primárního transkriptu, takže je ovlivněna délka proteinu a tudíž i jeho funkce. V praxi se taková změna projeví například fenotypem pomalého metabolizátora u CYP2D6 nebo CYP2C19 [6]. Pomalí metabolizátoři CYP2C19 mají signifikantně sníženou antiagregační účinnost klopido-grelem, který je podáván jako proléčivo a ke své metabolické aktivaci potřebuje funkční enzym CYP2C19 [79]. Genetický polymorfismus může být zodpovědný i za případné znásobení celého genu. Příkladem může být CYP2D6, kde ultra rychlý metabolizátor nese až 13 kopií genu. Výsledná aktivita CYP2D6 vede k abnormálně rychlému zpracování substrátů [80].

Ačkoliv jsou genetické polymorfismy známé pro většinu genů kódujících enzymy účastníci se I. i II. fáze metabolismu, klinický význam mají zejména polymorfismy genů kódujících CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6. Jsou zodpovědné za větší část interindividuální odpovědi na léčbu v populaci. Tyto enzymy se účastní metabolismu běžně používaných léčiv, příkladem jsou nesteroidní antiflogistika metabolizovaná CYP2C9, inhibitory protonové pumpy metabolizované typicky CYP2C19 nebo β -blokátory a některá antipsychotika a antidepresiva patřící mezi substráty CYP2D6. Klinický dopad polymorfismů pro různá léčiva se liší [24]. Populační distribuce každého polymorfismu závisí na etniku. Například 10% bělošské populace patří k fenotypu CYP2D6 pomalého metabolizátora, v asijské a černošské populaci je to však pouze 1 % [81].

Z polymorfismů konjugačních enzymů II. fáze metabolismu je nejznámější UGT1A1*28 alela, která je spojena s hyperbilirubinemií, tzv. Gilbertovým syndromem. Množství polymorfismů bylo také identifikováno v genech kódujících lékové transportéry, což je spojeno většinou se zvýšeným rizikem nežádoucích účinků. Příkladem je rozvoj renální proximální tubulopatie po podání tenofoviru, která souvisí s haplotypem tzv. *multi drug resistance associated* proteinu z rodiny ABC transportérů [82].

3.3.5 Predikce lékových interakcí cytochromů P450 *in vitro*

Metabolismus léčiv je složitý děj, který může zahrnovat jak reakci jednoho enzymu, tak spolupráci několika enzymů a různých cest biotransformace současně. Pro předpověď lékových interakcí je důležité znát cestu biotransformace léčiva, které formy P450 a do jaké míry jsou zapojeny do metabolismu. V současné době existuje několik metod pro předpověď možných lékových interakcí. Jednak jsou to počítačové *in silico* metody [83], ale za zlatý standard jsou stále považovány experimentální *in vitro* metody za použití lidských enzymových preparátů, ať už lidských jaterních mikrosomů, rekombinantních enzymů nebo čerstvých jaterních hepatocytů. Podle současných doporučení *Food and Drug Administration* (FDA) i evropské *European Medicines Agency* (EMA), musí každý nový lék projít tímto testováním. Počáteční studie by měly začít identifikací, zda je léčivo substrát, inhibitor nebo induktor biotransformačních enzymů a tyto poznatky by pak měly být přeneseny na *in vivo* experimenty. Inhibiční experimenty P450 by měly zahrnovat studium CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP3A a určení mechanismu inhibice, zejména zda se jedná o reversibilní či ireversibilní inhibici a stanovení inhibičního potenciálu pomocí inhibiční konstanty K_i . Pokud je *in vitro* pozorována reversibilní inhibice, riziko inhibice *in vivo* se vyhodnocuje porovnáním hodnot K_i s koncentrací léčiva během klinického použití [84, 85].

3.4 Stereoisomerie léčiv

Chirální látky, tj. látky vykazující asymetrii prostorové struktury. Optické isomery sdílí stejný molekulový vzorec, stejné vazby mezi atomy i vazebné vzdálenosti. Mohou se k sobě mít jako předmět ke svému obrazu v zrcadle. Přitom nelze tyto stereoisomery nasměrovat tak, aby se vzájemně kryly a ztotožnily. Jejich chiralita se také projeví jejich schopností opačně stáčet rovinu lineárně polarizovaného světla.

Živé systémy obvykle fungují na základě specifických vztahů mezi strukturou a aktivitou, jak u enzymů, receptorů, transportérů tak i DNA. Proto se mohou jednotlivé stereoisomery a chirální směsi zcela lišit v jimi vyvolané biochemické reakci. To platí samozřejmě i u léčiv, kdy se enantiomery jedné substance mohou lišit

ve svých vlastnostech. Jeden z enantiomerů může mít žádoucí farmakologický účinek, zatímco druhý může ovlivňovat odlišné fyziologické funkce, může mít jiné interakce a jinou biologickou aktivitu.

3.4.1 Stereoisomerie

Chirální látky obsahují ve své molekule aspoň jedno chirální centrum, nejčastěji se jedná o atom uhlíku, který má navázané čtyři odlišné substituenty. Rozlišujeme pojem diastereoisomery, což jsou látky, které nejsou svými vzájemnými zrcadlovými obrazy a enantiomery, které naopak jsou svými zrcadlovými obrazy (Obrázek 5). Diastereoisomery můžeme dále rozdělit na *cis*- a *trans*- a mohou se od sebe lišit fyzikálními vlastnostmi i určitým chováním k chirálnímu i achirálnímu prostředí. *Cis*-diastereoisomery mají všechny substituenty orientované na jednu stranu, zatímco pokud jsou nasměrovány opačným směrem, mluvíme o *trans*-diastereoisomerech. Enantiomery se neliší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, ale oba mají schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla, *levo*- doleva a *dextro*- doprava. To se projeví až při interakci s dalším chirálním systémem [86]. Pokud máme přítomné oba enantiomery ve směsi, označujeme ji jako racemát.

Nomenklatura těchto látek využívá více charakteristik. Klasické označení *levo*- (-) a *dextro*- (+) vychází ze směru stáčení roviny polarizovaného světla. U aminokyselin a sacharidů se používá tzv. Fischerova projekce, která jednotlivé stereoisomery označuje jako D/L. U chemických látek a léčiv obecně se nejčastěji používá tzv. *Cahnovo-Ingoldovo-Prelogovo* řazení, které označuje sloučeniny jako R- a S- podle řazení prioritních skupin na chirálním uhlíku. Komplexnější *cis-trans* označení pak popisuje E/Z systém, Z-isomer má substituenty s vyšší prioritou na stejné straně a E-isomer je má na opačných stranách [87].

3.4.2 Chirální léčiva

V současné době je na trhu asi polovina léčiv v podobě racemátu, tedy jako směs R- a S- enantiomerů v poměru 1:1. Nicméně použití čistých enantiomerů se dostává do popředí. Z nově registrovaných léčivých přípravků v letech 2005 až 2008 bylo 47 %

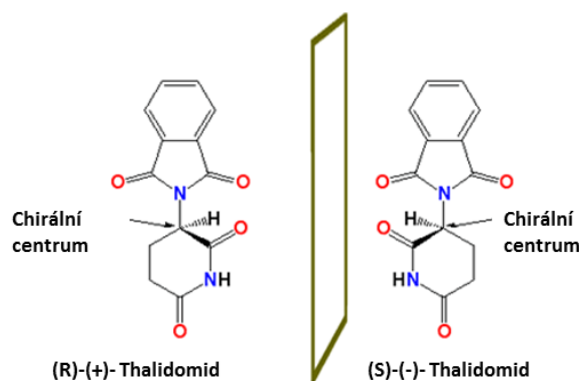
opticky aktivních. Jen 8 % bylo ale ve formě racemátu, od jejich použití se v poslední době totiž opouští [88]. Jednotlivé enantiomery mají často jinou farmakokinetiku i farmakodynamiku, proto použití jen jednoho enantiomeru z chirálního páru má svá jistá pozitiva. Mohou se lišit absorpcí jako *L*-metotrexát, který je lépe absorbovatelný než jeho *D*-forma, esomeprazol má zase lepší biologickou dostupnost než racemát. Rozdíl v distribuci bývá typický pro enantiomery warfarinu, *S*- warfarin je vázán na plazmatický albumin mnohem více než jeho *R*-forma. V neposlední řadě existují také rozdíly v jejich metabolismu [89, 90].

Farmakodynamické rozdíly se mohou projevit v odlišné interakci s receptory, enzymy nebo jinými cílovými strukturami. Příkladem může být karvedilol, lék pro terapii vysokého krevního tlaku. *S*-karvedilol je neselektivní β -blokátor, kdežto *R*-karvedilol je účinný α -blokátor [91]. Obvykle bývá jeden enantiomer léčiva farmakologicky účinnější, než ten druhý. Tento případ platí i pro ibuprofen. Ten se podává jako racemát, ale farmakologicky účinný je pouze *S*-ibuprofen. Tento čistý enantiomer byl uveden na trh jako dexibuprofen a má prokazatelně méně nežádoucích účinků a stejný analgetický efekt už při použití polovičního množství racemátu [92]. Neúčinný enantiomer v racemické směsi se může považovat pouze za zbytečný balast, který zatěžuje organismus. Způsobuje nežádoucí účinky a podílí se na lékových interakcích. Při použití enantiomerně čisté látky je organismus vystaven menšímu metabolickému, jaternímu i renálnímu zatížení [87, 88, 93]. Navíc použití čistého enantiomeru může znamenat i dobrý marketingový tah farmaceutických společností. Pokud existoval lék původně jako racemická směs, čistý účinný enantiomer může představovat novou možnost, jak získat nový patent na léčivo, aniž by bylo potřeba zdlouhavého a finančně náročného vývoje nového léčiva. V poslední době byla na trh uvedena řada tzv. enantiomerně čistých léčiv (Tabulka 4) [94].

3.4.3 Stereospecifický metabolismus léčiv

Obecně se dají živé biologické systémy považovat za chirální prostředí, zejména díky skladbě proteinů a sacharidů, které jsou tvořeny *L*-aminokyselinami a *D*-sacharidy. Stejně tak se může pohlížet i na strukturu DNA, která je tvořena pravotočivými α -helixy [95]. Kvartérní struktury tvoří specifická katalytická a vazebná místa a různé

stabilizační domény. To platí i pro molekuly cytochromů P450, které tvoří chirální prostředí a stereospecifické interakce substrátů a inhibitorů jsou pro ně typické. Stereoselektivní biotransformační děje byly popsány u mnoha léčiv. Pokud probíhá metabolismus jednoho enantiomeru preferenčně, mluvíme o substrátové stereospecifitě, zatímco stereoselektivita produktu se týká preferenčního vzniku jednoho konkrétního metabolitu-stereoisomeru oproti jiným [88].



Obrázek 5 Prostorové uspořádání R- a S-thalidomidu. Na přítomném chirálním centru jsou navázány čtyři odlišné substituenty. Dva vzniklé enantiomery chirálního léčiva thalidomidu jsou svými vzájemnými zrcadlovými odrazy [96].

Stereospecifita se týká například metabolismu omeprazolu, který podléhá biotransformaci přes CYP2C19 a CYP3A4. Sulfoxidace katalyzovaná CYP3A4 silně upřednostňuje S-omeprazol, zatímco 5-*O*-demetylace přes CYP2C19 probíhá snadněji u R- formy [97]. Některé enantiomery mohou podléhat v organismu racemizaci neboli chirální inverzi. Ta probíhá buď spontánně, nebo je ulehčena přítomností určitého proteinu. Klasickým příkladem chirální inverze je přeměna nechvalně známého sedativa z 50. let R-thalidomidu na S-thalidomid v lidském séru. Až po uvedení léčiva na trh se zjistilo, že R-thalidomid sice působil proti těhotenským nevolnostem, ale S- byl silně teratogenní a měl na svědomí vývojové vady novorozenců [96]. Mimo to se mohou dva enantiomery jednoho chirálního léčiva lišit i v efektu prvního průchodu játry, mohou podléhat jiným metabolickým dějům při konjugační fázi a v neposlední řadě se liší také lékovými interakcemi [88]

Tabulka 4 Příklady chirálních léčiv, racemátů a jejich schválených čistých enantiomerů, doplněno o vybrané léčivé přípravky registrované v ČR, upraveno dle [87].

<i>Isomer</i>	<i>Racemát</i>
Armodafinil (Nuvigil®)*	Modafinil (Vigil®)
Cisatracurium (Nimbex®)	Atracurium (Tracrium®)
Desloratadin (Aerius®)	Loratadin (Claritin®)
Dexametason (Fortecortin 4®)	<i>chybí</i>
Dexchlorfeniramin (Polaramine®)*	Chlorfeniramin (Histodine A. U. V.®)
Dexmedetomidin (Dexdor®)	Medetomidin (Domitor A. U. V.®)
Dexmetylfenidat (Focalin®)*	Metylfenidat (Ritalin®)
Dextroamfetamin (Dexedrine®)	Amfetamin (Adderall®)*
Dextrometorfan (Stopex®)	<i>chybí</i>
Escitalopram (Esoprex®)	Citalopram (Citalec®)
Esomeprazol (Helides®)	Omeprazol (Helicid®)
Eszopiklon (Lunesta®)*	Zopiklon (Zopitin®)
Levalbuterol (Xopenex®)*	Salbutamol (Ventolin®)
Levobetaxolol (Betaxon®)*	Betaxolol (Lokren®)
Levobunolol (Vistagan Liquifilm® 0,5%)	<i>chybí</i>
Levocabastin (Livostin®)	<i>chybí</i>
Levocetirizin (Xyzal®)	Cetirizin (Zyrtec®)
Levofloxacin (Tavanic®)	Ofloxacin (Ofloxin®)
Levonorgestrel (Postinor®)	Norgestrel (Lo/Ovral®, Cryselle®)*
Levorfanol (Levo-Dromoran®)*	<i>chybí</i>
Levotyroxin (Euthyrox, Letrox®)	<i>chybí</i>

*Není registrován v ČR

3.4.4 Stereospecifické lékové interakce

Pokud je metabolismus chirálních léčiv zprostředkovaný P450, může dojít k vzájemným interakcím enantiomerů ať už mezi sebou vzájemně nebo s jinými léčivy. Podání racemátu do organismu si můžeme představit jako podání dvou různých

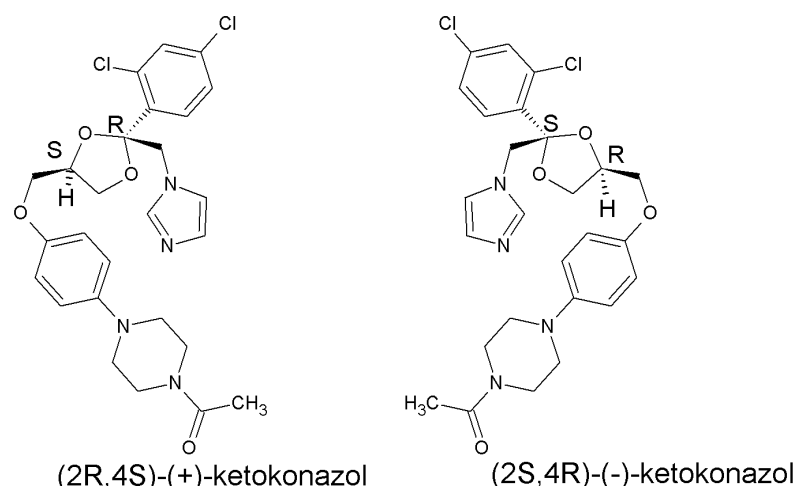
léčiv a stereochemie by měla být brána v potaz. Pokud jeden enzym katalyzuje přeměnu enantiomerů stejného léčiva, většinou se tak děje různou rychlostí a oba enantiomery spolu mohou interagovat, soutěžit a vzájemně se inhibovat. To je případ antiarytmika propafenonu, který je podáván ve formě racemátu. Oba jeho enantiomery jsou farmakologicky účinné a jsou metabolizovány pomocí CYP2D6. R- i S-propafenony, však inhibují aktivitu tohoto enzymu kompetitivním mechanismem a ovlivňují svůj metabolismus navzájem [98]. Enantiomery mohou ale podléhat i odlišným biotransformačním dějům zprostředkovaným různými formami P450. Další podané léčivo, tedy potencionální inhibitor nebo induktor katalytické aktivity P450, pak ovlivní metabolismus v úplně jiném rozsahu. Metabolismus jednoho enantiomeru může být zasažen, zatímco druhý probíhá beze změn [72, 99]. Typicky můžeme uvést známý případ warfarinu, jež se podává jako racemická směs dvou R- a S-enantiomerů, které podléhají odlišným biotransformačním přeměnám. R-warfarin je přeměněn CYP1A2 a CYP2C19 převážně na R-6-hydroxywarfarin a R-7-hydroxywarfarin a farmakologicky účinnější S-warfarin je konvertován pomocí CYP2C9 na S-7-hydroxywarfarin a v menším měřítku i na S-6-hydroxywarfarin [89, 100]. Po podání inhibitoru CYP1A2 enoxacinu, dojde ke snížení clearance R-warfarinu, ale S-warfarin zůstává v normě [101]. Stejný případ nastane i po podání cimetidinu [102]. Naopak bylo dokázáno, že současné podání amiodaronu s warfarinem stereospecificky inhibuje převážně metabolismus S-warfarinu a na R-warfarin takový vliv nemá. Vlivem této interakce dochází k zesílenému antikoagulačnímu efektu warfarinu [103]. Případů stereospecifické inhibice aktivity P450 existuje ale celá řada. Jmenovitě inhibice aktivity CYP2D6 S-haloperidolem je desetkrát potentnější než u jeho R-formy [104], R-fluoxetin inhiboval aktivitu CYP2C19 27-krát silněji než S-fluoxetin a naopak S-fluoxetin inhiboval aktivitu CYP3A4 2-krát více než R-fluoxetin [105]. Rozdíly v inhibiční síle se projevily i u inhibice omeprazolu, lansoprazolu [106], atorvastatinu, fluvastatinu, [107] a mnoha dalších.

3.5 Přehled zkoumaných chirálních léčiv

3.5.1 Azolová antimykotika

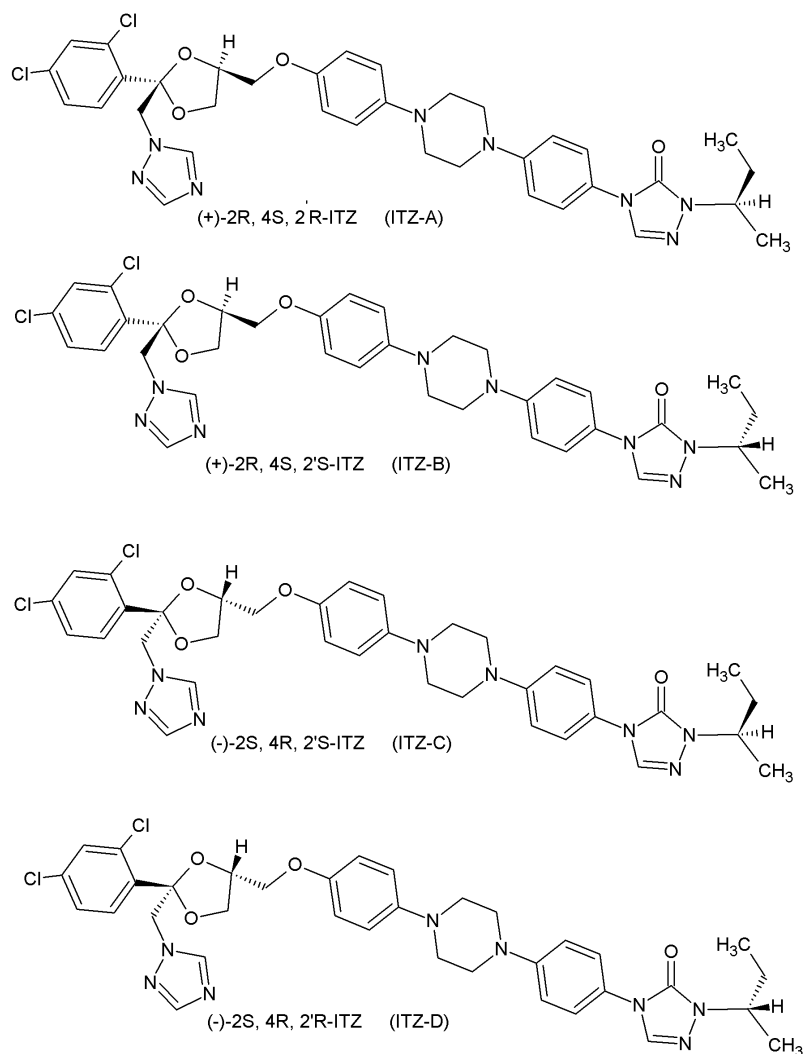
Azolová antimykotika jsou syntetické látky určené k léčbě lokálních a systémových mykóz především u imunokompromitovaných pacientů a pacientů s AIDS. Mechanismus účinku spočívá v inhibici fungálního P450 CYP51A, lanosterol-14- α -demetylázy, která zabraňuje syntéze ergosterolu tvořícího buněčné membrány hub [90].

Ketokonazol (KET) byl prvním orálně účinným imidazolovým antimykotikem. V současné době však převládá jeho lokální podání. Ve velké míře se metabolizuje enzymem CYP3A4 a považuje se za inhibitor aktivit několika forem P450: slabě CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, a silně CYP3A [108]. S tím souvisí i jeho náchylnost k lékovým interakcím, které mají mnohdy závažné klinické následky. Patří sem interakce se statiny, tricyklickými antidepresivy, antivirotiky, antikonvulzivy a mnoha dalšími léčivy [109]. Ve své struktuře obsahuje dvě chirální centra a tvoří 4 enantiomery, nicméně terapeutické využití má pouze směs účinnějších *cis*-enantiomerů, (2R,4S)-(+)-ketokonazol a (2S,4R)-(-)-ketokonazol (Obrázek 6) [110]. Ukázalo se, že oba *cis*-enantiomery se liší ve svých farmakokinetických, farmakodynamických i toxických vlastnostech. Například schopností inhibovat progesteron 17 α ,20-lyasu, kdy ji (+)-KET dokázal utlumit 40-ti násobně více než (-)-KET [110]. Další rozdíly se ukázaly i u inhibice CYP3A [111] a dokonce i v terapeutické účinnosti vůči různým druhům patogenů [112].



Obrázek 6 Struktura *cis*-enantiomerů ketokonazolu s vyznačenými chirálními centry [110].

Itrakonazol (ITZ) je další zástupce azolových antimykotik s širokým využitím při léčbě mykóz, plísňových infekcí, aspergilóz a v prevenci těchto onemocnění u pacientů po transplantacích [113]. Metabolismus itrakonazolu probíhá primárně za účasti CYP3A4. Je silným inhibítorem aktivity CYP3A s velkou řadou klinicky závažných lékových interakcí. Zejména současné podání s cyklosporinem, takrolimem, alprazolamem, nifedipinem nebo simvastatinem může být nebezpečné [114-116]. Struktura itrakonazolu obsahuje triazolový kruh a tři chirální centra, což dává možnost vytvořit až 8 různých stereoisomerů (Obrázek 7). Směs dostupná na klinickém trhu je však směs pouze 4 *cis*-diastereoisomerů (dva enantiomerní páry): (+)-2R,4S,2'R-ITZ (ITZ-A); (+)-2R,4S,2'S-ITZ (ITZ-B); (-)-2S,4R,2'S-ITZ (ITZ-C) a (-) 2S,4R,2'R-ITZ (ITZ-D). Itrakonazol podléhá stereospecifickému metabolismu a má složitější farmakokinetiku, jelikož jednotlivé plazmatické koncentrace diastereoisomerů se mohou lišit [117].



Obrázek 7 Struktury cis-diastereoisomerů itraconazolu se třemi chirálními centry [118].

3.5.2 Čisté enantiomery

Ve vývoji léčiv se objevily nové trendy. Čisté enantiomery začaly nahrazovat racemické směsi. Použitím jednotlivého enantiomeru bylo dosaženo cílenějšího farmakodynamického chování, nižšího dávkování, snížení pravděpodobnosti výskytu nežádoucích účinků a stejného, ne-li lepšího terapeutického účinku [119, 120]. Bylo studováno pět terapeuticky i strukturně odlišných léčiv, která byla na trh nově uvedena ve formě čistého enantiomeru (Obrázek 8). Před jejich zavedením na trh byl zkoumán

pouze jejich enantiospecifický terapeutický účinek, ale další biologické aktivity testovány nebyly.

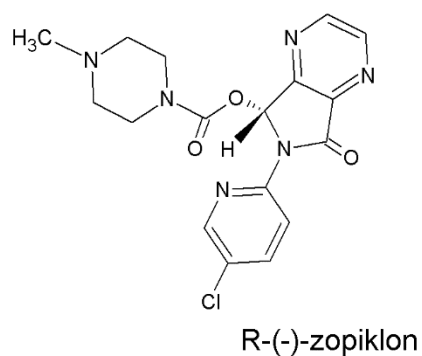
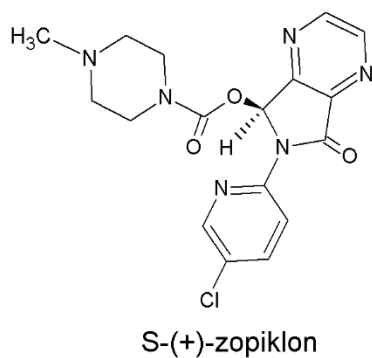
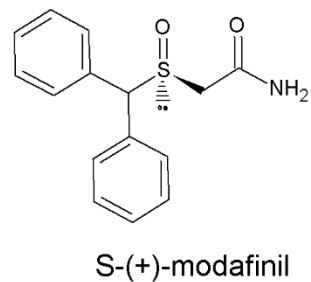
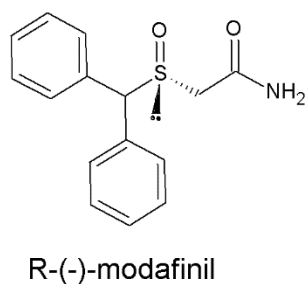
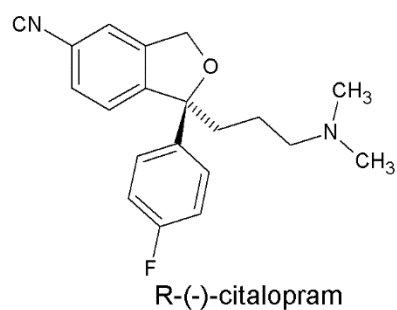
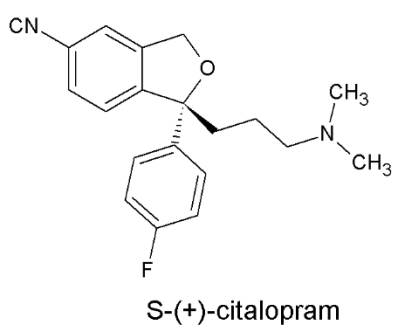
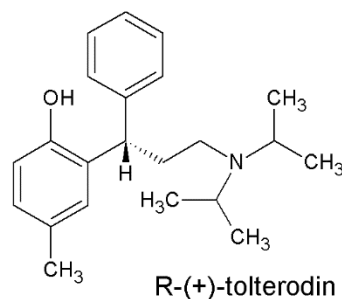
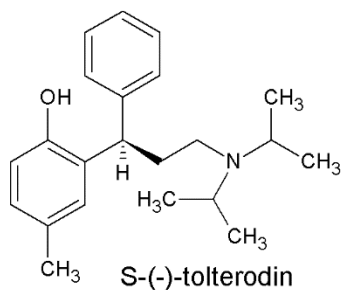
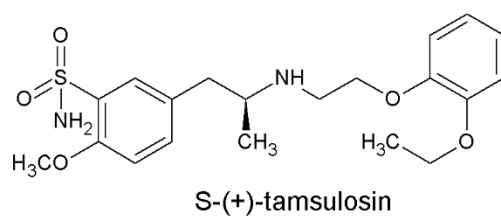
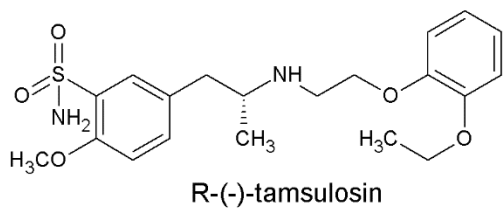
Tamsulosin (TAM) je nejčastěji předepisovaný selektivní α_1 -blokátor pro léčbu benigní hyperplazie prostaty. Původní racemát byl v roce 1997 nahrazen na trhu čistou formou R-tamsulosinem [121, 122]. V těle je odbouráván za přispění CYP3A4 a CYP2D6 [123]. Nicméně o jeho lékových interakcích na úrovni P450 se toho mnoho neví.

Tolterodin (TOL) je antimuskarinové léčivo určené k léčbě hyperaktivního močového měchýře. Enantiomerní lék R-tolterodin byl schválen úřadem FDA v roce 1998 [124]. Jaterní metabolismus probíhá přes dvě odlišné cesty katalyzované CYP3A4 a CYP2D6 a informace o inhibici či indukci P450 jsou jen minimální.

Citalopram (CIT) patří do skupiny selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu. Je určený k léčbě deprese a úzkostných poruch, stejně jako S-CIT, který se objevil na trhu v roce 2002 [125]. Odbourávání CIT z organismu zajišťují CYP2C19, CYP3A4 a v malém množství i CYP2D6 [126]. Escitalopram je také považován za slabý inhibitor aktivity CYP2D6 [127].

Zopiklon (ZOP) je široce předepisované nebenzodiazepinové hypnotikum 3. generace, které působí na GABA-receptory. Je metabolizován převážně přes CYP3A4 a CYP2C8 [128, 129]. Od roku 2006 je úřadem FDA schválený S-zopiklon [130]. Lékové interakce s inhibitory P450 se objevují, ale informace o inhibiční účinnosti zopiklonu a jeho enantiomerů nejsou doposud známy [131].

Modafinil (MOD) je látka podporující bdělost při léčbě narkolepsie nebo při léčbě hyperkinetické poruchy. Od roku 2007 je schválený i armodafinil (R-modafinil). P450 se na jeho metabolismu podílejí jen minimálně, hlavní cesta biotransformace zahrnuje hydrolýzu amidu. MOD ve formě racemátu vykazoval inhibiční potenciál vůči aktivitám CYP2C9 a CYP2C19 v lidských jaterních mikrosomech a působil slabě indukčně na aktivity CYP1A2, CYP2B6 a CYP3A4 aktivity [132, 133]. Inhibice CYP2C19 se projevila i u R-MOD [134].



Obrázek 8 Chemické struktury terapeuticky aktivních enantiomerů chirálních léčiv. Každá látka obsahuje jedno chirální centrum a může tvořit dva enantiomery [135].

3.5.3 Dihydropyridinové blokátory vápníkových kanálů

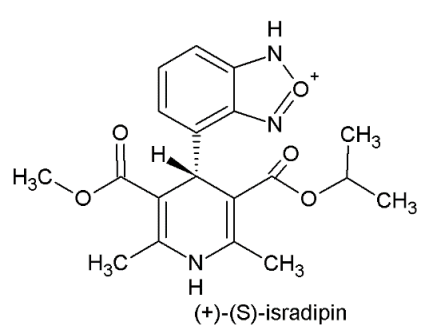
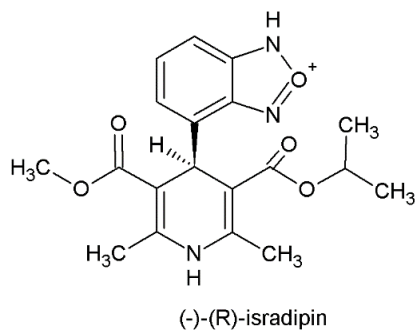
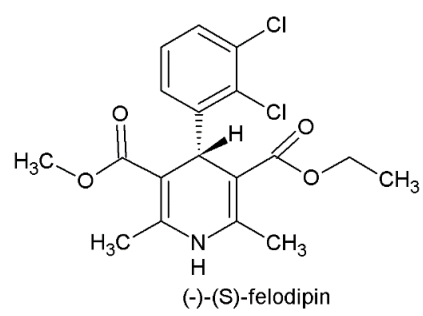
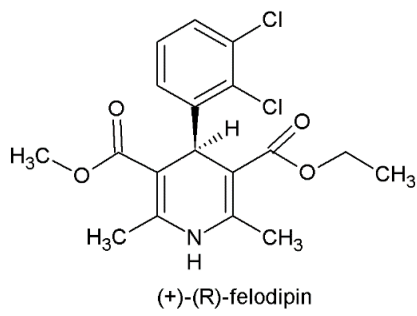
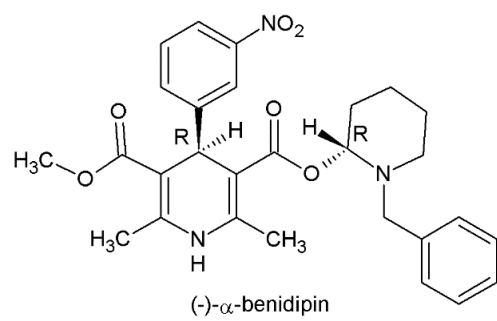
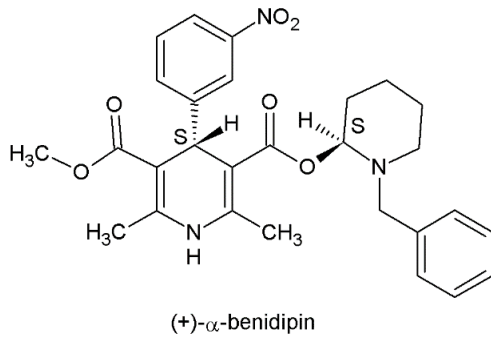
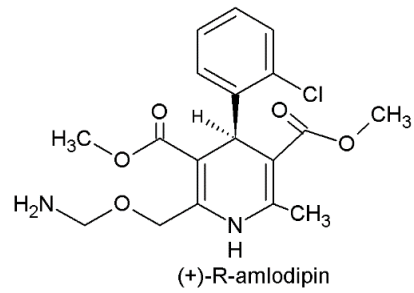
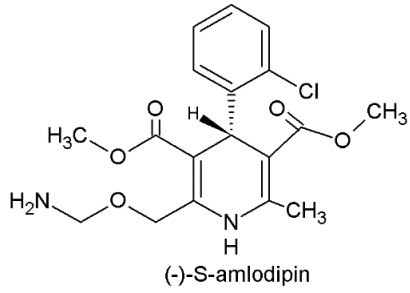
Dihydropyridinové blokátory vápníkových kanálů jsou rozšířená léčiva, která se používají zejména k léčbě hypertenze. Váží se na struktury specifických vápníkových kanálů a blokují tak vstup vápníku do buněk. Způsobují vazodilataci, s tím souvisejí i některé nežádoucí účinky: bolesti hlavy, epizody zčervenání a otoky dolních končetin. Dihydropyridiny jsou metabolizovány enzymem CYP3A4 a neměly by se proto kombinovat s jeho substráty, inhibitory a induktory [90]. V jejich struktuře se objevuje dihydropyridinový kruh a nejméně jedno chirální centrum (Obrázek 9).

Amlodipin (AML) je jedním z nejvíce předepisovaných dihydropyridinů užívaných na léčbu hypertenze a anginy pectoris [136]. Má ve své struktuře jedno chirální centrum a je komerčně dostupný jako racemát. Ukázalo se, že S-AML je 1000-krát farmakologicky účinnější než jeho R-forma [137]. V některých asijských zemích je proto již dostupný enantiomerně čistý S-AML [138]. Amlodipin může ovlivňovat současně podaná léčiva. Může zvýšit koncentraci statinů a tím i riziko rozvoje myopatie nebo naopak, snížit účinek klopidogrelu [139, 140].

Benidipin (BEN) je dalším zástupcem dihydropyridinových blokátorů vápníkových kanálů. Se svými dvěma chirálními centry může tvořit 4 enantiomery, nicméně jako léčivo se používá směs dvou enantiomerů: (+)- α a (-)- α . Experimenty s potkany ukázaly, že hypotenzní účinek (+)- α -benidipinu je 30-100-krát vyšší než u (-)- α -benidipinu [141]. Racemický benidipin prokázal inhibici CYP3A4, CYP1A1, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6 v lidských jaterních mikrosomech [142].

Felodipin (FEL) má ve své struktuře jen jedno chirální centrum a tvoří (+)-(R)-FEL a (-)-(S)-FEL. Na trhu je dostupný pouze ve formě racemátu, ale studie prokázala, že (-)-(S)-FEL je farmakologicky účinnější než jeho druhý enantiomer [143]. Lékové interakce felodipinu by mohly být na základě jeho schopnosti inhibovat CYP3A4 a CYP2C9 enzymové aktivity v lidských jaterních mikrosomech [144].

Isradipin (ISR) je dalším zástupcem této lékové skupiny s jedním chirálním uhlíkem ve své struktuře. Existují tedy dva enantiomery: (+)-(S)-ISR a (-)-(R)-ISR, kde je (+)-(S)-forma prokazatelně farmakologicky účinnější [145]. O inhibičním potenciálu isradipinu na aktivitu P450 je toho známo jen velmi málo.



Obrázek 9 Chemické struktury testovaných chirálních dihydropyridinových blokátorů vápníkových kanálů [146].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

4.1.1 Chemikálie

R-amlodipin, S- amlodipin, R-citalopram, S-citalopram a racemický (RAC-)citalopram byly zakoupeny u firmy Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg, Německo). Enantiomery benidipinu, felodipinu a isradipinu; a *cis*-enantiomery ketokonazolu (2R, 4S)-(+)-KET, (2S, 4R)-(-)-KET a *cis*-diastereoizomery itrakonazolu ((+)-2R,4S,2'R-ITZ, (+)-2R,4S,2'S-ITZ, (-)2S,4R,2'S-ITZ a (-)2S,4R,2'R-ITZ) byly izolovány z racemátů zakoupených u firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika) chirální chromatografií pomocí Knauer Smartline HPLC systému (Knauer, Berlín, Německo) spoluřešitelem projektu GAČR (doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.) na Ústavu analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. R-tolterodin, S-tolterodin, R-tamsulosin, S-tamsulosin, RAC-zopiklon a S-zopiklon byly bezplatně poskytnuty od firmy FARMAK a.s. (Olomouc, Česká republika). R-modafinil, S-modafinil, RAC-modafinil a R-zopiklon byly zakoupeny u firmy TLC PharmaChem Inc. (Vaughan, Kanada).

U firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika) byly také zakoupeny DL-isocitrát, isocitrátdehydrogenasa a NADP (nikotinamidadeninukleotidfosfát), které byly potřebné pro stanovení enzymatických aktivit. Pro přípravu roztoků, pufrů a mobilních fází byly objednány dihydrogenfosforečnan sodný, dihydrogenfosforečnan draselný, hydroxid sodný, hydroxid draselný, octan sodný, chloroform, kyselina fosforečná, uhličitan sodný, chlorid sodný a síran hořečnatý od firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika); Acetonitril, metanol, 2-propanol, dichlormetan od firmy VWR (Fontenay-sous-Bois, Francie); etanol, kyselina chloristá a kyselina octová byly zakoupeny u firmy Penta (Praha, Česká republika). Poskytovatelem dusíku pro odpařování a oxidu uhelnatého pro stanovení cytochromů P450 byla firma Linde Technoplyn (Česká republika). Všechny použité chemikálie měly označení čistoty p.a. a ty chemikálie, které se používaly pro práci s HPLC byly *HPLC gradient grade*.

Specifické substráty a metabolity pro stanovení enzymových aktivit

Firma Fluka (Buchs, Švýcarsko) byla dodavatelem etoxyresorufinu, 7-etoxy-4-(trifluorometyl)kumarinu a 4'-hydroxydiklofenaku. Kumarin, testosteron, diklofenak, bufuralol, chlorzoxazon, resorufin, *S*-mefenytoin, 7-hydroxykumarin, 7-hydroxy-4-(trifluorometyl)kumarin, 1'-hydroxymidazolam, 6-hydroxychlorzoxazon, 1'-hydroxybufuralol a 6-hydroxypaklitaxel byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká Republika). 6 β -hydroxytestosteron byl pořízen od firmy Ultrafine (Manchester, UK), paclitaxel u firmy Chemos CZ (Praha, Česká republika), 4-hydroxymefenytoin byl zakoupen od Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Kanda) a midazolam byl zakoupen od firmy Abcam (Cambridge, UK).

4.1.2 Enzymy

4.1.2.1 Směsné lidské jaterní mikrosomy

Směsné lidské jaterní mikrosomy (mikrosomální frakce) byly zakoupeny u firmy Xenotech (Lenexa, KS, USA). Dodané mikrosomální frakce byly získány v souladu s etickými pravidly země původu. Směsné mikrosomy byly získány od 26 mužů a 24 žen, celková koncentrace P450 byla 8 μ mol/ml a koncentrace proteinu 38,4 mg/ml. Další detaily o CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4/5 jsou dostupné na oficiálním webu společnosti (www.xenotechllc.com).

4.1.2.2 Jaterní mikrosomy se specifickým genotypem

Geneticky definované lidské jaterní mikrosomy od individuálních dárců s charakterizovanými alelami pro různé CYP2C9 a CYP2C19 odpovídající fenotypu žádné, střední a vysoké enzymové aktivity byly získány od firmy Xenotech (Lenexa, KS, USA) (Tabulka 5).

Tabulka 5 Geneticky definované mikrosomy od individuálních dárců.

<i>Enzym</i>	<i>Fenotyp/aktivita</i>	<i>Alela</i>	<i>Obsah P450 (nmol/mg)</i>	<i>Koncentrace proteinu (mg/ml)</i>	<i>Pohlaví</i>
CYP2C9	nízká	nespecifikovaná	0,162	20	žena
	střední	CYP2C9*1/*2	0,470	20	žena
	vysoká	CYP2C9*1/*1	0,360	20	žena
CYP2C19	žádná	CYP2C19*2/*2	0,160	20	muž
	střední	CYP2C19*1/*2	0,478	20	muž
	vysoká	CYP2C19*1/*1	0,260	20	muž

4.1.3 Přístrojové vybavení

4.1.3.1 Systém HPLC

Specifické aktivity P450 byly stanoveny pomocí systému HPLC od firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko). Tento přístroj je vybaven odplyňovačem DGU-20A5R, automatickým dávkovačem SIL-20ACXR, modulem pro komunikaci CBM-20A, detektorem diodového pole UV/VIS SPD-M20A, fluorescenčním detektorem RF-20, termostatem kolony CTO-20AC a pumpou LC-20ACXR. K separaci látek byly využívány kolony LiChroCART 250-4 LiChrospher 100 RP-18 a Chromolith® HighResolution RP-18 zakoupené od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

4.1.3.2 Další přístroje a laboratorní pomůcky

Při experimentech byly použity následující laboratorní přístroje:

- analytické váhy AX 105 Delta-Range, Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko)
- analytické váhy GR-202, Schoeller Instruments (Praha, Česká republika)
- analytické váhy Sartorius 4503 MP 6E (Göttingen, Německo)
- centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie)
- centrifuga Eppendorf mini spin, Eppendorf (Hamburg, Německo)
- chlazená centrifuga Z 323 K, Biotech (Praha, Česká republika)

- magnetická míchačka Heidolph MR 1 000, Fischer Scientific (Pardubice, Česká republika)
- laboratorní pH metr Schott CG 843 se skleněnou elektrodou, Fischer Scientific (Pardubice, Česká republika)
- UV-VIS spektrofotometr/spektrofluorometr/luminometr TECAN Infinite M200, Schoeller Instruments (Praha, Česká republika)
- termoblok MD-MP01-D, Biotech (Praha, Česká republika)
- ultrazvuk K 10, Kraitex (Podhájska, Slovensko)
- vodní lázeň WB 14, Memmert (Schwabach, Německo)
- vortex Heidolph Reax Top, Fischer Scientific (Pardubice, Česká republika)
- patrony pro přípravu ultračisté vody Watrex Ultrapur, Watrex (Praha, Česká republika)

Při experimentech byly použity následující laboratorní pomůcky:

- automatické pipety o objemu: 0,1–2,5 μ l; 0,5–10 μ l; 2–20 μ l; 10–100 μ l; 20–200 μ l; 100–1000 μ l, 1- ml od firmy Eppendorf (Hamburg, Německo)
- multipipeta od firmy Eppendorf (Hamburg, Německo)
- automatická analytická stříkačka eVOL® dodáno firmou Chromservis s.r.o. (Praha, Česká republika)
- pipetovací špičky a mikrozkumavky od firmy Eppendorf (Hamburg, Německo)
- ELISA destičky (Merck&Millipore, ČR)
- skleněné vialky od firmy VWR (Fontenay-sous-Bois, Francie)

4.1.4 Software

Použitý software zahrnoval: MS Excel 2010 (Microsoft, Praha, Česká republika), Statistica 12 (StatSoft ČR, Praha, Česká republika), GraphPad Prism (La Jolla, Kalifornie, USA), Sigma Plot 12 (SPSS, Chicago, USA), CorelDRAW (Corel Corporation, Ottawa, Kanada), LabSolution (Shimadzu, Kyoto, Japonsko), MOE (version 2013.10; Chemical Computing Group Inc. Montreal, Kanada) a software pro použití přístroje TECAN Infinity (Tecan Austria, Grödig, Rakousko).

4.2 Metody

4.2.1 Stanovení aktivity lidských jaterních mikrosomálních P450

Predikce lékových interakcí na úrovni inhibice P450 je založená na stanovení enzymové aktivity jednotlivých P450 obsažených v mikrosomální frakci jater. Ačkoliv počet individuálních P450 a jejich různých alelických forem stoupá, stále platí stanovení těch nejdůležitějších enzymů, zapojených do metabolismu léčiv. Existují standardně zavedené metody, které využívají specifických reakcí biotransformace markerových substrátů typických pro jednotlivé P450. V této disertační práci byl sledován vliv zkoumaných látek na aktivitu devíti nejdůležitějších P450: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A (Tabulka 6).

P450 selektivní substráty jsou obvykle léčiva již uvedená na trh nebo dobře charakterizované biomolekuly, například steroidy. Pro oficiální skrínig inhibičního potenciálu látek je preferováno použití lidských jaterních mikrosomů a existujících léčiv, protože tato situace se nejvíce blíží lékovým interakcím *in vivo*.

Experimenty se skládají ze samotné inkubace a následného stanovení koncentrace vznikajících metabolitů. Stanovení aktivity jednotlivých P450 probíhá v inkubační směsi obsahující vzestupnou koncentraci specifického substrátu pro daný P450, lidské jaterní mikrosomy a NADPH generující systém při 37°C. Po inkubaci dochází k zastavení reakce a případné úpravě vzorků pro samotnou analýzu – deproteinace vzorku, případně i jeho extrakce do organického rozpouštědla. Koncentrace vzniklého metabolitu ze specifického substrátu je pak stanovena pomocí HPLC s UV/VIS nebo s fluorescenční detekcí.

Získaná data slouží k charakterizaci kinetiky enzymové reakce jednotlivých P450 pomocí Michaelisovy konstanty K_m a maximální rychlosti reakce v_{max} . Pro inhibiční experimenty se pak používá koncentrace substrátu, odpovídající K_m , což zajišťuje ideální podmínky reakce při poloviční hodnotě maximální rychlosti.

Tabulka 6 Přehled aktivit stanovených forem cytochromů P450. Specifické reakce s tučně vyznačenými substráty, experimentálně stanovené hodnoty K_m , množství MS na jednu reakci a celkový reakční objem inkubace.

<i>P450</i>	<i>Specifická reakce</i>	<i>Koncentrace substrátu (K_m)</i>	<i>MS</i>	<i>Reakční objem</i>	<i>Reference</i>
CYP1A2	O-deetylace 7-etoxyresorufinu	1,4 μM	35 pmol	100 μl	[147]
CYP2A6	7-hydroxylace kumarinu	14,3 μM	35 pmol	100 μl	[148]
CYP2B6	7-deetylace 7-etoxy-4-(trifluorometyl)-kumarinu	15,3 μM	35 pmol	100 μl	[149]
CYP2C8	6-hydroxylace paclitaxelu	45,1 μM	70 pmol	200 μl	[150]
CYP2C9	4'-hydroxylace diklofenaku	20,7 μM	35 pmol	200 μl	[151]
CYP2C19	4'-hydroxylace S-mefenytinu	28,2 μM	50 pmol	200 μl	[152]
CYP2D6	1'-hydroxylace bufuralolu	56,4 μM	70 pmol	200 μl	[153]
CYP2E1	6-hydroxylace chlorzoxazonu	56,4 μM	160 pmol	1000 μl	[154]
CYP3A	6 β -hydroxylace testosteronu	97,2 μM	100 pmol	500 μl	[155]
	1'-hydroxylace midazolamu	2,2 μM	12,5 pmol	100 μl	[156]

4.2.2 Inhibiční potenciál enantiomerů daných chirálních látek na enzymovou aktivitu P450 *in vitro*

Tato disertační práce byla zaměřena na hodnocení rozdílu inhibičního potenciálu jednotlivých enantiomerů chirálních léčiv na enzymovou aktivitu devíti cytochromů P450. Testované látky byly použity v koncentračním rozsahu od 0 do 100 μM , kdy data pro vzorky s koncentrací 0 μM odpovídají 100% aktivitě stanoveného enzymu. Maximální koncentrace byla volena tak, aby v případě inhibice bylo možné stanovit inhibiční účinek látky a charakterizovat ji stanovením IC_{50} . Tato hodnota udává

koncentraci testované látky, která způsobí poloviční maximální inhibici za daných experimentálních podmínek. Hodnota IC_{50} byla vždy získána z příslušného grafu. Ten byl vytvořen vynesemím dat s aktivitou v % na svislé ose (osa y) a log koncentrace inhibitoru na vodorovné ose (osa x). IC_{50} pak odpovídá koncentraci, při níž prochází proložená křivka 50% inhibiční úrovní. Všechny testované látky byly ve vyšších koncentracích ve vodě nerozpustné. Zásobní roztoky byly proto připraveny o koncentracích 50mM nebo 100 mM ve 100% dimetylsulfoxidu nebo metanolu. Paralelně se základními experimenty byly měřeny také vzorky, kde místo testované látky bylo použito příslušné rozpouštědlo odpovídající koncentraci testované látky. Tato kontrola sloužila k odhalení případné inhibice rozpouštědlem. Organická rozpouštědla mohou také ovlivňovat enzymovou aktivitu, proto by jejich koncentrace v reakční směsi neměla překročit 1 % (v/v) [157]. Další kontrolní vzorek obsahoval všechny složky reakční směsi již se stanovovaným specifickým metabolitem a MS byly dodány do reakce až po jejím zastavení. Cílem bylo odhalit případné interference testované látky a metabolitu, zejména pokud by se shodovaly retenční časy těchto analytů.

Inhibice jednotlivých P450 aktivit byla vyhodnocena pomocí grafického vyjádření. Enzymová aktivita byla vyjádřena v % a vztažena k aktivitě vzorku bez testované látky (100 %). Následně byla aktivita zanesena do grafu proti koncentrační řadě potencionálního inhibitoru/testované látky. Všechna měření byla připravená v duplikátech a jednotlivé odchylky dvojic nesměly přesáhnout 10 %. Pro zhodnocení inhibičního potenciálu byly vypočítány hodnoty IC_{50} pomocí programů Sigmaplot a GraphPad Prism. Pokud testované enantiomery dosáhly hodnoty $IC_{50} < 50 \mu M$, bylo měření zopakováno tak, abychom získali minimálně 6 různých hodnot, pro statistické vyjádření rozdílu v inhibičním potenciálu mezi jednotlivými enantiomery jednoho chirálního léčiva. Stereospecifické rozdíly byly statisticky zpracovány statistickým softwarem Statistica 12. Nejdříve byl použit Shapirův-Wilkův test pro ověření normality zkoumaného statistického výběru. Pro určení statistické významnosti inhibice mezi jednotlivými enantiomery jedné látky byl použit t-test u parametrických dat a Mann-Whitneyův test u neparametrických dat. Statisticky významný rozdíl v inhibičním potenciálu enantiomerů byl potvrzen, pokud bylo výsledné $p < 0,05$.

Experimentální podmínky stanovení jednotlivých enzymových aktivit jsou uvedeny v následujícím přehledu.

CYP1A2

Objem reakční směsi: 100 μ l

Specifický substrát: 1,4 μ M 7-etoxyresorufin

Mikrosomy: 35 pmol cytochromu P450

Inhibitor: 0, 5, 10, 25, 50 a 100 μ M testovaného enantiomeru

Pufir: 100 mM, KH_2PO_4 , pH 7,4

Preinkubace 5 min při 37 °C

NADPH-generující systém: 0,8 mM NADP^+ ; 5,8 mM isocitrát;
8 mM Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

Inkubace 15 min při 37 °C

Zastavení reakce: 200 μ l metanolu

Centrifugace 10 min při 14000 RPM při 4 °C

Ke stanovení bylo odebráno 200 μ l supernatantu

HPLC analýza s fluorescenční detekcí (excitace: 535 nm; emise: 585 nm)

Retenční čas: 6,128 min

CYP2A6

Objem reakční směsi: 100 μ l

Specifický substrát: 14,3 μ M kumarin

Mikrosomy: 35 pmol cytochromu P450

Inhibitor: 0, 5, 10, 25, 50 a 100 μ M testovaného enantiomeru

Pufir: 100 mM, KH_2PO_4 , pH 7,4

Preinkubace 5 min při 37 °C

NADPH-generující systém: 0,8 mM NADP^+ ; 5,8 mM isocitrát;
8 mM Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

Inkubace 15 min při 37 °C

Zastavení reakce: 200 μ l metanolu

Centrifugace 10 min při 14000 RPM při 4 °C

Ke stanovení bylo odebráno 200 μ l supernatantu

HPLC analýza s fluorescenční detekcí (excitace: 360 nm; emise: 465 nm)

Retenční čas: 3,708 min

CYP2B6

Objem reakční směsi: 100 μ l

Specifický substrát: 15,3 μ M 7-etoxy-4-(trifluormetyl)kumarin

Mikrosomy: 35 pmol cytochromu P450

Inhibitor: 0, 5, 10, 25, 50 a 100 μ M testovaného enantiomeru

Pufr: 100 mM, KH_2PO_4 , pH 7,4

Preinkubace 5 min při 37 °C

NADPH-generující systém: 0,8 mM NADP^+ ; 5,8 mM isocitrát;

8 mM Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

Inkubace 15 min při 37 °C

Zastavení reakce: 200 μ l metanolu

Centrifugace 10 min při 14000 RPM při 4 °C

Ke stanovení bylo odebráno 200 μ l supernatantu

HPLC analýza s fluorescenční detekcí (excitace: 410 nm; emise: 510 nm)

Retenční čas: 4,3 min

CYPC8

Objem reakční směsi: 100 μ l

Specifický substrát: 45,1 μ M paklitaxel

Mikrosomy: 70 pmol cytochromu P450

Inhibitor: 0, 5, 10, 25, 50 a 100 μ M testovaného enantiomeru

Pufr: 100 mM, KH_2PO_4 , pH 7,4

Preinkubace 5 min při 37 °C

NADPH-generující systém: 0,8 mM NADP^+ ; 5,8 mM isocitrát;

8 mM Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

Inkubace 15 min při 37 °C

Zastavení reakce: 50 μ l acetonitril

Centrifugace 10 min při 12000 RPM při 4 °C

Ke stanovení bylo odebráno 200 μ l supernatantu

HPLC analýza s UV detekcí při vlnové délce 230 nm

Retenční čas: 9,9 min

CYP2C9

Objem reakční směsi: 200 µl

Specifický substrát: 28,2 µM diklofenak**Mikrosomy:** 35 pmol cytochromu P450**Inhibitor:** 0, 5, 10, 25, 50 a 100 µM testovaného enantiomeru**Pufr:** 100 mM, KH₂PO₄, pH 7,4

Preinkubace 5 min při 37 °C

NADPH-generující systém: 0,8 mM NADP⁺; 5,8 mM isocitrát;8 mM Mg²⁺; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

Inkubace 30 min při 37 °C

Zastavení reakce: 50 µl směsi acetonitril/kyselina octová (94:6 (v/v))

Centrifugace 10 min při 14000 RPM při 4 °C

Ke stanovení bylo odebráno 150 µl supernatantu

HPLC analýza s UV detekcí při vlnové délce 280 nm

Retenční čas: 9,070 min

CYP2C19

Objem reakční směsi: 200 µl

Specifický substrát: 28,2 µM (S)-mefenytin**Mikrosomy:** 50 pmol cytochromu P450**Inhibitor:** 0, 5, 10, 25, 50 a 100 µM testovaného enantiomeru**Pufr:** 100 mM, KH₂PO₄, pH 7,4

Preinkubace 5 min při 37 °C

NADPH-generující systém: 0,8 mM NADP⁺; 5,8 mM isocitrát;8 mM Mg²⁺; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

Inkubace 30 min při 37 °C

Zastavení reakce: 20 µl 1 M kyselina chlorovodíková

Vířivá extrakce do 2 ml dichlormetanu po dobu 15 s

Centrifugace 10 min při 3000 RFM při 4 °C

1,5 ml spodní fáze extraktu odpařeno pod proudem dusíku při 40 °C

Odparek rozpuštěn ve 150 µl mobilní fáze (100 mM KH₂PO₄, pH 2 / acetonitril; 71:29 (v/v)) a použit ke stanovení

HPLC analýza s UV detekcí při vlnové délce 200 nm

Retenční čas: 3,7 min

CYP2D6Objem reakční směsi: 200 μ l**Specifický substrát:** 56,4 μ M bufuralol**Mikrosomy:** 70 pmol cytochromu P450**Inhibitor:** 0, 5, 10, 25, 50 a 100 μ M testovaného enantiomeru**Pufr:** 100 mM, KH_2PO_4 , pH 7,4Preinkubace 5 min při 37 $^\circ\text{C}$ **NADPH-generující systém:** 0,8 mM NADP^+ ; 5,8 mM isocitrát;8 mM Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/mlInkubace 20 min při 37 $^\circ\text{C}$ **Zastavení reakce:** 20 μ l 70 % kyseliny chloristéCentrifugace 10 min při 14000 RPM při 24 $^\circ\text{C}$ Ke stanovení bylo odebráno 150 μ l supernatantu

HPLC analýza s fluorescenční detekcí (excitace: 252 nm; emise: 302 nm)

Retenční objem: 3,6 min

CYP2E1Objem reakční směsi: 1000 μ l**Specifický substrát:** 56,4 μ M chlorzoxazon**Mikrosomy:** 160 pmol cytochromu P450**Inhibitor:** 0, 5, 10, 25, 50 a 100 μ M testovaného enantiomeru**Pufr:** 100 mM, KH_2PO_4 , pH 7,4Preinkubace 5 min při 37 $^\circ\text{C}$ **NADPH-generující systém:** 0,8 mM NADP^+ ; 5,8 mM isocitrát;8 mM Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/mlInkubace 30 min při 37 $^\circ\text{C}$ **Zastavení reakce:** 50 μ l 42,5 % kyselina fosforečná

Vířivá extrakce do 2 ml směsi 2-propanol/chloroform (15:85 (v/v)) po dobu 20 s

Centrifugace 10 min při 2000 RPM při 4 $^\circ\text{C}$ 1 ml spodní fáze extraktu odpařeno pod proudem dusíku při 40 $^\circ\text{C}$ Odparek rozpuštěn ve 200 μ l mobilní fáze (0,5 % kyselina octová / acetonitril; 3:1 (v/v)) a použit ke stanovení

HPLC analýza s UV detekcí při vlnové délce 287 nm

Retenční čas: 5,613 min

CYP3A (TESTOSTERON)

Objem reakční směsi: 500 µl

NADPH-generující systém: 0,8 mM NADP⁺; 5,8 mM isocitrát;8 mM Mg²⁺; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml**Mikrosomy:** 100 pmol cytochromu P450**Inhibitor:** 0, 5, 10, 25, 50 a 100 µM testovaného enantiomeru**Pufr:** 100 mM, KH₂PO₄, pH 7,4

Preinkubace 5 min při 37 °C

Specifický substrát: 97,2 µM testosteron

Inkubace 20 min při 37 °C

Zastavení reakce: 100 µl směsí 1 M uhličitanu sodného / 2 M chloridu sodného

Vířivá extrakce do 2 ml dichlormetanu po dobu 15 s

Centrifugace 10 min při 3000 RPM při 4 °C

1 ml spodní fáze extraktu odpařeno pod proudem dusíku při 40 °C

Odparek rozpuštěn ve 200 µl mobilní fáze (64 % metanol) a použit ke stanovení

HPLC analýza s UV detekcí při vlnové délce 245 nm

Retenční čas: 4,687 min

CYP3A4 (MIDAZOLAM)

Objem reakční směsi: 200 µl

Specifický substrát: 2,2 µM midazolam**Mikrosomy:** 12,56 pmol cytochromu P450**Inhibitor:** 0, 5, 10, 25, 50 a 100 µM testovaného enantiomeru**Pufr:** 100 mM, KH₂PO₄, pH 7,4

Preinkubace 3 min při 37 °C

NADPH-generující systém: 0,8 mM NADP⁺; 5,8 mM isocitrát;8 mM Mg²⁺; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

Inkubace 8 min při 37 °C

Zastavení reakce: 100 µl vychlazeného 100 % metanolu

Vortex po dobu 10 s

Centrifugace 10 min při 14000 RPM při 4 °C

Ke stanovení bylo odebráno 150 µl supernatantu

HPLC analýza s UV detekcí při vlnové délce 240 nm

Retenční čas: 10,15 min

4.2.3 Charakterizace inhibice: mechanismus inhibice a stanovení K_i

4.2.3.1 Reversibilní inhibice

Pokud inhibice testovanými enantiomery dosáhla hodnoty $IC_{50} < 10 \mu M$, následovaly experimenty s cílem charakterizovat mechanismus inhibice a určit inhibiční konstanty, které lépe pomáhají predikovat potenciál vzniku lékové interakce *in vivo* a určují tedy sílu inhibice.

Pro stanovení inhibičního potenciálu se používá koncentrace substrátu odpovídající hodnotě K_m . Pro určení mechanismu inhibice je nutné toto měření zopakovat při více koncentracích specifického substrátu, nejlépe při $0,5 K_m$, $1 K_m$, $2 K_m$ a $4 K_m$. Data byly následně zpracovány a vyneseny pomocí třech typů grafů: Dixonova, Lineweaverova-Burkova a Scatchardova výnosu. Pro sestrojení těchto grafů byl použit grafický software GraphPad Prism. Na základě vizuálního prozkoumání grafů a na základě parametrů odvozených od modelu s přihlédnutím k celkové variabilitě (R^2 , součet čtverců odchylek) byl určen typ inhibice (kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní nebo smíšený). Stejná data byla poté použita pro výpočet hodnoty K_i nelineární regresi pomocí rovnice odpovídající typu inhibice opět pomocí softwaru GraphPad Prism (Tabulka 7) [158].

Tabulka 7 Přehled rovnic pro výpočet hodnoty K_i podle typu inhibice [158].

Kompetitivní inhibice	$K_m = K_m * (1 + [I]/K_i)$ $Y = V_{max} * X / (K_m + X)$
Nekompetitivní inhibice	$V_{max} = V_{max} / (1 + I/K_i)$ $Y = V_{max} * X / (K_m + X)$
Akompetitivní inhibice	$V_{max} = V_{max} / (1 + I/AlfaK_i)$ $K_m = K_m / (1 + I/AlfaK_i)$ $Y = V_{max} * X / (K_m + X)$
Smíšený typ inhibice	$V_{max} = V_{max} / (1 + I/(\alpha * K_i))$ $K_m = K_m * (1 + I/K_i) / (1 + I/(\alpha * K_i))$ $Y = V_{max} * X / (K_m + X)$

X...koncentrace substrátu; Y... enzymové aktivity; $AlfaK_i$ je produkt hodnoty K_i a α , protože hodnota K_i je velmi vysoká (akompetitivní inhibitor se neváže na enzym) a α je velmi nízká.

α ...určuje stupeň, kdy vazba inhibitoru mění afinitu enzymu k substrátu, vždy je větší než 0.

$\alpha = 1$...nekompetitivní inhibice

$\alpha > 1$ kompetitivní inhibice

$\alpha < 1$ akompetitivní inhibice

4.2.3.2 Ireversibilní časově závislá inhibice (time-dependentní)

V rámci základního testování potencionálních inhibitorů by měla být také provedena kontrola, zda se nejedná o časově závislou inhibici, tedy, zda se stoupajícím časem preinkubace nevzrůstá inhibiční potenciál látky, např. tvorbou produktu vázícího se na enzym [85]. K tomu účelu slouží experimenty označované jako „Single Point Assay“, „IC₅₀ shift protokol“ a určení konstant K_I a K_{inact} [159].

4.2.3.2.1 Single point protokol

Při tomto experimentu se používá jedna koncentrace potencionálního inhibitoru. Testovaná látka je v jednom případě preinkubována v přítomnosti NADPH a s mikrosomy o 10krát vyšší koncentraci než při běžném testování aktivity. Ve druhém případě je do vzorku obsahujícího mikrosomy a testovanou látku přidán NADPH až po preinkubaci. Následně je alikvotní podíl vzorku zředěn 10krát a je přidán specifický substrát. Tento krok má za úkol eliminovat případnou reversibilní inhibici. Pokud dochází k časově závislé inhibici, pak se projeví pokles aktivity pouze v přítomnosti NADPH při preinkubaci. Paralelně je také sledována možná inhibice samotným rozpouštědlem.

4.2.3.2.2 IC₅₀ shift protokol

Pokud se při Single Point měření projeví časově závislá ireversibilní inhibice, následuje zpravidla tento experiment. Slouží k určení IC₅₀ testované látky při třech odlišných experimentálních podmínkách: 0-min preinkubace, 30-min preinkubace bez NADPH a 30-min preinkubace v přítomnosti NADPH. Pokud je látka takovým inhibitorem, hodnota IC₅₀ bude v tomto pořadí klesat, inhibice bude silnější. Pokud poměr těchto hodnot bude větší než 1,5 - látka je považována za „time-dependentní“ inhibitor. Tento experiment může detekovat reversibilní i ireversibilní inhibici [159, 160].

4.2.3.2.3 Stanovení K_I a K_{inact}

Pokud je u testované látky pozorovaný posun hodnoty IC₅₀ (tzv. IC₅₀ shift), měly by být určeny další kinetické konstanty. Hodnota K_{inact} je maximální rychlost inaktivace enzymu při nasycené koncentraci inhibitoru. K_I udává koncentraci inhibitoru, při které rychlost inaktivace enzymu dosahuje právě poloviční maximální rychlosti.

Testovaná látka v koncentračním rozmezí 0-100 μ M je preinkubována v časovém rozmezí zvoleném tak, aby se projeví všechny stupně inaktivace (od žádné inaktivace až po maximální). Preinkubační směs obsahuje společně s testovanou látkou mikrosomy a NADPH. Následně jsou vzorky ředěny přidávkem NADPH a specifickým substrátem, jehož koncentrace odpovídá pěti-násobku K_m . Takto získaná data jsou analyzována. Pro vyhodnocení výsledku je sestaven graf, kde je vyneseno logaritmus % zbývající aktivity oproti preinkubačním časům. Po regresní analýze jsou získány hodnoty směrnice (negativní sklon) jednotlivých křivek. Hodnoty směrnice jsou vyneseny do dalšího grafu oproti koncentracím inhibitoru a nelineární regrese umožní vypočítat K_I a K_{inact} [159].

4.2.4 *In silico* metody: Molekulové modelování

Molekulově modelovací studie byly provedeny za pomoci softwaru MOE (verze 2013.10 a 2015.10). Krystalová struktura CYP3A4 byla sestavena za použití PDB struktury číslo 2V0M a 4K9W jako výchozí geometrie. S ohledem na velkou flexibilitu a substrátovou variabilitu (promiskuitu) enzymu byly vybrány dvě odlišné struktury enzymu představující částečně uzavřenou a široce otevřenou kavitu aktivního místa. Ligandy (substráty a inhibitory) a molekuly vody s výjimkou těch vázaných uvnitř struktury proteinu byly odstraněny. Proteinu byly přiděleny atomy vodíku pomocí funkce Protonate 3D. Parciální náboje byly přiděleny jednotlivým aminokyselinovým postranním řetězcům za použití silového pole AMBER 94. Byla provedena energetická minimalizace (Parametry: Gradient: 0,001 RMS kcal / mol / Å²) s cílem uvolnit napětí uvnitř proteinu a opravit nereálné vazebné úhly a vzdálenosti. Pro identifikaci a zmapování aktivního místa byl použit MOE Site Finder. Struktury ligandů byly opět připraveny pomocí funkce MOE Builder. Látky byly protonovány a vnitřní energie proteinu minimalizována. Sloučeniny byly následně dokovány za použití algoritmu pro prvotní umístění Alpha PMI (Parametry: Počet vzorků na konformaci „Samples per conformation“: 30; počet pozic: 250). Energetický rescoring byl proveden pomocí funkce skórovací funkce Affinity dG. Přesné doladění polohy ligandu („pose refinement“) bylo provedeno za použití Amber 94 (Gradient: 0.001 kcal/mol; No. of iterations: 500, Cutoff distance 6Å), přičemž druhý rescoring byl proveden za použití skórovací funkce GBVI WSA dG. Hodnota RMSD pro nejlépe skórované pózy původního ligandu geometrie 2V0M ketokonazolu

byla

1,05

Å.

5. VÝSLEDKY

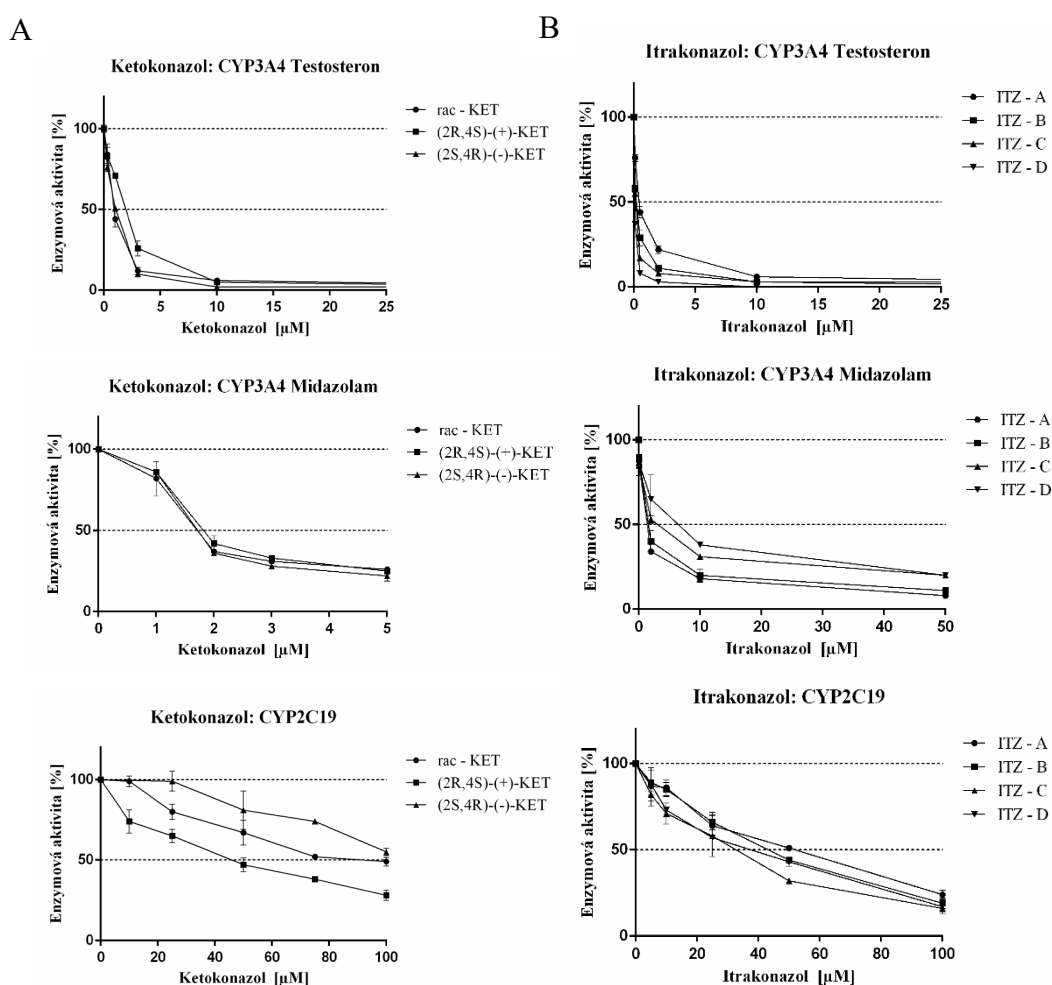
5.1 Inhibiční potenciál optických isomerů azolových antimykotik na enzymovou aktivitu P450 v lidských jaterních mikrosomech

Byl testován inhibiční efekt dvou *cis*-enantiomerů ketokonazolu a čtyř *cis*-diastereoisomerů itraconazolu na aktivitu devíti nejdůležitějších enzymů I. fáze metabolismu léčiv. Ke stanovení byly použity lidské směsné mikrosomy, které obsahovaly CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A. Testované látky byly v koncentračním rozmezí tak, aby došlo k co nejvyšší inhibici, ale maximální použitá koncentrace nepřesáhla 100 μM . Pomocí reakcí se specifickými substráty byly sestaveny inhibiční křivky a stanoveny hodnoty IC_{50} .

5.1.1 *Cis*-enantiomery ketokonazolu

Ketokonazol je obecně znám jako silný inhibitor aktivity CYP3A. Tato disertační práce však zkoumala inhibiční potenciál jeho jednotlivých enantiomerů, které tvoří komerčně dostupnou racemickou směs. Dle výsledků je zřejmé, že oba enantiomery jsou silnými inhibitory enzymové aktivity CYP3A s mírným rozdílem inhibičního potenciálu (Obrázek 10). Inhibice se projevila při použití obou specifických reakcí, 6 β -hydroxylaci testosteronu i 1'-hydroxylaci midazolamu. Stanovené hodnoty IC_{50} byly velmi nízké (Tabulka 8, Obrázek 11). Na tento základní experiment tedy navázaly další měření s úmyslem stanovit mechanismus inhibice, určit hodnoty K_i a potvrdit rozdíly v inhibičním potenciálu mezi jednotlivými enantiomery. Byly sestaveny Dixonovy, Lineweaverovy-Burkovy a Scatchardovy grafy pomocí nichž byl určen typ inhibice. Mechanismus inhibice byl u všech testovaných látek KET určen jako smíšený. Následně byly vypočítány hodnoty K_i , které byly podrobeny statistické analýze (Tabulka 9). (2S,4R)-(-)-KET vykazoval statisticky signifikantně silnější

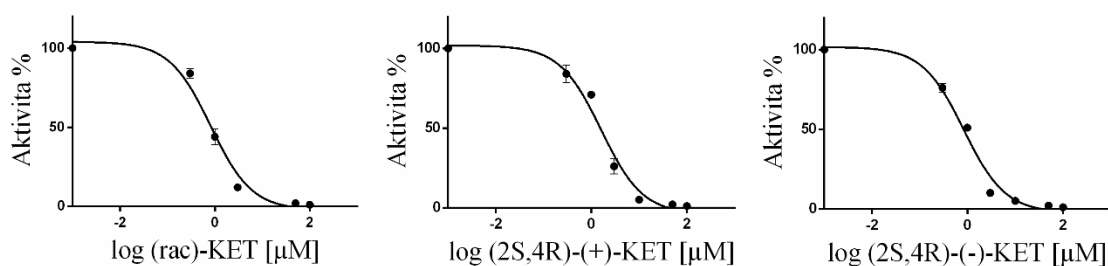
inhibici než (2R,4S)-(+)-KET ($p < 0,0005$ pro testosteron a $p < 0,05$ pro midazolam). Inhibiční potenciál KET enantiomerů na aktivitu CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 a CYP2E1 nebyl pozorován. Naopak aktivita CYP2C19 byla snížena působením racemátu i enantiomerů (Obrázek 10). Inhibiční vliv není tak významný jako u CYP3A, ale přesto (2R,4S)-(+)-KET vykazovat téměř 3krát vyšší inhibiční potenciál než (2S,4R)-(-)-KET ($p < 0,05$, Tabulka 8).



Obrázek 10 Efekt *cis*-enantiomerů ketokonazolu (A) a *cis*-diastereoisomerů itraconazolu (B) na enzymové aktivity CYP3A (specifický substrát testosteron a midazolam) a CYP2C19 (specifický substrát S-mefenytin).

Tabulka 8 Přehled získaných hodnot IC_{50} vyjadřující potenciál testovaných látek inhibovat aktivitu P450

IC_{50} [μM]	<i>1A2</i>	<i>2A6</i>	<i>2B6</i>	<i>2C8</i>	<i>2C9</i>
<i>(rac)-KET</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>(2R,4S)-(+)-KET</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>(2S,4R)-(-)-KET</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>ITRA A</i>	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
<i>ITR B</i>	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
<i>ITR C</i>	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
<i>ITR D</i>	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
IC_{50} [μM]	<i>2C19</i>	<i>2D6</i>	<i>2E1</i>	<i>3A4</i>	
				<i>Testosteron</i>	<i>Midazolam</i>
<i>(rac)-KET</i>	36,81± 4,78*	>100	>100	0,84± 0,05	1,06± 0,18
<i>(2R,4S)-(+)-KET</i>	23,64± 6,25*	>100	>100	1,69± 0,27	1,46± 0,28
<i>(2S,4R)-(-)-KET</i>	66,12± 12,6*	>100	>100	0,90± 0,16	1,04± 0,11
<i>ITRA A</i>	53,18±3,436	> 50	> 50	0,38± 0,023	0,74± 0,062*
<i>ITR B</i>	45,79±3,55	> 50	> 50	0,15± 0,042	0,99± 0,066*
<i>ITR C</i>	29,83± 3,95	> 50	> 50	0,11± 0,025	1,53± 0,10*
<i>ITR D</i>	35,33±3,30	> 50	> 50	0,058± 0,0023*	3,45± 0,54*



Obrázek 11 IC_{50} křivky ketokonazolu a jeho enantiomerů pro inhibici 6β -hydroxylaci testosteronu.

5.1.2 *Cis*-diastereoisomery itrakonazolu

Itrakonazol je další azolové antimykotikum považované za silný inhibitor aktivity CYP3A. Inkubace jeho jednotlivých *cis*-diastereoisomerů s testosteronem i midazolamem ukázala silnou inhibici CYP3A u všech testovaných ITZ s nízkými IC_{50} (Tabulka 8). Byly provedeny navazující experimenty tak, aby bylo možné určit mechanismus inhibice i inhibiční konstanty. Dle sestrojených grafů (Dixonův, Lineweaverův-Burkův a Scatchardův) ITZ-A a ITZ-D inhibovaly enzymovou aktivitu (6 β -hydroxylace testosteronu) kompetitivním mechanismem, zatímco ITZ-B a ITZ-C vykazovaly smíšený typ inhibice (Obrázek 12). U experimentů s hydroxylací midazolamu vykazovaly všechny čtyři diastereoisomery smíšený typ inhibice. Inhibiční potenciál stoupal v řadě ITZ-B < ITZ-C < ITZ-A < ITZ-D u enzymové aktivity měřené s testosteronem, kde ITZ-D byl nejsilnějším inhibitorem ($p < 0,05$). U midazolamu se projevilo následující pořadí; ITZ-D < ITZ-C < ITZ-B < ITZ-A, se statistickým rozdílem ($p < 0,005$) inhibičního potenciálu mezi všemi čtyřmi diastereoisomery, v tomto případě byl ITZ- A nejsilnějším inhibitorem (Tabulka 9). Také aktivita CYP2C19 (4-hydroxylace S-mefenytouinu) byla slabě inhibována všemi čtyřmi ITZ. Stereospecifita v inhibici byla ovšem malá, významné rozdíly inhibičního potenciálu jednotlivých diastereoisomerů nebyly pozorovány (Obrázek 10). Vliv ITZ diastereoisomerů na další měřené aktivity (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 a CYP2E1) nebyl významný, všechny hodnoty IC_{50} přesáhly hodnoty 50 μ M. Ačkoliv inhibice těchto aktivit by se v klinické praxi neprojevila (při 100 μ M koncentraci klesla aktivita pouze na 60 %), u CYP2B6, CYP2C9 a CYP2D6 byl naznačen rozdíl mezi jednotlivými testovanými ITZ.

5.2 Inhibiční potenciál enantiomerů chirálních léčiv dostupných na trhu v podobě čistých enantiomerů na enzymové aktivity P450 v lidských jaterních mikrosomech

Byly testovány enantiomery pěti chirálních, strukturně i terapeuticky odlišných látek. Byl stanovován jejich inhibiční potenciál na aktivitu devíti P450 v lidských jaterních mikrosomech. Z naměřených dat byly vypočítány parametry enzymové kinetiky.

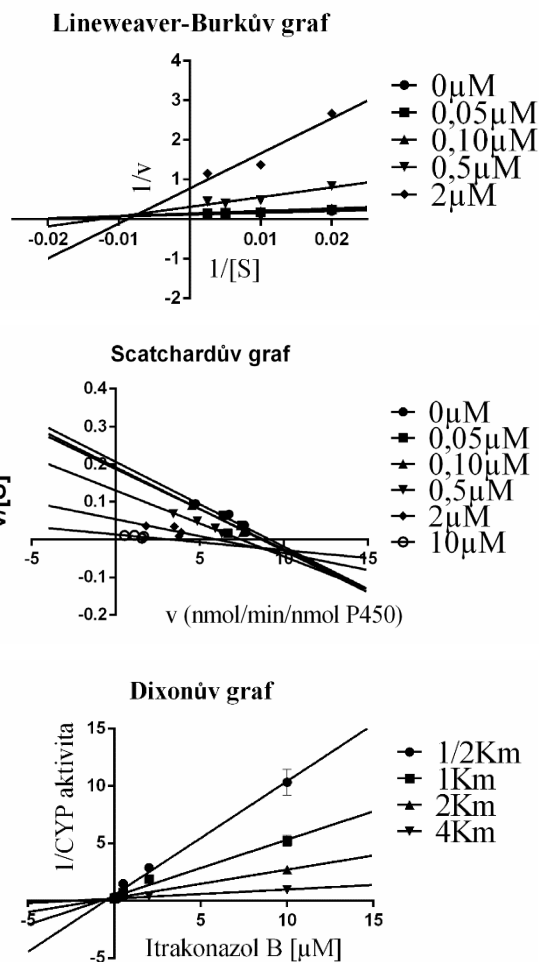
Tabulka 9 Výsledky experimentů s inhibicí aktivity CYP3A azolovými antimykotiky, s mechanismy inhibice a inhibičními konstantami K_i . Statisticky signifikantní rozdíl mezi jednotlivými enantiomery je označen hvězdičkou.

Testovaná látka	CYP3A4 Testosteron		CYP3A Midazolam	
	K_i [μ M]	mechanismus	K_i [μ M]	mechanismus
<i>(rac)</i> -KET	0,27 ± 0,13*	smíšený	2,28 ± 1,70	smíšený
<i>(2R,4S)</i> -(+)-KET	0,92 ± 0,47*	smíšený	2,52 ± 1,80	smíšený
<i>(2S,4R)</i> -(-)-KET	0,17 ± 0,05*	smíšený	1,51 ± 0,99	smíšený
<i>ITR A</i>	0,085 ± 0,018	kompetitivní	0,44 ± 0,16*	smíšený
<i>ITR B</i>	0,91 ± 0,31	smíšený	0,48 ± 0,18*	smíšený
<i>ITR C</i>	0,20 ± 0,07	smíšený	1,56 ± 0,94*	smíšený
<i>ITR D</i>	0,022 ± 0,0082*	kompetitivní	3,48 ± 2,23*	smíšený

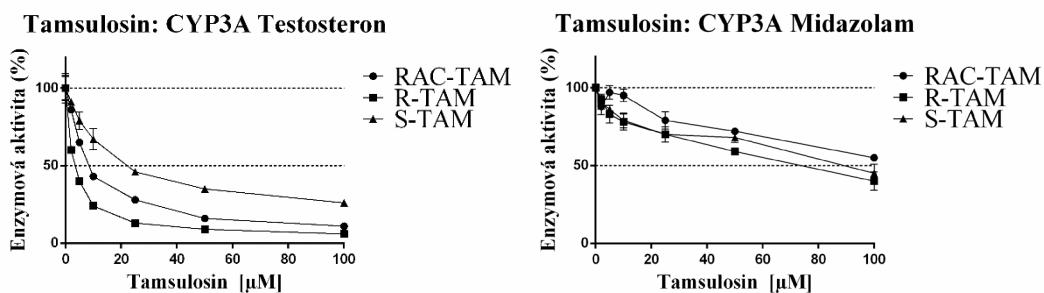
5.2.1 Tamsulosin a jeho R- a S-enantiomery

Tamsulosin a oba jeho R- i S- enantiomery silně inhibovaly enzymovou aktivitu CYP3A měřenou pomocí 6 β -hydroxylace testosteronu s IC_{50} 6,75 μ M pro racemát; 2,88 μ M pro R-TAM a 14,22 μ M pro S-TAM. Enantiospecifický efekt byl zřejmý, R-TAM se choval jako nejsilnější inhibitor. Jiný případ nastal v experimentu, kde byla aktivita CYP3A měřena pomocí 1'-hydroxylace midazolamu (Obrázek 13). Měřené látky způsobily jen mírný pokles enzymové aktivity a hodnoty IC_{50} přesáhly 100 μ M. TAM enantiomery byly testovány na časově závislou inhibici pomocí preinkubaci

s NADPH a mikrosomy a tento mechanismus byl vyloučen. Měření aktivity bylo zopakováno v přítomnosti více koncentrací substrátu testosteronu ($0,5K_M$, K_M , $2K_M$) a takto získaná data byla použita k sestrojení grafů (Dixonův, Lineweaver-Burkův a Scatchardův) k určení typu reversibilní inhibice a kalkulaci hodnot K_i a predikci lékových interakcí *in vivo*. Výsledné grafy dobře odpovídaly nekompetitivní inhibici. Efekt TAM na inhibici CYP3A byl značně enantiospecifický, R-TAM měl silnější inhibiční potenciál než S-TAM ($p < 0,05$) i než racemát ($p < 0,00005$, Tabulka 10). Inhibiční efekt TAM racemátu R- a S- enantiomeru na enzymové aktivity CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP2E1 byl nevýznamný (Tabulka 11). Při nejvyšší koncentraci testované látky ($100\mu\text{M}$) nepřesáhl pokles aktivity 25%, což by pravděpodobně nemělo mít žádný klinický význam.



Obrázek 12 Lineweaverův-Burkúv, Scatchardúv a graf sestrojený pro ITZ-B (testosteron, 3-min preinkubace) sloužící k určení mechanismu inhibice. Grafy odpovídají smíšenému typu inhibice.

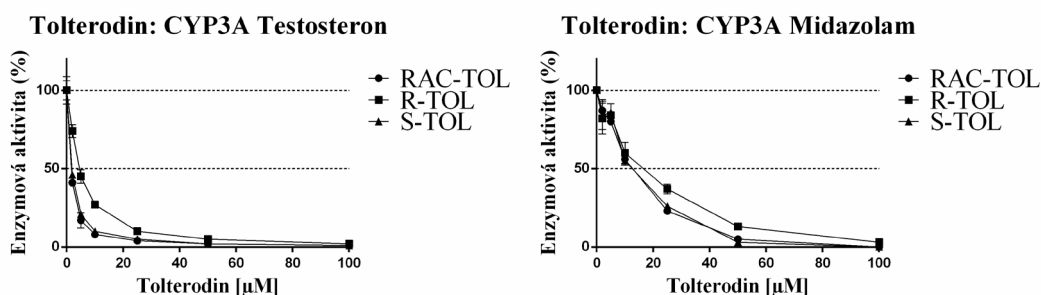


Obrázek 13 Efekt tamsulosinu a jeho enantiomerů na aktivitu CYP3A se specifickými substráty testosteronem a midazolamem v lidských jaterních mikrosomech. Inhibice hydroxylace testosteronu je výrazná, zatímco u hydroxylace midazolamu je jen mírná.

5.2.2 Tolterodin a jeho R- a S- enantiomery

Tolterodin i oba jeho enantiomery zřetelně inhibovaly aktivitu CYP3A při použití testosteronu i midazolamu (Obrázek 14). Time-dependentní inhibice byla experimentálně vyloučena. Z dalšího měření a po sestrojení příslušných grafů byl určen nekompetitivní typ inhibice u všech tří testovaných forem tolterodinu. Enantiospecifický efekt byl patrný. V reakci s použitím specifického substrátu testosteronu byl S-TOL s K_i 1,71 μM silnějším inhibítorem než R-TOL s K_i 4,78 μM ($p < 0,05$). Při použití midazolamu byl opět S-TOL s K_i 14,10 μM potentnějším inhibítorem než R-TOL s K_i 21,21 μM ($p < 0,05$, Tabulka 10).

Ani tolterodin jako racemát ani jeho jednotlivé enantiomery nesnížily významně enzymovou aktivitu CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2D6 a CYP2E1. Slabý pokles se objevil u CYP2C9 a CYP2C19, nicméně IC_{50} by byly vyšší než 100 μM (Tabulka 11).



Obr

ázek 14 Efekt tolterodinu a jeho enantiomerů na enzymovou aktivitu CYP3A se specifickými substráty testosteronem a midazolamem. S-TOL je nejsilnějším inhibítorem.

Tabulka 10 Charakterizace inhibice enzymové aktivity CYP3A enantiomery TAM a TOL.

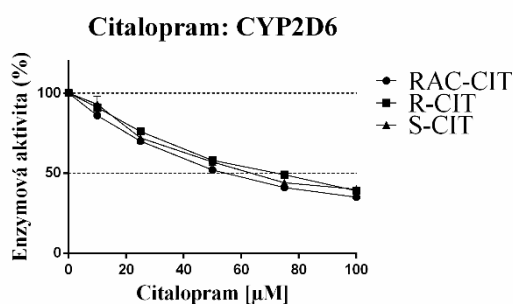
	<i>CYP</i>	$K_i(\mu\text{M})$	<i>Mechanismus</i>	<i>Časově-závislá</i>
<i>TAM</i>	3A4 - testosteron	$6,75 \pm 0,21^*$	nekompetitivní	ne
<i>R-</i>		$2,88 \pm 0,12^*$	nekompetitivní	ne
<i>S-</i>		$14,22 \pm 0,53^*$	nekompetitivní	ne
<i>TOL</i>	3A4 - testosteron	$1,48 \pm 0,30^*$	nekompetitivní	ne
<i>R-</i>		$4,78 \pm 0,17^*$	nekompetitivní	ne
<i>S-</i>		$1,71 \pm 0,03^*$	nekompetitivní	ne
<i>TOL</i>	3A4 -	$13,22 \pm 1,09^*$	nekompetitivní	ne

<i>R</i> -	midazolam	21,21 ± 1,37*	nekompetitivní	ne
<i>S</i> -		14,10 ± 1,15*	nekompetitivní	ne

5.2.3 Citalopram a jeho *R*- a *S*- enantiomery

Racemický citalopram má schopnost slabě inhibovat CYP2D6 [127]. V našich výsledcích se potvrdila inhibice CYP2D6 při použití 1'-hydroxylace bufuralolu (Obrázek 15). Mezi jednotlivými formami CIT nebyly významné rozdíly v inhibičním potenciálu: IC₅₀ racemátu byla 55,35 μM, S-CIT 62,63 μM a pro R-CIT 68,17 μM. Inhibice byla tedy slabá, a proto se dál nepokračovalo s experimenty ke zjištění K_i ani mechanismu inhibice.

Enzymové aktivity dalších zkoumaných P450 nebyly ovlivněny těmito testovanými látkami, ani při nejvyšší koncentraci 100 μM neklesla aktivita pod 75% (Tabulka 11).

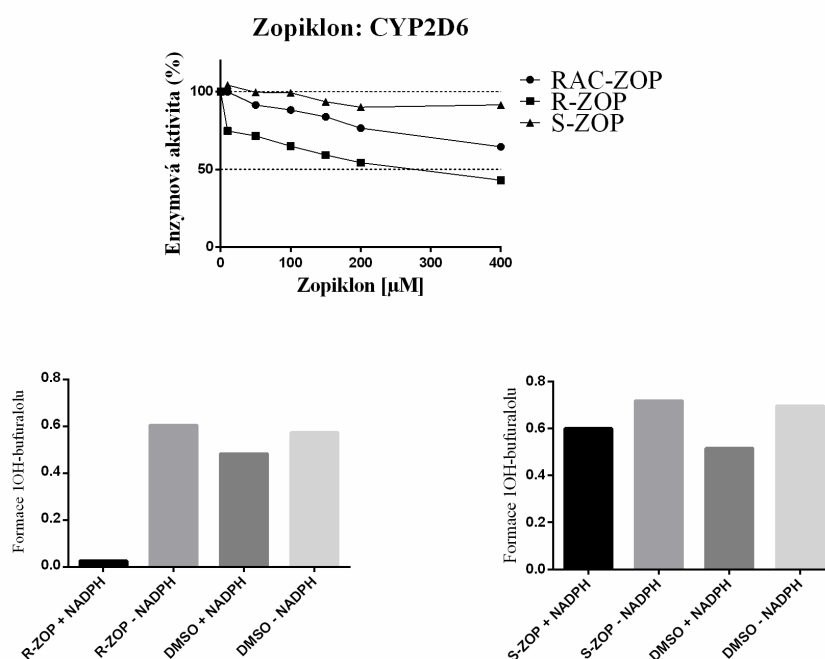


Obrázek 15 Inhibice aktivity CYP2D6 racemickým citalopramem a jednotlivými enantiomery bez významného enantiospecifického rozdílu mezi jednotlivými testovanými látkami.

5.2.4 Zopiklon a jeho *R*- a *S*- enantiomery

Inhibiční efekt enantiomerů zopiklonu byl zkoumán v koncentračním rozmezí 0 -400 μM. Enzymová aktivita všech testovaných P450 měřená v lidských jaterních mikrosomech nebyla inhibována vůbec nebo jen mírně (IC₅₀ >100 μM, Tabulka 11). Ve vyšších koncentracích testovaných látek se při poklesu aktivity u CYP3A, CYP2D6 a CYP2C8 projevil enantiospecifický efekt. Při 400 μM R-ZOP klesla aktivita u CYP2D6 k 43 % a S-ZOP aktivita se nezměnila. U CYP3A a CYP2C8 se aktivita více snížila (ke 40 %) při inkubaci s S-ZOP, u R-ZOP byl pokles malý.

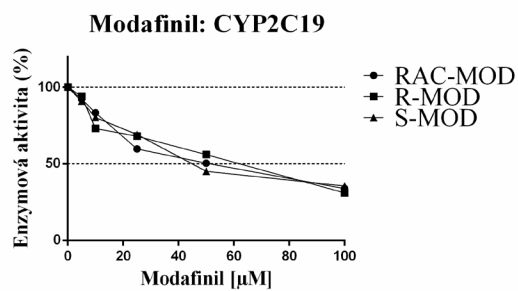
Enantiomery zopiklonu byly podrobeny postupem Single Point Assay k prozkoumání možného časově závislého mechanismu. Ten byl u CYP3A a CYP2C8 vyloučen, ale u CYP2D6 byl výsledek pozitivní pro R-ZOP (Obrázek 16). Přestože ZOP ani jeho enantiomery silně neinhibovaly enzymovou aktivitu testovaných P450, byly mezi R- a S- formami ZOP pozorovány rozdíly.



Obrázek 16 Vliv zopiklonu a jeho enantiomerů na enzymovou aktivitu CYP2D6 (horní obrázek). Časově závislá inhibice R-ZOP a vyloučení této inhibice pro S-ZOP (Single Point Assay, dolní obrázek).

5.2.5 Modafinil a jeho S- a R- enantiomery

Vliv modafinilu i jeho R- a S- enantiomerů byl studován u enzymových aktivit devíti nejdůležitějších P450. Inhibiční experimenty ukázaly slabou inhibici aktivity CYP2C19, avšak inhibiční potenciál všech tří forem MOD se nijak významně nelišil (Obrázek 17). Aktivity CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A nebyly působením MOD ani jeho R- a S- forem ovlivněny (Tabulka 11).



Obrázek 17 Vliv modafinilu a jeho enantiomerů na enzymovou aktivitu CYP2C19, inhibiční vliv všech testovaných látek je podobný.

Tabulka 11 Hodnoty IC₅₀ pro chirální léčiva tamsulosin, tolterodin, citalopram, zopiklon, modafinil a jejich enantiomery. Tučně jsou zvýrazněny významné inhibice.

	<i>3A4</i>		<i>2E1</i> (μM)	<i>2D6</i> (μM)	<i>2C19</i> (μM)	<i>2C9</i> (μM)	<i>2C8</i> (μM)	<i>2B6</i> (μM)	<i>2A6</i> (μM)	<i>1A2</i> (μM)
	<i>Testosteron</i> (μM)	<i>Midazolam</i> (μM)								
TAM	6,75 ± 0,21	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
R-	2,88 ± 0,12	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
S-	14,22 ± 0,53	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
TOL	1,48 ± 0,30	13,22 ± 1,09	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
R-	4,78 ± 0,17	21,21 ± 1,37	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
S-	1,71 ± 0,03	14,10 ± 1,15	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CIT	>100	>100	>100	55,35 ± 5,09	>100	>100	>100	>100	>100	>100
R-	>100	>100	>100	68,17 ± 5,70	>100	>100	>100	>100	>100	>100
S-	>100	>100	>100	62,63 ± 7,89	>100	>100	>100	>100	>100	>100
ZOP	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
R-	>100	>100	>100	> 100 ⁺	>100	>100	>100	>100	>100	>100
S-	> 100 ⁺	>100	>100	>100	>100	>100	> 100 ⁺	>100	>100	>100
MOD	>100	>100	>100	>100	45,84 ± 7,63	>100	>100	>100	>100	>100
R-	>100	>100	>100	>100	51,79 ± 8,58	>100	>100	>100	>100	>100
S-	>100	>100	>100	>100	48,62 ± 9,74	>100	>100	>100	>100	>100

5.3 Inhibiční potenciál enantiomerů dihydropyridinových blokátorů vápníkových kanálů na enzymové aktivity P450 v lidských jaterních mikrosomech

Další testovanou skupinou chirálních léčiv byly dihydropyridinové blokátory vápníkových kanálů. Všechny testované látky obsahují minimálně jedno chirální centrum a v klinické praxi se s nimi setkáváme v podobě racemických směsí. Byly stanoveny IC_{50} jednotlivých enantiomerů amlodipinu, benidipinu, felodipinu a isradipinu. Pokud se inhibice vůči devíti testovaným P450 projevila nižším IC_{50} než $10 \mu M$, navazovaly na základní panel testů i experimenty ke zjištění mechanismů inhibice a hodnot K_i .

5.3.1 R- a S- enantiomery amlodipinu

Oba R-AML i S-AML vykazovaly inhibiční potenciál vzhledem k enzymové aktivitě CYP3A (se specifickým substrátem testosteronem i midazolamem), CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9 a CYP2C19. Inhibici enzymové aktivity CYP2C8 způsobil pouze S-AML. Naopak, aktivity CYP2A6, CYP2D6 a CYP2E1 nebyly významně ovlivněny ani jedním testovaným enantiomerem AML ($IC_{50} > 50 \mu M$), hodnoty shrnuty v tabulce (Tabulka 12).

K určení inhibičních konstant CYP3A byly použity dva odlišné časy preinkubace (3 a 30 minut). Z naměřených dat byly sestaveny grafy (Dixonův, Lineweaverův-Burkův a Scatchardův) a odečteny mechanismy inhibice. Při tří minutové preinkubaci se projevila kompetitivní inhibice s významnou enantiospecifitou (midazolam jako substrát). S-AML inhiboval enzymovou aktivitu CYP3A 2krát silněji. Pokud se použil ke stanovení aktivity testosteron, významný rozdíl mezi enantiomery se tolik neprojevilo. Při třiceti minutové preinkubaci došlo k významnému poklesu všech inhibičních konstant. Průběh inhibice dle grafů byl určen jako nekompetitivní, ale silnější inhibice při delší preinkubaci naznačovala ireversibilní inhibici a proto byla inhibice CYP3A enantiomery AML zkoumána dále podrobněji. Výrazná stereospecifita byla pozorována i při inhibici aktivit CYP2C9 a CYP2C19 (Tabulka 13). R-AML byl 2krát silnější inhibitor CYP2C9 ($p < 0,05$), a dokonce 12krát silnější

inhibitor než S-AML ($p < 0,005$). Inhibice CYP2C9 se projevila smíšeným mechanismem a inhibice CYP2C19 jako nekompetitivní.

Tabulka 12 Souhrnný přehled inhibičních potenciálů dihydropyridinů vyjádřených hodnotami IC_{50} .

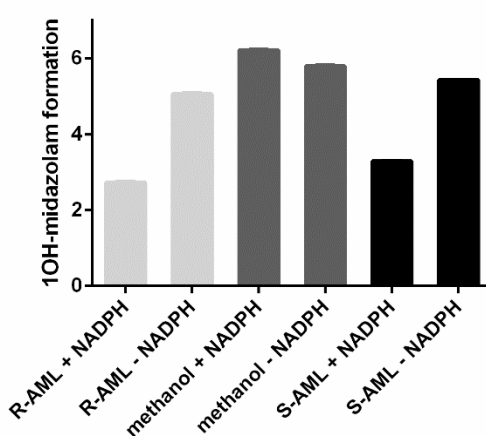
IC_{50} [μM]		<i>CYP1A2</i>	<i>CYP2A6</i>	<i>CYP2B6</i>	<i>CYP2C8</i>	<i>CYP2C9</i>	<i>CYP2C19</i>
AML	R-	47,39±3,63	> 50 μM	41,49±1,37	> 50 μM	6,59±1,17	5,14±1,14
	S-	> 50 μM	> 50 μM	40,12±1,11	9,55±1,44	16,42±1,35	47,22±1,91
BEN	(+)-	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM	25,53±2,34	24,87±1,73
	(-)-	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM	8,43±1,32	26,38±1,89
FEL	R-	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM	11,77±0,17	> 50 μM	1,93 ± 0,38
	S-	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM	45,05±2,81	36,48±2,42	4,41± 0,15
ISR	(+)-	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM	6,55±1,29
	(-)-	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM	> 50 μM	10,66±1,45
IC_{50} [μM]		<i>CYP2D6</i>	<i>CYP2E1</i>	<i>CYP3A4</i> <i>Testosteron</i>	<i>3 minuty</i> <i>Midazolam</i>	<i>CYP3A4</i> <i>Testosteron</i>	<i>30 minut</i> <i>Midazolam</i>
AML	R-	> 50 μM	> 50 μM	26,24 ±1,75	36,94±8,32	3,43±1,04	2,65±0,05
	S-	> 50 μM	> 50 μM	27,02±1,04	24,5±3,13	1,99 ±0,75	2,18±0,02
BEN	(+)-	16,1±1,41	> 50 μM	9,15±1,28	10,34±3,32	2,49±0,29	2,12±1,26
	(-)-	12,5±1,19	> 50 μM	25,37±4,69	20,87±5,64	3,23±0,46	6,40±2,16
FEL	R-	> 50 μM	> 50 μM	31,02±1,19	28,42±3,70	26,4±0,69	8,41±3,64
	S-	> 50 μM	> 50 μM	17,68±1,22	15,99±1,97	12,3±1,75	5,70±0,76
ISR	(+)-	> 50 μM	> 50 μM	22,19±2,45	29,76±3,55	22,83±1,19	8,36±1,15
	(-)-	> 50 μM	> 50 μM	23,11±3,87	20,11±6,21	28,19±1,24	8,78±1,26

Tabulka 13 Charakterizace významné inhibice enantiomerů dihydropyridinů. Tučně a hvězdičkou jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými enantiomery.

<i>CYP</i>	<i>R-AML</i>		<i>S-AML</i>	
	<i>K_i [μM]</i>	<i>mechanismus</i>	<i>K_i [μM]</i>	<i>mechanismus</i>
<i>3A4^{TST 3min}</i>	16,32 ± 3,73	kompetitivní	19,78 ± 3,91	kompetitivní
<i>3A4^{MDZ 3 min}</i>	14,85 ± 2,10	kompetitivní	8,95 ± 1,48*	kompetitivní
<i>3A4^{TST 30 min}</i>	3,90 ± 0,55	nekompetitivní	2,91 ± 0,36*	nekompetitivní
<i>3A4^{MDZ 30 min}</i>	3,86 ± 0,11	nekompetitivní	3,24 ± 0,46	nekompetitivní
<i>2C9</i>	12,11 ± 1,53*	smíšená	21,45 ± 3,05	smíšená
<i>2C19</i>	5,97 ± 0,67*	nekompetitivní	72,2 ± 8,62	nekompetitivní
<i>CYP</i>	<i>(+)-BEN</i>		<i>(-)-BEN</i>	
	<i>K_i [μM]</i>	<i>mechanismus</i>	<i>K_i [μM]</i>	<i>mechanismus</i>
<i>3A4^{TST 3min}</i>	8,4 ± 1,29**	kompetitivní	23,14 ± 5,89	kompetitivní
<i>3A4^{MD 3min}</i>	2,91 ± 1,07*	kompetitivní	7,89 ± 3,15	kompetitivní
<i>3A4^{TST 30 min}</i>	2,53 ± 0,07*	nekompetitivní	3,04 ± 0,12	nekompetitivní
<i>3A4^{MDZ 30 min}</i>	4,75 ± 0,25*	nekompetitivní	5,27 ± 0,16	nekompetitivní
<i>2C9</i>	20,17 ± 2,31	nekompetitivní	6,84 ± 1,11*	nekompetitivní
<i>2C19</i>	10,22 ± 2,37	nekompetitivní	8,35 ± 1,17	nekompetitivní
<i>2D6</i>	66,66 ± 3,87	nekompetitivní	60,91 ± 1,37	nekompetitivní
<i>CYP</i>	<i>(+)-FEL</i>		<i>(-)-FEL</i>	
	<i>K_i [μM]</i>	<i>mechanismus</i>	<i>K_i [μM]</i>	<i>mechanismus</i>
<i>3A4^{TS T3min A}</i>	28,66 ± 2,82	kompetitivní	17,47 ± 3,05**	kompetitivní
<i>3A4^{MD 3min}</i>	28,9 ± 3,52	kompetitivní	15,99 ± 3,11**	kompetitivní
<i>3A4^{TS T30 min}</i>	26,39 ± 4,02	akompetitivní	12,29 ± 1,68*	akompetitivní
<i>3A4^{MDZ 30 min}</i>	8,06 ± 0,96	nekompetitivní	5,81 ± 0,37	nekompetitivní
<i>2C19</i>	1,74 ± 0,59 *	smíšená	3,53 ± 1,79	nekompetitivní
<i>CYP</i>	<i>(+)-ISR</i>		<i>(-)-ISR</i>	
	<i>K_i [μM]</i>	<i>mechanismus</i>	<i>K_i [μM]</i>	<i>mechanismus</i>
<i>3A4^{TST 3 min}</i>	11,09 ± 1,08	akompetitivní	8,37 ± 1,07	akompetitivní
<i>3A4^{MDZ 3 min}</i>	7,25 ± 1,78	kompetitivní	6,43 ± 1,06	kompetitivní
<i>3A4^{TST 30 min}</i>	25,79 ± 4,04	akompetitivní	24,45 ± 6,49	akompetitivní
<i>3A4^{MDZ 30 min}</i>	4,59 ± 0,69	nekompetitivní	7,68 ± 0,85	nekompetitivní
<i>2C19</i>	3,73 ± 0,49*	akompetitivní	6,36 ± 0,73	akompetitivní

5.3.1.1 „Single Point Assay“ časově závislé inhibice CYP3A R- a S- amlodipinem

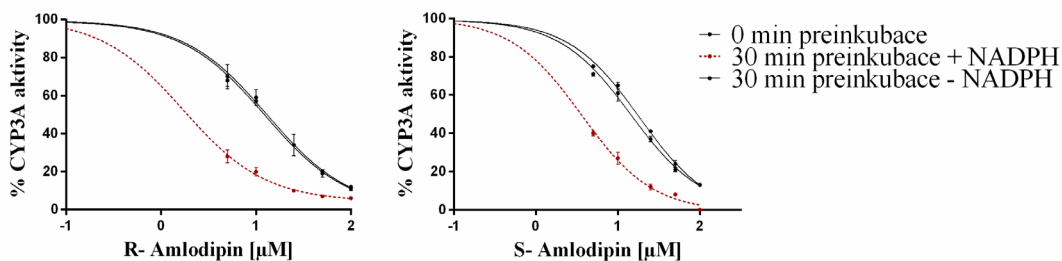
Časově závislá inhibice enzymu je jednou ze základních vlastností ireversibilní inhibice. Velké rozdíly v hodnotách IC_{50} při použití různých časů preinkubace naznačily tento typ inhibice. Nejprve byla provedena tzv. Single Point Assay, kdy byly enantiomery AML preinkubovány nejprve v přítomnosti a také bez NADPH generujícího komplexu. Při preinkubaci s NADPH klesla aktivita 1'-hydroxylace midazolamu na 55% u R-AML a 45% u S-AML (ve srovnání s aktivitou bez NADPH při preinkubaci, Obrázek 18). Tento výsledek naznačuje, že při preinkubaci vzniká za přítomnosti NADPH metabolit amlodipinu, který se také podílí na inhibici aktivity.



Obrázek 18 „Single Point Assay“ ukazující časově závislou inhibici aktivity CYP3A R- a S- AML.

5.3.1.2 „ IC_{50} shift“ časově závislé inhibice CYP3A R- a S-amlodipinem

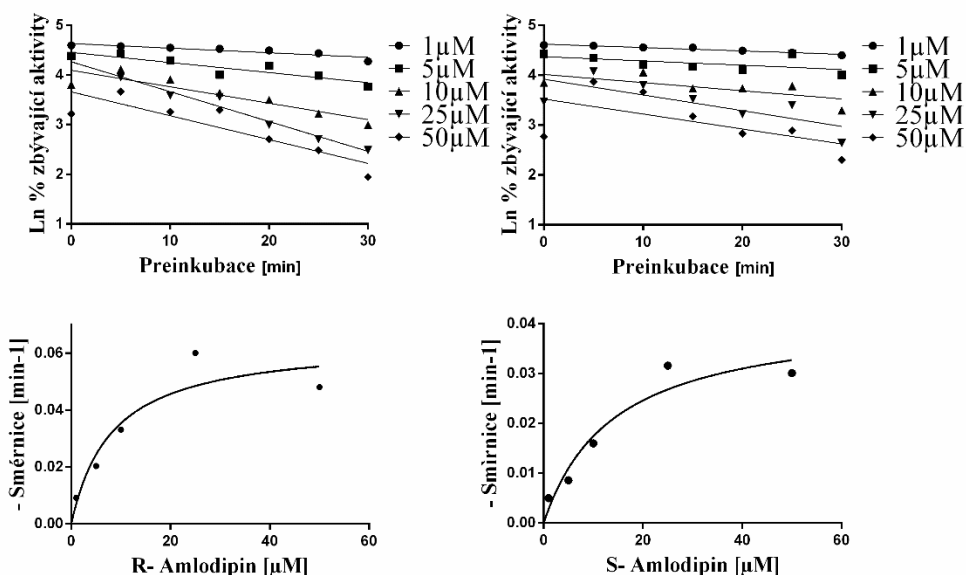
Dalším krokem bylo potvrzení domněnky, zda se jedná o současnou reversibilní i ireversibilní inhibici. Proto byly stanoveny a porovnány hodnoty IC_{50} , které se získaly inkubací enantiomerů AML v přítomnosti NADPH a v jeho absenci. Hodnoty IC_{50} bez preinkubace byly 13,17 μ M pro R-AML a 14,42 μ M pro S-AML. Po 30 minutové preinkubaci s NADPH se výsledné hodnoty IC_{50} snížily na 1,73 μ M pro R-AML a 3,61 μ M pro S-AML. U R-AML byl tedy přítomen osmi násobný posun a u S-AML pěti násobný posun v hodnotách IC_{50} (Obrázek 19). Tento výsledek potvrdil, že oba dva enantiomery amlodipinu se vůči CYP3A chovají zároveň jako reversibilní (kompetitivní) i ireversibilní (časově závislé) inhibitory.



Obrázek 19 „IC₅₀ shift Assay“ 1'-hydroxylace midazolamu pro R- a S- AML s preinkubací s a bez NADPH.

5.3.1.3 K_I/K_{inact} pro časově závislou inhibici CYP3A R- a S- amlodipinem

Byly provedeny další experimenty ke zjištění hodnot K_I a K_{inact}, které slouží k charakterizaci časově závislé inhibice. Koncentrační řady testovaných látek byly inkubovány při sedmi odlišných časech a tato data byla následně použita k sestrojení příslušných grafů a výpočtu hodnot (Obrázek 20). Dle vypočítaného poměru K_{inact}/K_I se R-AML chová jako silnější časově závislý inhibitor enzymové aktivity CYP3A než S-AML (který naopak působí jako silnější reversibilní inhibitor, Tabulka 14).



Obrázek 20 Inaktivační výnos pro časově závislou inhibici CYP3A R- a S- AML, jako specifický substrát pro reakci byl použit midazolam.

Tabulka 14 Inaktivační parametry, K_I a K_{inact} pro časově závislou inhibici CYP3A R- a S- amlodipinem. Poměr K_{inact}/K_I je měřítkem účinnosti inhibice [161].

	K_I [μM]	K_{inact} [min^{-1}]	K_{inac}/K_i [$\text{min}^{-1} \cdot \text{nM}^{-1}$]
<i>R</i>-AML	8,22 ± 2,78	0,065 ± 0.0069	7,91
<i>S</i>-AML	14,06 ± 3,86	0,041 ± 0,0043	2,92

5.3.2 α -enantiomery benidipinu

Enantiomery benidipinu inhibovaly enzymové aktivity CYP3A, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6. Naopak, enzymové aktivity CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8 a CYP2E1 nebyly významně ovlivněny ($\text{IC}_{50} > 50\mu\text{M}$, Tabulka 12). Dalšími experimenty byl zjištěn typ inhibice. U enzymové aktivity CYP3A byly opět použity dva různé časy preinkubace (3 a 30 minut) a dva specifické substráty (testosteron a midazolam). U krátké preinkubace se projevil kompetitivní mechanismus, zatímco při delší preinkubaci nekompetitivní. Inhibice měla výrazné enantiospecifické vlastnosti, (+)-BEN se choval jako silnější inhibitor u tří-minutové ($p < 0,005$) i třiceti-minutové preinkubace ($p < 0,05$, Tabulka 13). Naopak (-)-BEN se choval jako silnější inhibitor enzymové aktivity CYP2C9 ($p < 0,05$). Inhibice aktivity CYP2C19 byla bez významného rozdílu mezi oběma testovanými enantiomery. Inhibice CYP2D6 byla mírná a opět bez významného rozdílu mezi těmito dvěma látkami. Mechanismus inhibice u CYP2C9, CYP2C19 i CYP2D6 se jevil dle vynesných grafů (Dixonův, Lineweaverův-Burkův, Scatchardův) jako nekompetitivní (Tabulka 13).

5.3.3 Enantiomery felodipinu

Enantiomery felodipinu významně stereospecificky inhibovaly enzymové aktivity CYP3A a CYP2C19. Aktivity CYP2A6, CYP2C8 a CYP2C9 byly inhibovány jen mírně, ale opět s rozdíly mezi oběma testovanými enantiomery. Inhibice CYP2C8 (+)-FEL (IC_{50} 12 μM) byla téměř 4krát silnější než (-)-FEL (IC_{50} 45 μM). Opačný mechanismus se projevil u inhibice CYP2C9 a CYP2A6, (+)-FEL byl slabší inhibitor než (-)-FEL. Inhibice aktivit CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6 a CYP2E1 byla nevýznamná ($\text{IC}_{50} > 50\mu\text{M}$, Tabulka 12). Podrobnější kinetické studie odhalily statisticky signifikantnější inhibici CYP3A (-)-felodipinem (3 i 30 minutová

preinkubace, testosteron i midazolam). Při kratší preinkubaci se opět projevil kompetitivní mechanismus, u delší preinkubace pak nekompetitivní za použití specifického substrátu midazolamu a akompetitivní za použití testosteronu. Stereospecifita se projevila i u inhibice CYP2C19 se smíšeným mechanismem, kdy (+)-FEL vykazoval 2krát nižší inhibiční konstantu než (-)-FEL (Tabulka 13).

5.3.4 Enantiomery isradipinu

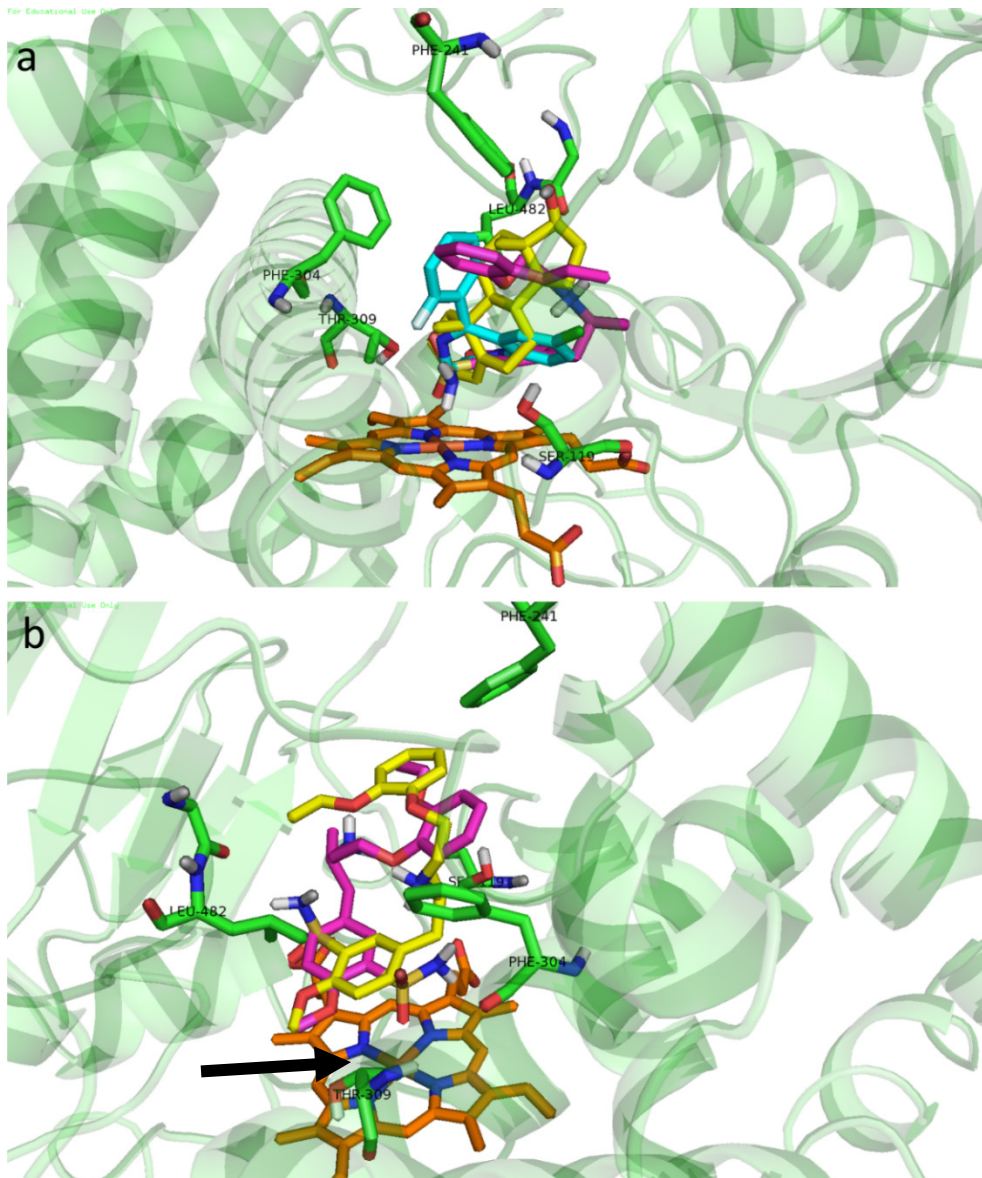
Enantiomery isradipinu se chovaly jako silné inhibitory CYP3A a CYP2C19. Ostatní stanovované aktivity nebyly významně ovlivněny jejich přítomností v inkubační směsi ($IC_{50} > 50\mu M$). Inhibiční konstanty stanovené při inhibici CYP3A oběma enantiomery se významně nelišily. Inhibice se projevovала buď kompetitivním nebo akompetitivním mechanismem. U CYP2C19 se jevil jako silnější inhibitor (+)-ISR ($p < 0,05$) s akompetitivním typem inhibice (Tabulka 13).

5.4 Molekulové modelování

Cílem této části disertace bylo ověřit si některá data získaná *in vitro* s pomocí molekulového modelování. K prostudování byly zvoleny dvě situace. Zaměřili jsme se na rozdíl inhibičního potenciálu enantiomerů tamsulosinu, kde inhibice při použití testosteronu byla signifikantní, zatímco při použití midazolamu byla velmi slabá. Druhým zájmem zkoumání byla (vzhledem k významu amlodipinu v klinické praxi) interakce enantiomerů amlodipinu s aktivním místem molekuly enzymu CYP3A4.

5.4.1 Interakce R- a S- tamsulosinu s aktivním místem CYP3A4

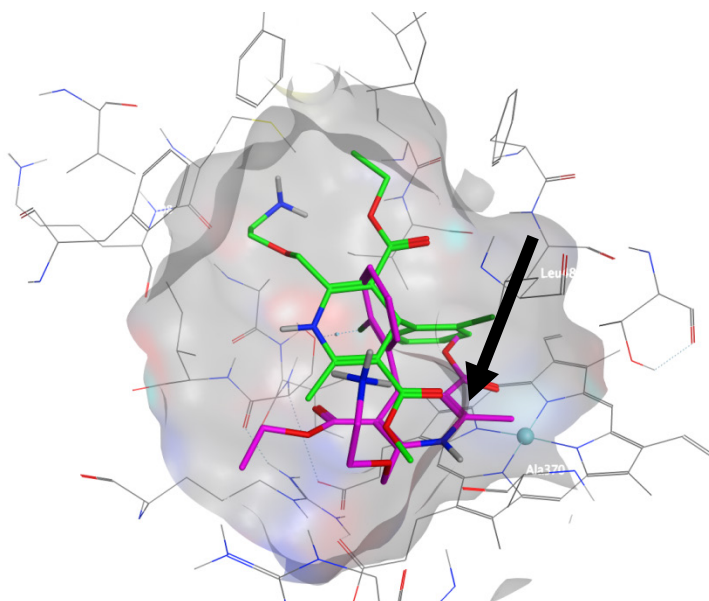
Testosteron i midazolam zaujímají pozici v blízkosti aktivního místa (tj. i v blízkosti hemové skupiny) v molekule CYP3A4. Pomocí molekulového dokování bylo potvrzeno, že vazba R-TAM a S-TAM se v molekule tohoto enzymu liší. R-TAM je schopný navázat se tak, že brání dalším substrátům v zaujetí správné polohy vzhledem k aktivovanému kyslíku vázanému na hemové železo (Obrázek 21). Volná vazebná energie R-TAM (-7,7kcal/mol) jej také zvýhodňuje oproti S-TAM (-7,2 kcal/mol). R-TAM se v molekule navíc váže tak, že více brání molekule testosteronu v přístupu k aktivnímu místu, zatímco midazolam se váže jinak. Testosteron je také blíže hemu než midazolam. Vazebná energie midazolamu (-8,2 kcal/mol) umožňuje jeho hydroxylaci i v případě přítomnosti tamsulosinu (midazolam je ve své pozici mimo jiné stabilizován interakcemi π - π^* , např. s aminokyselinovým zbytkem Phe 304). Naopak vazebná energie testosteronu (-6,8 kcal/mol) je podstatně nižší. Jak lze vidět na obrázku, vazebná poloha testosteronu je signifikantně překryta molekulou R-TAM (Obrázek 21). Tyto výsledky molekulového dokování jsou tedy v souladu se získanými *in vitro* daty, které ukazují silnější inhibici metabolismu testosteronu R-tamsulosinem. Naproti tomu, midazolam není významně inhibován R- ani S-tamsulosinem.



Obrázek 21 (A) Vazebná pozice testosteronu (žlutá), midazolamu (tyrkysová) a R-tamsulosinu (růžová) v aktivním místě molekuly CYP3A4. (B) Spodní obrázek ukazuje vazbu R-TAM (žlutý) a S-TAM (růžový) v aktivním místě molekuly CYP3A4. Šipka směřuje k místu nad atomem železa hemu, tj. místa vazby molekuly kyslíku.

5.4.2 Interakce R- a S-amlodipinu s aktivním místem CYP3A4

Rozdílnost ve vazbě R- a S- amlodipinu v aktivním místě molekuly CYP3A4 byla potvrzena. Oba dva klasické substráty, testosteron i midazolam, se váží v molekule v místě oxidace, tedy k hemu tvořícího dno aktivního místa. S-AML se váže ve větší blízkosti tohoto dna (tj. i hemu) a efektivněji brání přístupu substrátů k místu oxidace (Obrázek 22). Vazebná energie S-AML (-7,6 kcal/mol) ukazuje vyšší afinitu k aktivnímu místu než R-AML (-6,7kcal/mol). Při reversibilní inhibici se tedy S-AML chová jako účinnější inhibitor.



Obrázek 22 Vazebné módy R-amlodipinu (zelený) a S-amlodipinu (růžový) v molekule CYP3A4 (hemové železo modrá kulička). Šipka ukazuje blízkost S-AML a hemového železa.

5.5 Interakce R- a S- amlodipinu se specifickým genotypem P450

Dle zjištěných výsledků je amlodipin inhibítozem enzymových aktivit mimo CYP3A i CYP2C9 a CYP2C19 (viz. Tabulka 13). Proto bylo ke stanovení inhibičního potenciálu jeho enantiomerů využito i lidských jaterních mikrosomů se stanoveným specifickým genotypem CYP2C9 a CYP2C19. Inhibice hydroxylace diklofenaku a S-mefenytouinu byla stanovena pomocí mikrosomů, které odpovídají vysoké enzymové aktivitě (tzv. „*wild type*“ divoké alele), střední aktivitě a nízké až žádné aktivitě (přehled jednotlivých alel v Tabulka 5). Byly porovnány naměřené hodnoty IC_{50} mezi jednotlivými enzymovými alelami jedné P450 formy (Tabulka 15). Inhibice byla stereospecifická, R-AML byl silnější inhibitor než S-AML, stejně jako v experimentech se směsnými lidskými jaterními mikrosomy. Genotyp CYP2C9 s nízkou aktivitou a CYP2C19 s žádnou aktivitou nevykazoval žádnou změnu v aktivitě po inkubaci s inhibitory.

Tabulka 15 Hodnoty IC_{50} R- a S-AML charakterizující inhibici enzymové aktivity v mikrosomech se stanoveným genotypem.

<i>Enzym</i>	<i>Alela</i>	<i>Fenotyp metabolismu</i>	<i>IC₅₀ [μM]</i>	
			R-AML	S-AML
<i>CYP2C9</i>	CYP2C9*1/*1	extensivní	13,16 ± 1,14	44,92 ± 5,09
	CYP2C9*1/*2	střední	12,98 ± 2,31	53,19 ± 6,94
	nespecifikováno	pomalý	-	-
	směsné MS	extensivní	6,59 ± 1,17	16,42 ± 1,35
<i>CYP2C19</i>	CYP2C19*1/*1	extensivní	8,88 ± 3,99	19,15 ± 2,52
	CYP2C19*1/*2	střední	7,12 ± 1,41	10,30 ± 2,55
	CYP2C19*2/*2	pomalý	-	-
	směsné MS	extensivní	5,14 ± 1,14	47,22 ± 1,91

6. DISKUZE

Hlavními stavebními kameny organismu jsou *D*-sacharidy, *L*-aminokyseliny a pravotočivá dvoušroubovice DNA. Tyto biologicky aktivní struktury tvoří chirální prostředí, ve kterém probíhá většina interakcí stereospecificky. Výjimku netvoří ani interakce léčiv s funkčními molekulami lidského organismu. Při kontaktu léčiva s cílovými strukturami (enzymy, transportéry, receptory či DNA), hraje významnou roli prostorové uspořádání všech zapojených složek. Chirální léčiva, respektive jejich jednotlivé stereoisomery, mohou vykazovat selektivní absorpci, vazbu na protein, transport, lékové interakce nebo například stereospecificky probíhající metabolismus. Každý optický isomer nebo jejich směs může mít odlišné nežádoucí účinky nebo farmakokinetické, farmakodynamické či terapeutické profily. Mezi známé případy odlišných vlastností enantiomerů chirálního léčiva patří *R*- a *S*-thalidomid, *R*- a *S*-salbutamol nebo *R*- a *S*-karvediol [87, 91, 96]. V roce 1992 upozornila FDA na odlišné vlastnosti enantiomerů a odstartovala tak boom tzv. enantiomerně čistých látek. Ve vývoji nových látek se dnes již téměř nevyskytují racemické směsi [87]. Stejně tak dlouho dostupná chirální léčiva ve formě racemátu, kterým vypršel patent, byla opětovně patentována jako enantiomerně čisté látky. Například racemát omeprazol byl znovu schválen jako čistý *S*- enantiomer esomeprazol [119]. V ideálním případě má terapeutický účinek jeden enantiomer a nežádoucí účinek ten druhý. Avšak od tohoto ideálního stavu se mohou některé látky vzdalovat a možností může být několik.

Tato disertační práce byla zaměřena na stereospecifitu vybraných chirálních látek a jejich vliv na metabolismus léčiv a na reakce nejvýznamnějších biotransformačních enzymů metabolismu I. fáze, tedy cytochromů P450. Podléhají stereospecifickým interakcím, a jsou nejčastější příčinou rozdílné farmakokinetiky dvou enantiomerů jedné látky [162]. Aktivita těchto enzymů může být ovlivněna mnoha faktory, jako jsou faktory genetické nebo aktuální stav organismu. Jsou to ale také vzájemné interakce léčiv, které mohou fungovat jako enzymové substráty nebo ovlivňovat aktivitu jako induktory nebo inhibitory cytochromů P450. Většina léčiv je metabolizována cytochromy P450 a proto inhibice těchto enzymů může vést

k předávkování a toxicitě. Porozumění významu stereoselektivity při metabolismu léčiv by mohlo pomoci pochopit i stereospecifitu ve farmakokinetice a předpovědět potenciální interakce léčiv vyplývající z enzymové inhibice a indukce.

Inhibice cytochromů P450 budí velkou pozornost již od první popsané interakce cimetidinu. Bylo totiž prokázáno, že cimetidin ovlivňuje metabolismus léčiv jak u zvířat, tak u lidí [163, 164]. Ukázalo se, že se jedná o jeden z nejvýznamnějších mechanismů vzniku klinicky závažných lékových interakcí a proto se inhibičnímu potenciálu léčiv na aktivitu P450 věnuje značná pozornost. Nejdůležitějšími enzymy podílejícími se na metabolismu léčiv jsou CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4. Inhibiční studie se standardně provádějí studiem inhibice metabolismu specifického substrátu. Základní informaci o inhibičním potenciálu látky podává hodnota IC_{50} , ovšem pro predikci možné lékové interakce *in vivo* se používá hodnota inhibiční konstanty K_i . Velkou pozornost si také zaslouží ireversibilní inhibice P450, která obvykle vede k závažnějším a déletrvajícím lékovým interakcím, protože nenávratně inaktivovaný enzym je nahrazen až jeho syntézou *de novo* [165].

Předkládaná disertační práce poskytuje možnost nahlédnout na výzkum stereospecifity z pohledu metabolismu zprostředkovaného P450, především na enzymovou inhibici způsobenou enantiomery chirálních léčiv.

Byl zkoumán efekt ketokonazolu v podobě racemátu a jednotlivých *cis*-enantiomerů na enzymovou aktivitu devíti nejdůležitějších cytochromů P450 zapojených do metabolismu léčiv. Ketokonazol má schopnost tvořit čtyři enantiomery, ale v klinické praxi se používá pouze směs dvou *cis*-enantiomerů. Toto antimykotikum je známé pro svoji schopnost interagovat s ostatními léčivy. Ketokonazol je obecně považován za silný inhibitor aktivity CYP3A4 a chová se také jako slabý inhibitor většiny P450 [166]. Inhibice vede často k závažným lékovým interakcím s ostatními léčivy, příkladem mohou být interakce statinů, tricyklických antidepresiv, antivirotik, antikonvulsiv [109]. Nabízelo se proto prozkoumat inhibiční vliv jednotlivých enantiomerů a zjistit, zda by neměl jeden z nich menší inhibiční potenciál vůči P450 než druhý enantiomer a celkově než racemát. V minulosti bylo totiž zjištěno, že se liší i antifungální účinek obou enantiomerů. Byla porovnána jejich antifungální aktivita vůči sedmi druhům z rodu *Candida spp.* Výsledky ukázaly, že (2R,4S)-(+)-KET měl

dvakrát větší efekt na *C. albicans* a *C. tropicalis*, zatímco (2S,4R)-(-)-KET byl sedmkrát účinnější proti ostatním pěti testovaným druhům [110, 112]. Další enantiospecifické rozdíly byly objeveny při jejich reakci se signální dráhou nukleárního receptoru AhR [112]. Naopak, antagonistický účinek obou enantiomerů na GR a agonistický účinek na PXR receptory byly bez rozdílu [167]. Dle výsledků této práce byly objeveny signifikantní rozdíly zejména při inhibici aktivit CYP3A a CYP2C19. (2S,4R)-(-)-KET vykazoval až pětinasobně větší inhibiční potenciál vůči CYP3A než druhý enantiomer (2R,4S)-(+)-KET. Naproti tomu (2R,4S)-(+)-KET se choval jako silnější inhibitor aktivity CYP2C19. Ačkoliv byly nalezeny významné enantiospecifické rozdíly při inhibici enzymové aktivity P450, ketokonazol se nezdá být vhodným kandidátem pro vznik enantiomerně čistého léčiva. Antimykotický efekt je totiž stereospecifický, a každý enantiomer je účinný proti jinému patogenu.

Další zkoumané širokospektré antimykotikum, itraconazol, je znám pro svoji častou roli při lékových interakcích [116]. Ve své struktuře obsahuje dokonce tři chirální centra, takže může tvořit až osm stereoisomerů. Nicméně, farmaceutické přípravky obsahují pouze čtyři *cis*-diastereoismery. Ukázalo se, že metabolismus itraconazolu je vysoce stereoselektivní. Pouze dva ze čtyř stereoisomerů (ITZA a ITZ-B) jsou metabolizovány CYP3A a vznikající metabolity přispívají, stejně jako substrát, k inhibici tohoto enzymu [168]. Cílem této práce bylo určit, zda se jednotlivá inhibiční aktivita ITZ stereoisomerů vůči P450 neliší. Doposud nebylo zcela určeno, který z isomerů se nejvíce podílí na inhibici CYP3A4 a může tak způsobit závažné lékové interakce. Dle výsledků této práce se podílí na inhibici enzymové aktivity CYP3A všechny čtyři isomery, nicméně s odlišnou potencí. Pokud byla k reakci použita 6 β -hydroxylace testosteronu, vykazoval nejvyšší inhibici ITZ-D. V případě 1'-hydroxylace midazolamu způsobil nejvyšší inhibici ITZ-A. Stejně tak aktivita CYP2C19 byla signifikantně inhibována, ale v tomto případě bez velkých rozdílů mezi jednotlivými diastereoismery. Použití pouze jednoho stereoisomeru ITZ k léčbě by mohlo přinést jistá pozitiva. Vzhledem k tomu, že ITZ-C a ITZ-D nepodléhají metabolismu CYP3A4, nevznikají z nich ani metabolity, které by mohly přispět k další inhibici [117]. Lépe by se rovněž odhadovala kinetika jednoho isomeru než celé racemické směsi. Na základě výsledků této práce by se takovým vhodným kandidátem mohl zdát ITZ-C, protože způsobil inhibici aktivity CYP3A signifikantně méně než

ITZ-D (6 β -hydroxylace testosteronu). Navíc, na základě informací z patentu, tento stereoisomer by měl vykazovat i silnější antifungální aktivitu než racemát [169].

Jak již bylo zmíněno, v uplynulém desetiletí se na trhu začaly objevovat enantiomerně čisté látky, které nahradily doposud používané racemáty. Před jejich schválením byla prokázána jejich bezpečnost a terapeutická účinnost, nicméně různé biologické enantiospecifické aktivity těchto, často „starých“ léků, zůstávají neobjasněny. Mezi tyto látky patří i další skupina léčiv, kterým byla věnována pozornost v této práci. Bylo vybráno pět strukturně i terapeuticky odlišných látek, které se dříve používaly jako racemické směsi. Racemický tamsulosin, tolterodin a modafinil byly později na trhu nahrazeny svými R-enantiomery a racemické směsi citalopramu a zopiklonu svými S-enantiomery. Enantiomery i racemáty těchto látek byly podrobeny systematické studii zaměřené na jejich interakce s cytochromy P450. Výsledky ukázaly, že enantiomery i racemáty tolterodinu a tamsulosinu jsou silnými inhibitory enzymové aktivity CYP3A, který je zapojen do metabolismu mnoha důležitých léčiv. U obou látek byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi testovanými enantiomery. Terapeuticky účinný R-TAM inhiboval aktivitu zmíněného enzymu pětikrát účinněji než S-forma a dvakrát více než samotný racemát. Inhibiční konstanty všech látek při měření aktivity za použití specifického substrátu testosteronu byly nízké (K_i pro R-TAM 2,88 μM , S-TAM 6,75 μM a racemát 14,22 μM). Pokud se ale pro měření enzymové aktivity použil specifický substrát midazolam, inhibice byla významně nižší ($\text{IC}_{50} >100 \mu\text{M}$). K objasnění tohoto fenoménu bylo použito molekulové dokování. Molekula enzymu CYP3A4 je známá svým velkým a flexibilním aktivním místem, které je schopné pojmout strukturně odlišné substráty [44, 45]. Dokovací studie odhalila odlišný mechanismus vazby obou substrátů, testosteronu i midazolamu. Analýza možných vazeb substrátu a potenciálního inhibitoru, R- a S-tamsulosinu, odhalila možné vysvětlení různé síly inhibice. Vazba substrátů i inhibitorů je velmi komplexní, což odráží vlastnosti aktivního místa enzymu [170, 171]. Výsledky dokování také potvrdily stereospecifitu inhibice R- a S-tamsulosinem. R-TAM se v molekule enzymu váže tak, že brání testosteronu ve správném a efektivním umístění do aktivního místa. S-TAM díky svému odlišnému prostorovému uspořádání vadí testosteronu mnohem méně (Obrázek 21). Tomuto uspořádání odpovídají i volné vazebné energie jednotlivých látek. Tato data by mohla pomoci s vysvětlením lékových interakcí tamsulosinu s některými substráty CYP3A

[121, 172]. Nicméně plazmatické koncentrace tamsulosinu jsou v rozmezí nmol, a proto není zcela jasný klinický dopad této inhibice [173]. Druhým nalezeným inhibítozem enzymové aktivity CYP3A se stal tolterodin (TOL) a jeho enantiomery. S-TOL vykazoval třikrát silnější inhibici než R-TOL a dvakrát větší než racemát. V klinické praxi se používá preparát s obsahem R-tamsulosinu, v tomto případě je tedy silnější inhibitor (S-TOL) z léčby vyloučen a lék se stal z pohledu vzniku lékových interakcí bezpečnějším. Další zkoumané enzymové aktivity nebyly ovlivněny přítomností tamsulosinu, tolterodinu ani jejich enantiomerů v inkubační směsi. V lidských jaterních mikrosomech *in vitro* mají tedy tyto látky schopnost inhibovat pouze aktivitu CYP3A.

Zdá se, že ani další zkoumaná léčiva, citalopram, modafinil a zopiklon, nevykazovaly silnou inhibici vůči aktivitám P450. Objevily se jen slabé inhibice. Výsledky této studie mimo jiné potvrdily slabou inhibici CYP2D6 racemickým citalopramem i jeho S-enantiomerem [174]. Inhibice byla ale nalezena i u R-enantiomeru se stejnou potencí jako u S-formy. Možnost vzniku lékové interakce na základě inhibice CYP2D6 některou z forem citalopramu je nepravděpodobná. To potvrzují i výsledky studie, která hodnotí bezpečnost S-citalopramu, a podle níž je bezpečnější než ostatní látky ze skupiny selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu, i než samotný racemát citalopram [175]. Stejně tak se potvrdila slabá inhibice aktivity CYP2C19 modafinilem. Tuto aktivitu inhibovaly i jeho enantiomery bez rozdílu. Plazmatické koncentrace modafinilu mohou být až 30 μM po jedné 300mg dávce [176]. V každém případě klinický dopad lékové interakce způsobený inhibicí CYP2C19 bude pravděpodobně malý. Racemický zopiklon ani jeho enantiomery neinhibovaly studované enzymové aktivity v koncentračním rozmezí odpovídající hladinám léčiva v plasmě (μM rozmezí) [177]. Enantiospecifické rozdíly mezi enantiomery zopiklonu byly sice pozorovány, ale inhibice byla patrná pouze ve vysokých koncentracích (nad 100 μM). Lékové interakce způsobené inhibicí aktivit P450 enantiomery zopiklonu jsou nepravděpodobné.

Dihydropyridinové blokátory vápníkových kanálů, jako jsou amlodipin, benidipin, felodipin a isradipin, snižují systémovou vaskulární rezistenci a arteriální tlak. Jsou to běžná antihypertenziva a léčiva užívaná v léčbě anginy pectoris. Například amlodipin byl v roce 2014 šestým nejčastěji předepisovaným lékem v USA [178]. Ve své struktuře mají nejméně jedno chirální centrum, a proto mohou tvořit několik optických

isomerů. Jeden z enantiomerů vykazuje obvykle vyšší terapeutickou účinnost, ale v klinické praxi jsou dostupné ve formě racemátů. Léčba dihydropyridiny nese riziko výskytu nežádoucích účinků. Patří sem tachykardie, ortostatická hypotenze, retence tekutin, bolesti hlavy či svalové křeče. Riziko vzniku nežádoucích účinků stoupá, zejména v kombinaci s jinými léčivy, například statiny. Ty jsou často předepisovány společně u pacientů s hypertenzí a hypercholesterolémií. Podání amlodipinu vede ke zvýšení hladiny simvastatinu a způsobit tak myopatii a proto bylo vydáno doporučení FDA, které upravuje doporučené dávkování [179]. Dihydropyridiny se metabolizují v játrech zejména za účasti CYP3A4 a lékové interakce mohou nastat zejména díky indukci či inhibici biotransformačních enzymů [180, 181]. V této práci se tedy studoval efekt jednotlivých enantiomerů dihydropyridinů na enzymovou aktivitu cytochromů P450. Potvrdila se schopnost těchto látek inhibovat aktivitu CYP3A. U amlodipinu (AML), benidipinu (BEN) a felodipinu (FEL) se signifikantně lišily inhibiční potenciály jednotlivých enantiomerů. Terapeuticky účinnější (+)-BEN byl ve srovnání s (-)-BEN silnějším inhibitorem. Plasmatické koncentrace benidipinu v krvi se pohybují okolo 0,1 μM a naměřené hodnoty K_i pro CYP3A4 byly okolo 2 μM [182]. Léková interakce s dalšími substráty CYP3A a enantiomery benidipinu *in vivo* by tedy za určitých podmínek byla možná. Benidipin obsahuje ve své struktuře polární nitro- skupinu a objemné substituenty, což by mohlo odůvodnit jeho vazbu do velkého a flexibilního místa molekuly CYP3A [44]. (-)-FEL, opět ten farmakologicky účinnější z páru, inhiboval enzymovou aktivitu CYP3A více než (+)-FEL. Felodipin racemát byl nedávno identifikován jako slabý inhibitor CYP3A4 *in vivo* [183]. Isradipin inhiboval aktivitu CYP3A také silně, ovšem bez rozdílu mezi jednotlivými enantiomery. Klinický význam inhibice aktivity CYP3A se projeví například při současném podání se statiny. Této problematice se věnovala populační kohortová studie, která popsala vyšší výskyt nežádoucích účinků (akutní renální insuficience, hyperkalcémie, akutní infarkt myokardu a cévní mozková příhoda) u pacientů, kterým byly podávány statiny současně s dihydropyridiny. Tento fenomén autoři vysvětlili právě inhibicí enzymové aktivity CYP3A4 přítomnými dihydropyridiny [184].

Inhibice aktivity CYP3A4 působením dihydropyridinů vykazovala časově závislý charakter. Krátké preinkubace (3 min) odhalily kompetitivní mechanismus. Delší preinkubace (30 min) vyvolala složitější interakci těchto léčiv s molekulou CYP3A, inhibice byla podstatně silnější a mechanismus se jevil většinou jako nekompetitivní.

Tento fenomén byl podrobněji prostudován s enantiomery amlodipinu. Ukázalo se, že enantiomery amlodipinu jsou účinnými reversibilními i ireversibilními inhibitory enzymové aktivity CYP3A v lidských jaterních mikrosomech. S-AML se chová jako silnější inhibitor pouze při kompetitivní (reversibilní) inhibici. Na druhou stranu, experimenty odhalily i časově závislou inhibici se silnější inhibicí u R-AML. Časově závislá inhibice je pojem zahrnující všechny děje, které způsobí větší enzymovou inhibici se stoupajícím časem preinkubace. Většinou se jedná o dva hlavní procesy. Jedním z nich je tvorba reaktivních elektrofilů, které tvoří s P450 kovalentní adukty a inaktivují tak enzym. Druhým případem je tvorba komplexů mezi P450 a metabolity [76, 165]. Časově závislá inhibice aktivity CYP3A4 racemickým amlodipinem byla předpovězena teoreticky pomocí výpočtů a nyní je i dokázána experimenty *in vitro* popsány v této práci [185].

K porovnání reversibilní interakce molekul enantiomerů amlodipinu a molekuly CYP3A4 bylo použito i molekulové dokování. R- a S-AML byly navázány do aktivního místa enzymu. Výsledek potvrdil očekávanou odlišnou interakci enantiomerů v aktivním místě. Oba testované substráty, midazolam a testosteron, zaujímají pozici v aktivním místě tak, aby mohla proběhnout oxidace, tedy v blízkosti hemu umístěného na dně aktivního místa. Díky odlišnému prostorovému uspořádání se S-AML váže k hemu blíže než R-AML a brání tak přístupu těchto substrátů k místu oxidace.

S-AML je farmakologicky účinnou částí racemického léčiva amlodipinu. Použití čistého S-AML by přineslo několik výhod. Pacienti by byli vystaveni menší dávce a tedy i menší zátěži pro organismus a potencionálně by kleslo riziko lékových interakcí, zejména díky pak slabší inhibici aktivity P450. Terapeuticky neúčinný R-AML se choval jako silnější inhibitor CYP2C9, CYP2C19 (hodnoty IC_{50} až dvanáctkrát menší než pro S-AML) a dokonce silnější ireversibilní inhibitor CYP3A. Další fakt, mluvící ve prospěch enantiomerně čistého S-amlodipinu, je že R-AML odpovídá za nežádoucí účinky racemátu související s venodilatací [137]. Čistý S-AML se používá v některých asijských zemích, kde se podává v poloviční dávce a jeho bezpečnostní profil převyšuje racemát [138]. Zavedení S-AML pro terapii hypertenze na trh v Evropě i USA by bylo velmi přínosné.

Díky zajímavým výsledkům u amlodipinu a jeho schopnosti inhibovat aktivitu CYP2C9 a CYP2C19, bylo rozhodnuto použít oba enantiomery i jako modelová léčiva pro hodnocení inhibičního vlivu na cytochromy P450 se změněnou enzymovou aktivitou (Tabulka 5). Přibližně 40% cytochromů P450, které se účastní metabolismu léčiv, je totiž polymorfních [186]. Takzvaní extensivní a střední metabolizátoři jsou citlivější k lékovým interakcím způsobeným inhibicí P450. Z toho důvodu nás zajímaly také možné stereospecificky podmíněné rozdíly při inhibici aktivit odpovídajících pomalým, středním a extensivním metabolickým fenotypům CYP2C9 a CYP2C19. Předěšlá studie se již zabývala vlivem enantiomerů AML na různé genotypy CYP3A5, ale výsledky neukázaly žádné rozdíly mezi R- a S-AML [187]. To platí zřejmě i pro inhibici CYP2C. Experimenty neodhalily signifikantní rozdíly v inhibici aktivity u mikrosomů odpovídajících fenotypu extensivního nebo středního metabolizátora. Zjištěné hodnoty inhibičních konstant ovšem potvrdily enantiospecifickou inhibici, kde se opět R-AML ukázal jako silnější inhibitor. Přirozeně alely pro enzym s nulovou enzymovou aktivitou neprodukují žádné metabolity, a proto nebyla detekována ani žádná inhibice.

Výsledky této disertační práce potvrzují rozdílné farmakokinetické i farmakodynamické profily jednotlivých optických isomerů chirálních léčiv. Na jednotlivé enantiomery by mělo být pohlíženo jako na odlišné látky a měla by být brána v úvahu i stereospecifita lékových interakcí.

7. ZÁVĚRY

V této disertační práci byly hodnoceny interakce optických isomerů vybraných chirálních léčiv s nejvýznamnějšími enzymy metabolismu léčiv, s cytochromy P450. Experimenty byly provedeny *in vitro* v lidských jaterních mikrosomech a zjištěný inhibiční potenciál individuálních enantiomerů na enzymovou aktivitu devíti nejdůležitějších biotransformačních enzymů byl porovnán. Případná inhibice byla charakterizována pomocí inhibičních konstant, mechanismu inhibice a posouzení možné lékové interakce *in vivo*. Některé experimentálně získané výsledky byly ověřeny pomocí molekulového dokování (*in silico* metodami). V disertační práci byly také použity mikrosomy se specifickým genotypem, se změnou enzymovou aktivitou. Byl sledován vliv daného fenotypu na inhibici aktivit P450 působením vybraných enantiomerů.

Z výsledků jednotlivých experimentů vyplývají následující poznatky a závěry:

- Výsledky experimentů potvrdily rozdílné vlastnosti a interakce enantiomerů chirálních látek s cytochromy P450. Testované látky vykazovaly inhibici enzymových aktivit P450. Ve většině případů byly přítomny signifikantní stereospecifické rozdíly mezi jednotlivými optickými isomery jedné látky. Silnější inhibiční potenciál nelze přiřadit zpravidla jednomu či druhému optickému isomeru. Inhibiční účinek často nekoreloval s farmakologickým účinkem.
- Enzymová aktivita CYP3A byla inhibována většinou testovaných látek. Nejvýznamnější inhibice se projevila při interakci s *cis*-enantiomery ketokonazolu, *cis*-diastereoisomery itraconazolu, enantiomery tamsulosinu, tolterodinu, amlodipinu, benidipinu, felodipinu a isradipinu. Vypočítané

inhibiční konstanty K_i byly v rozsahu 0,022 (Itrakonazol-D) – 28 μM ((+)-felodipin).

- Inhibiční potenciál dvou *cis*-enantiomerů ketokonazolu na aktivitu CYP3A4 se lišil až pětinašobně a mezi čtyřmi testovanými diastereoisomery itrakonazolu byly až čtyřicetinásobné rozdíly v hodnotách K_i). Silnou reversibilní inhibici aktivity tohoto enzymu vykazovaly i oba enantiomery tamsulosinu, tolterodinu, benidipinu, felodipinu a isradipinu, přičemž pouze inhibiční síla enantiomerů isradipinu byla vyrovnaná. U ostatních byly nalezeny statisticky signifikantní rozdíly. R-tamsulosin působil jako silnější inhibitor než S-isomer, R-tolterodin než S-tolterodin, (+)-benidipin než (-)-benidipin a (-)-felodipin než (+)-felodipin. Amlodipin byl identifikován jako reversibilní inhibitor a zároveň i ireversibilní (časově závislý) inhibitor aktivity CYP3A4. S-amlodipin je silnějším reversibilním a R-amlodipin silnějším ireversibilním inhibitorem aktivity tohoto enzymu.
- Všechny *cis*-enantiomery ketokonazolu a *cis*-diastereoisomery itrakonazolu jsou silnými inhibitory CYP3A. Za určitých podmínek lze očekávat, že by i další testované látky mohly inhibovat enzymovou aktivitu CYP3A i *in vivo*. To platí zejména pro enantiomery amlodipinu, benidipinu, tamsulosinu a tolterodinu.
- Testované chirální látky itrakonazol a amlodipin by mohly být nahrazeny jejich čistými optickými isomery, (-)2S,4R,2'S-ITZ (ITZ-C) a S-amlodipinem. Jsou farmakologicky účinné a z hlediska inhibice CYP3A nepředstavují takové riziko.
- Významný inhibiční vliv testovaných látek na enzymové aktivity CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2D6 a CYP2E1 nebyl pozorován. Inhibice aktivity CYP2C19 se projevila u *cis*-enantiomerů ketokonazolu, ale s malými enantiospecifickými rozdíly. Naopak rozdíly byly přítomny u inhibice aktivity CYP2C9 a CYP2C19 dihydropyridinovými blokátory vápníkových kanálů.

R-AML byl 2krát silnější inhibitor CYP2C9 a 12krát silnější inhibitor CYP2C19 než S-AML. (-)-BEN měl 3krát vyšší inhibiční potenciál než (+)-BEN u CYP2C9. Oba (+)-FEL a (+)-ISR inhibovaly dvojnásobně víc aktivitu CYP2C19 než jejich (-)-formy.

- Citalopram, modafinil, zopiklon a jejich enantiomery neinhibovaly významně žádnou sledovanou enzymovou aktivitu P450.
- Metody molekulového dokování byly schopny simulovat vazbu jednotlivých optických isomerů v molekule enzymu. Potvrdily se enantiospecifické rozdíly v interakci enantiomerů amlodipinu a tamsulosinu nalezené *in vitro*. Molekulové dokování poskytlo vysvětlení pro odlišnou inhibici aktivity CYP3A při použití dvou odlišných specifických substrátů (testosteronu a midazolamu) enantiomery tamsulosinu. *In silico* metody podpořeny *in vitro* experimenty přinesly výhodné spojení a mohou tak nalézt uplatnění při predikci lékových interakcí a nežádoucích účinků v průběhu vývoje nových léčiv.
- Experimenty s lidskými jaterními mikrosomy odpovídajícími pomalému, střednímu a extensivnímu fenotypu CYP2C9 a CYP2C19 neodhalily na alele závislou inhibici R- a S- amlodipinem. Inhibiční konstanty potvrdily enantiospecifickou inhibici, kde R-AML vykazoval silnější inhibici CYP2C9 i CYP2C19 u fenotypu extensivního a středního metabolizátora. Enzymy s nulovou enzymovou aktivitou nevykazovaly žádnou inhibici.

8. SOUHRN

Cílem předložené disertační práce bylo zhodnotit interakce optických isomerů vybraných chirálních léčiv s devíti formami nejdůležitějšího enzymatického aparátu metabolismu cizorodých látek, s cytochromy P450. Hlavní příčinou lékových interakcí bývá inhibice enzymů P450, které jsou odpovědné za metabolickou eliminaci mnoha léčiv. Systematické studium inhibičního potenciálu léčiv je proto důležitou součástí jejich výzkumu.

První část práce byla zaměřena na schopnost vybraných chirálních léčiv ovlivnit enzymovou aktivitu devíti nejvýznamnějších biotransformačních enzymů cytochromů P450 a porovnat inhibiční potenciály jednotlivých enantiomerů. Byly studovány jednotlivé optické isomery léčiv ze skupiny azolových antimykotik, známé inhibitory CYP3A4; dále enantiomery racemických léčiv, která byla na trhu nahrazena samostatnými enantiomery; a látky ze skupiny dihydropyridinových blokátorů vápníkových kanálů. V další části práce bylo použito molekulové dokování k ověření vybraných naměřených výsledků. Posledním úkolem bylo vyhodnotit vliv enantiomerů modelového léčiva amlodipinu na změněnou enzymovou aktivitu CYP2C9 a CYP2C19 se specifickým genotypem.

Systematickým testováním vlivu jednotlivých enantiomerů na jednotlivé enzymové aktivity cytochromů P450 v lidských jaterních mikrosomech bylo zjištěno, že se ve většině případů liší jejich inhibiční potenciály. Nejvíce interakcí testovaných léčiv bylo popsáno s nejvýznamnějším cytochromem P450, CYP3A. Tento enzym byl inhibován všemi optickými isomery ketokonazolu a itrakonazolu, dále enantiomery tamsulosinu, tolterodinu a všemi testovanými dihydropyridinovými blokátory vápníkových kanálů. Přičemž inhibiční síla jednotlivých enantiomerů se mezi sebou významně lišila. U všech významných inhibicí byl charakterizován typ inhibice a byly stanoveny inhibiční konstanty K_i . Inhibice se projevila například i u CYP2C9, CYP2C19 u dihydropyridinů opět se signifikantními rozdíly mezi enantiomery.

Molekulové dokování bylo použito k vysvětlení rozdílu inhibičních potenciálů mezi enantiomery tamsulosinu na enzymovou aktivitu CYP3A. Byla simulována vazba těchto látek společně se dvěma typickými substráty, testosteronem a midazolamem.

Pomocí počítačové simulace se podařilo vysvětlit odlišné inhibiční potenciály obou enantiomerů vůči dvěma enzymovým substrátům. Jejich odlišné prostorové uspořádání způsobilo rozdílné bránění substrátů v přístupu k aktivnímu místu. Molekulové dokování bylo také použito k simulaci vazby enantiomerů amlodipinu do aktivního místa CYP3A4, kde se opět ukázala rozdílná vazba R- i S-amlodipinu.

Vzhledem ke schopnosti enantiomerů amlodipinu inhibovat CYP2C9 i CYP2C19, byly tyto látky použity k dalšímu experimentu. Hodnotil se jejich vliv na enzymovou aktivitu CYP2C9 a CYP2C19 s odlišným fenotypem, odpovídající pomalému, střednímu a extensivnímu metabolizátoru. Ukázalo se, že inhibice je na fenotypu nezávislá. Pouze se potvrdily enantiospecifické rozdíly v inhibici mezi dvěma enantiomery.

Z výsledků této práce vyplývá, jak je pro enzymovou inhibici důležité stereospecifické uspořádání zapojených struktur. Jednotlivé optické isomery léčiv mohou interagovat s cytochromy P450 odlišně a proto se často liší i ve své schopnosti inhibovat enzymové aktivity P450. Mají tedy rozdílný potenciál ke vzniku lékových interakcí na základě enzymové inhibice. Ve většině případů závisí farmakologický účinek pouze na jednom optickém isomeru, a proto je výhodné používat v klinické praxi pouze jeden enantiomer. Výhodou by byla snížená dávka léčiva, menší riziko vzniku nežádoucích účinků a lékových interakcí. Požadovaný terapeutický účinek léčiva by byl v každém případě zachován.

9. SUMMARY

The aim of this Thesis was to evaluate the interaction of optical isomers of chiral drugs with nine of the most important xenobiotic-metabolizing enzymes, cytochromes P450. A key cause of drug-drug interactions is the inhibition of cytochrome P450 enzymes that are responsible for elimination of many drugs. Screening for inhibition potency of P450 by drugs is an important part of drug research.

First part of the work was focused on the ability of chiral drugs to influence enzyme activity of nine most important cytochromes P450 involved in drug metabolism. The inhibition potency of individual enantiomers of one drug was compared. Optical isomers ofazole antifungal drugs, known CYP3A4 inhibitors; enantiopure drugs, their excluded enantiomer and racemate; and dihydropyridine calcium channel blockers were studied. Molecular docking was used to verify selected *in vitro* results. Last aim of this work was to evaluate the effect of enantiomers of model drug, amlodipine, on enzyme activity of CYP2C9 and CYP2C19 alleles corresponding to poor, intermediate and extensive activity.

Systematic testing of effect of individual enantiomers on enzyme activities of P450 in human liver microsomes revealed differences in the inhibition potency in most cases. Most interactions were with the most important form, CYP3A4. Its activity was significantly affected by optical isomers of ketoconazole, itraconazole, by enantiomers of tamsulosin, tolterodine, and by all tested dihydropyridine calcium channel blockers. The inhibition potency of enantiomers of individual drugs differed significantly. All significant inhibitions were characterised by mechanism of inhibition and inhibition constant K_i . Relevant inhibition with enantiospecific differences was found also with CYP2C9, CYP2C19 and dihydropyridine calcium channel blockers.

Molecular docking was used to explain the difference in the inhibition between tamsulosin enantiomers on CYP3A enzyme activity. Binding of these compounds was simulated with two typical substrates, testosterone and midazolam. Tamsulosin enantiomers showed different binding poses in the active site of CYP3A4 cavity explaining different inhibition potency towards enzyme activity measured by two different specific probes. Molecular docking was also used to simulate the binding of

the enantiomers of amlodipine to the CYP3A4 cavity, where different R- and S-amlodipine binding has again been demonstrated.

As they inhibit CYP2C9 and CYP2C19, amlodipine enantiomers were used for another experiment, assessing their effect on enzyme activity of CYP2C9 and CYP2C19 with phenotypes corresponding to poor, intermediate, and extensive metabolizer. Results revealed that the inhibition is phenotype independent. However, the enantioselective inhibition by these two enantiomers was confirmed.

The results of this work show the importance of stereoselective disposition for enzyme inhibition. Individual optical isomers of drugs may interact differently with cytochromes P450 and therefore their inhibition potency also differs. Therapeutic effect depends usually on one optical isomer. The clinical use of enantiopure drugs would be beneficial. The required therapeutic effect is retained but it allows lower dosage, fewer adverse effects and lower risk of drug-drug interactions.

SEZNAM LITERATURY

1. Munro, A.W., H.M. Girvan, a K.J. McLean, *Variations on a (t)heme--novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily*. Nat Prod Rep, 2007. 24(3): p. 585-609.
2. Ortiz de Montellano, P.R., *Cytochrome P450 : structure, mechanism, and biochemistry*. 4th edition. ed. 2015. xx, 689 pages.
3. Omura, T. a R. Sato, *The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature*. J Biol Chem, 1964. 239: p. 2370-8.
4. Cederbaum, A.I., *Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications*. Redox Biol, 2015. 4: p. 60-73.
5. Anzenbacher, P. a E. Anzenbacherova, *Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics*. Cell Mol Life Sci, 2001. 58(5-6): p. 737-47.
6. Anzenbacher, P. a U.M. Zanger, *Metabolism of drugs and other xenobiotics*. 2012, Weinheim: Wiley-VCH. xxix, 724 p.
7. Nelson, D.R., D.C. Zeldin, S.M. Hoffman, L.J. Maltais, H.M. Wain, a D.W. Nebert, *Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants*. Pharmacogenetics, 2004. 14(1): p. 1-18.
8. Nebert, D.W. a D.W. Russell, *Clinical importance of the cytochromes P450*. Lancet, 2002. 360(9340): p. 1155-62.
9. Zanger, U.M. a M. Schwab, *Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation*. Pharmacol Ther, 2013. 138(1): p. 103-41.
10. Belic, A., K. Toth, R. Vrzal, M. Temesvari, P. Porrogi, E. Orban, D. Rozman, Z. Dvorak, a K. Monostory, *Dehydroepiandrosterone post-transcriptionally modifies CYP1A2 induction involving androgen receptor*. Chem Biol Interact, 2013. 203(3): p. 597-603.
11. Klein, K., S. Winter, M. Turpeinen, M. Schwab, a U.M. Zanger, *Pathway-Targeted Pharmacogenomics of CYP1A2 in Human Liver*. Front Pharmacol, 2010. 1: p. 129.
12. Zhou, S.F., B. Wang, L.P. Yang, a J.P. Liu, *Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2*. Drug Metab Rev, 2010. 42(2): p. 268-354.
13. Hiemke, C. a S. Hartter, *Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors*. Pharmacol Ther, 2000. 85(1): p. 11-28.
14. Stiborova, M., K. Levova, F. Barta, Z. Shi, E. Frei, H.H. Schmeiser, D.W. Nebert, D.H. Phillips, a V.M. Arlt, *Bioactivation versus detoxication of the*

- urothelial carcinogen aristolochic acid I by human cytochrome P450 1A1 and 1A2*. Toxicol Sci, 2012. 125(2): p. 345-58.
15. Shimada, T., H. Yamazaki, M. Mimura, Y. Inui, a F.P. Guengerich, *Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. 270(1): p. 414-23.
 16. Ding, X. a L.S. Kaminsky, *Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003. 43: p. 149-73.
 17. Pelkonen, O., A. Rautio, H. Raunio, a M. Pasanen, *CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase*. Toxicology, 2000. 144(1-3): p. 139-47.
 18. Komatsu, T., H. Yamazaki, N. Shimada, M. Nakajima, a T. Yokoi, *Roles of cytochromes P450 1A2, 2A6, and 2C8 in 5-fluorouracil formation from tegafur, an anticancer prodrug, in human liver microsomes*. Drug Metab Dispos, 2000. 28(12): p. 1457-63.
 19. Di, Y.M., V.D. Chow, L.P. Yang, a S.F. Zhou, *Structure, function, regulation and polymorphism of human cytochrome P450 2A6*. Curr Drug Metab, 2009. 10(7): p. 754-80.
 20. Oscarson, M., R.A. McLellan, V. Asp, M. Ledesma, M.L. Bernal Ruiz, B. Sinues, A. Rautio, a M. Ingelman-Sundberg, *Characterization of a novel CYP2A7/CYP2A6 hybrid allele (CYP2A6*12) that causes reduced CYP2A6 activity*. Hum Mutat, 2002. 20(4): p. 275-83.
 21. Takeuchi, H., K. Saoo, M. Yokohira, M. Ikeda, H. Maeta, M. Miyazaki, H. Yamazaki, T. Kamataki, a K. Imaida, *Pretreatment with 8-methoxypsoralen, a potent human CYP2A6 inhibitor, strongly inhibits lung tumorigenesis induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in female A/J mice*. Cancer Res, 2003. 63(22): p. 7581-3.
 22. Zhang, W., T. Kilicarslan, R.F. Tyndale, a E.M. Sellers, *Evaluation of methoxsalen, tranylcypromine, and tryptamine as specific and selective CYP2A6 inhibitors in vitro*. Drug Metab Dispos, 2001. 29(6): p. 897-902.
 23. Faucette, S.R., H. Wang, G.A. Hamilton, S.L. Jolley, D. Gilbert, C. Lindley, B. Yan, M. Negishi, a E.L. LeCluyse, *Regulation of CYP2B6 in primary human hepatocytes by prototypical inducers*. Drug Metab Dispos, 2004. 32(3): p. 348-58.
 24. Zanger, U.M., M. Turpeinen, K. Klein, a M. Schwab, *Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation*. Anal Bioanal Chem, 2008. 392(6): p. 1093-108.
 25. Gandhi, M., R.M. Greenblatt, P. Bacchetti, C. Jin, Y. Huang, K. Anastos, M. Cohen, J.A. Dehovitz, G.B. Sharp, S.J. Gange, C. Liu, S.C. Hanson, B. Aouizerat, a H.I.V.S. Women's Interagency, *A single-nucleotide polymorphism in CYP2B6 leads to >3-fold increases in efavirenz concentrations in plasma and hair among HIV-infected women*. J Infect Dis, 2012. 206(9): p. 1453-61.

26. Helsby, N. a M. Tingle, *The importance of correct assignment of CYP2B6 genetic variants with respect to cyclophosphamide metabolizer status*. Am J Hematol, 2011. 86(4): p. 383-4; author reply 384.
27. Levran, O., E. Peles, S. Hamon, M. Randesi, M. Adelson, a M.J. Kreek, *CYP2B6 SNPs are associated with methadone dose required for effective treatment of opioid addiction*. Addict Biol, 2013. 18(4): p. 709-16.
28. Wienkers, L.C. a T.G. Heath, *Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data*. Nat Rev Drug Discov, 2005. 4(10): p. 825-33.
29. Kawakami, H., S. Ohtsuki, J. Kamiie, T. Suzuki, T. Abe, a T. Terasaki, *Simultaneous absolute quantification of 11 cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes by liquid chromatography tandem mass spectrometry with in silico target peptide selection*. J Pharm Sci, 2011. 100(1): p. 341-52.
30. Paine, M.F., H.L. Hart, S.S. Ludington, R.L. Haining, A.E. Rettie, a D.C. Zeldin, *The human intestinal cytochrome P450 "pie"*. Drug Metab Dispos, 2006. 34(5): p. 880-6.
31. Ferguson, S.S., Y. Chen, E.L. LeCluyse, M. Negishi, a J.A. Goldstein, *Human CYP2C8 is transcriptionally regulated by the nuclear receptors constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, glucocorticoid receptor, and hepatic nuclear factor 4alpha*. Mol Pharmacol, 2005. 68(3): p. 747-57.
32. Backman, J.T., A.M. Filppula, M. Niemi, a P.J. Neuvonen, *Role of Cytochrome P450 2C8 in Drug Metabolism and Interactions*. Pharmacol Rev, 2016. 68(1): p. 168-241.
33. Gerbal-Chaloin, S., J.M. Pascussi, L. Pichard-Garcia, M. Daujat, F. Waechter, J.M. Fabre, N. Carrere, a P. Maurel, *Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture*. Drug Metab Dispos, 2001. 29(3): p. 242-51.
34. Rahman, A., K.R. Korzekwa, J. Grogan, F.J. Gonzalez, a J.W. Harris, *Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8*. Cancer Res, 1994. 54(21): p. 5543-6.
35. Chen, Y. a J.A. Goldstein, *The transcriptional regulation of the human CYP2C genes*. Curr Drug Metab, 2009. 10(6): p. 567-78.
36. Higashi, M.K., D.L. Veenstra, L.M. Kondo, A.K. Wittkowsky, S.L. Srinouanprachanh, F.M. Farin, a A.E. Rettie, *Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy*. JAMA, 2002. 287(13): p. 1690-8.
37. Lee, H.I., J.W. Bae, C.I. Choi, Y.J. Lee, J.Y. Byeon, C.G. Jang, a S.Y. Lee, *Strongly increased exposure of meloxicam in CYP2C9*3/*3 individuals*. Pharmacogenet Genomics, 2014. 24(2): p. 113-7.
38. Lundblad, M.S., S. Ohlsson, P. Johansson, P. Lafolie, a E. Eliasson, *Accumulation of celecoxib with a 7-fold higher drug exposure in individuals homozygous for CYP2C9*3*. Clin Pharmacol Ther, 2006. 79(3): p. 287-8.
39. Van Booven, D., S. Marsh, H. McLeod, M.W. Carrillo, K. Sangkuhl, T.E. Klein, a R.B. Altman, *Cytochrome P450 2C9-CYP2C9*. Pharmacogenet Genomics, 2010. 20(4): p. 277-81.

40. Stamer, U.M. a F. Stuber, *Codeine and tramadol analgesic efficacy and respiratory effects are influenced by CYP2D6 genotype*. *Anaesthesia*, 2007. 62(12): p. 1294-5; author reply 1295-6.
41. Kirchheiner, J., K. Nickchen, M. Bauer, M.L. Wong, J. Licinio, I. Roots, a J. Brockmoller, *Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response*. *Mol Psychiatry*, 2004. 9(5): p. 442-73.
42. Gonzalez, F.J., *The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture. Cyp2e1*. *Drug Metab Dispos*, 2007. 35(1): p. 1-8.
43. Williams, J.A., B.J. Ring, V.E. Cantrell, D.R. Jones, J. Eckstein, K. Ruterbories, M.A. Hamman, S.D. Hall, a S.A. Wrighton, *Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7*. *Drug Metab Dispos*, 2002. 30(8): p. 883-91.
44. Hendrychova, T., E. Anzenbacherova, J. Hudecek, J. Skopalik, R. Lange, P. Hildebrandt, M. Otyepka, a P. Anzenbacher, *Flexibility of human cytochrome P450 enzymes: molecular dynamics and spectroscopy reveal important function-related variations*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1814(1): p. 58-68.
45. Ekroos, M. a T. Sjogren, *Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(37): p. 13682-7.
46. Kenworthy, K.E., J.C. Bloomer, S.E. Clarke, a J.B. Houston, *CYP3A4 drug interactions: correlation of 10 in vitro probe substrates*. *Br J Clin Pharmacol*, 1999. 48(5): p. 716-27.
47. Yano, J.K., M.R. Wester, G.A. Schoch, K.J. Griffin, C.D. Stout, a E.F. Johnson, *The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution*. *J Biol Chem*, 2004. 279(37): p. 38091-4.
48. Dresser, G.K., J.D. Spence, a D.G. Bailey, *Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition*. *Clin Pharmacokinet*, 2000. 38(1): p. 41-57.
49. Takeda, T., M. Hao, T. Cheng, S.H. Bryant, a Y. Wang, *Predicting drug-drug interactions through drug structural similarities and interaction networks incorporating pharmacokinetics and pharmacodynamics knowledge*. *J Cheminform*, 2017. 9: p. 16.
50. Tannenbaum, C. a N.L. Sheehan, *Understanding and preventing drug-drug and drug-gene interactions*. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2014. 7(4): p. 533-44.
51. Onakpoya, I.J., C.J. Heneghan, a J.K. Aronson, *Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature*. *BMC Med*, 2016. 14: p. 10.
52. Neuvonen, P.J., *Interactions with the absorption of tetracyclines*. *Drugs*, 1976. 11(1): p. 45-54.
53. Květina, J. a M. Grundmann, *Farmakologické interakce*. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2003. 1: p. 17-21.
54. Byrne, B.E., *Drug interactions: a review and update*. *Alpha Omegan*, 2003. 96(4): p. 10-7.

55. Dolovich, L., S. Gavura, a K. Pottie, *Hyperkalemia associated with spironolactone therapy*. Can Fam Physician, 2005. 51: p. 357-60.
56. Antoniou, T., K. Gough, D. Yoong, a G. Arbess, *Severe anemia secondary to a probable drug interaction between zidovudine and valproic acid*. Clin Infect Dis, 2004. 38(5): p. e38-40.
57. Combalbert, J., I. Fabre, G. Fabre, I. Dalet, J. Derancourt, J.P. Cano, a P. Maurel, *Metabolism of cyclosporin A. IV. Purification and identification of the rifampicin-inducible human liver cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) as a product of P450III_A gene subfamily*. Drug Metab Dispos, 1989. 17(2): p. 197-207.
58. Barone, G.W., B.J. Gurley, B.L. Ketel, M.L. Lightfoot, a S.R. Abul-Ezz, *Drug interaction between St. John's wort and cyclosporine*. Ann Pharmacother, 2000. 34(9): p. 1013-6.
59. Lin, H.L., U.M. Kent, a P.F. Hollenberg, *Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 3A4 by 17 alpha-ethynylestradiol: evidence for heme destruction and covalent binding to protein*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. 301(1): p. 160-7.
60. Bolt, H.M., M. Bolt, a H. Kappus, *Interaction of rifampicin treatment with pharmacokinetics and metabolism of ethinyloestradiol in man*. Acta Endocrinol (Copenh), 1977. 85(1): p. 189-197.
61. Zhou, H.H., L.B. Anthony, A.J. Wood, a G.R. Wilkinson, *Induction of polymorphic 4'-hydroxylation of S-mephenytoin by rifampicin*. Br J Clin Pharmacol, 1990. 30(3): p. 471-5.
62. Slattery, J.T., S.D. Nelson, a K.E. Thummel, *The complex interaction between ethanol and acetaminophen*. Clin Pharmacol Ther, 1996. 60(3): p. 241-6.
63. Tran, J.Q., S.J. Kovacs, T.S. McIntosh, H.M. Davis, a D.E. Martin, *Morning spot and 24-hour urinary 6 beta-hydroxycortisol to cortisol ratios: intraindividual variability and correlation under basal conditions and conditions of CYP 3A4 induction*. J Clin Pharmacol, 1999. 39(5): p. 487-94.
64. Hukkanen, J., *Induction of cytochrome P450 enzymes: a view on human in vivo findings*. Expert Rev Clin Pharmacol, 2012. 5(5): p. 569-85.
65. Nebert, D.W., T.P. Dalton, A.B. Okey, a F.J. Gonzalez, *Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer*. J Biol Chem, 2004. 279(23): p. 23847-50.
66. McIntosh, B.E., J.B. Hogenesch, a C.A. Bradfield, *Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation*. Annu Rev Physiol, 2010. 72: p. 625-45.
67. Kojima, K., K. Nagata, T. Matsubara, a Y. Yamazoe, *Broad but distinct role of pregnane x receptor on the expression of individual cytochrome p450s in human hepatocytes*. Drug Metab Pharmacokinet, 2007. 22(4): p. 276-86.
68. Kliewer, S.A., B. Goodwin, a T.M. Willson, *The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism*. Endocr Rev, 2002. 23(5): p. 687-702.
69. Nishimura, M., S. Naito, a T. Yokoi, *Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies*. Drug Metab Pharmacokinet, 2004. 19(2): p. 135-49.

70. Tolson, A.H. a H. Wang, *Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. 62(13): p. 1238-49.
71. Honig, P.K., D.C. Wortham, K. Zamani, D.P. Conner, J.C. Mullin, a L.R. Cantilena, *Terfenadine-ketoconazole interaction. Pharmacokinetic and electrocardiographic consequences*. JAMA, 1993. 269(12): p. 1513-8.
72. Lin, J.H. a A.Y. Lu, *Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications*. Clin Pharmacokinet, 1998. 35(5): p. 361-90.
73. Segel, I.H., *Enzyme kinetics : behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems*. 1993, New York: Wiley. xxii, 957 p.
74. Cornish-Bowden, A., *Fundamentals of enzyme kinetics*. 4th, completely revised and greatly enlarged edition. ed. 2012, Weinheim, Germany: Wiley-Blackwell. xviii, 498 pages.
75. Kamel, A. a S. Harriman, *Inhibition of cytochrome P450 enzymes and biochemical aspects of mechanism-based inactivation (MBI)*. Drug Discov Today Technol, 2013. 10(1): p. e177-89.
76. Riley, R.J., K. Grime, a R. Weaver, *Time-dependent CYP inhibition*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2007. 3(1): p. 51-66.
77. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, a L. Stryer, *Biochemistry*. 7th ed. 2012, New York: W.H. Freeman. xxxii, 1054, 43, 41, 48 p.
78. Lee, C.R., J.A. Goldstein, a J.A. Pieper, *Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data*. Pharmacogenetics, 2002. 12(3): p. 251-63.
79. Hulot, J.S., A. Bura, E. Villard, M. Azizi, V. Remones, C. Goyenvalle, M. Aiach, P. Lechat, a P. Gaussem, *Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects*. Blood, 2006. 108(7): p. 2244-7.
80. Johansson, I., E. Lundqvist, L. Bertilsson, M.L. Dahl, F. Sjoqvist, a M. Ingelman-Sundberg, *Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(24): p. 11825-9.
81. Zhou, S.F., *Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: part II*. Clin Pharmacokinet, 2009. 48(12): p. 761-804.
82. Izzedine, H., J.S. Hulot, E. Villard, C. Goyenvalle, S. Dominguez, J. Ghosn, M.A. Valantin, P. Lechat, a A.G. Deray, *Association between ABCC2 gene haplotypes and tenofovir-induced proximal tubulopathy*. J Infect Dis, 2006. 194(11): p. 1481-91.
83. Ai, N., X. Fan, a S. Ekins, *In silico methods for predicting drug-drug interactions with cytochrome P-450s, transporters and beyond*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. 86: p. 46-60.
84. Agency, E.M., *Guideline on the investigation of drug interactions*. 2012: London.

85. *Guidance for industry drug interaction studies — study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations.*, F.a.D. Administration, Editor. 2012.
86. McNaught, A.D., A. Wilkinson, a International Union of Pure and Applied Chemistry., *Compendium of chemical terminology : IUPAC recommendations*. 2nd ed. 1997, Oxford England ; Malden, MA, USA: Blackwell Science. vii, 450 p.
87. Smith, S.W., *Chiral toxicology: it's the same thing...only different*. Toxicol Sci, 2009. 110(1): p. 4-30.
88. Campo, V.L., L.S. Bernardes, a I. Carvalho, *Stereoselectivity in drug metabolism: molecular mechanisms and analytical methods*. Curr Drug Metab, 2009. 10(2): p. 188-205.
89. Jones, D.R., S.Y. Kim, G. Boysen, C.H. Yun, a G.P. Miller, *Contribution of three CYP3A isoforms to metabolism of R- and S-warfarin*. Drug Metab Lett, 2010. 4(4): p. 213-9.
90. Goodman, L.S., L.L. Brunton, B. Chabner, a B.r.C. Knollmann, *Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. 12th ed. 2011, New York: McGraw-Hill. 2084 p.
91. Stoschitzky, K., G. Koshucharova, P. Lercher, R. Maier, A. Sakotnik, W. Klein, P.M. Liebmann, a W. Lindner, *Stereoselective effects of (R)- and (S)-carvedilol in humans*. Chirality, 2001. 13(7): p. 342-6.
92. Yoon, J.S., D.C. Jeong, J.W. Oh, K.Y. Lee, H.S. Lee, Y.Y. Koh, J.T. Kim, J.H. Kang, a J.S. Lee, *The effects and safety of dexibuprofen compared with ibuprofen in febrile children caused by upper respiratory tract infection*. Br J Clin Pharmacol, 2008. 66(6): p. 854-60.
93. Chhabra, N., M.L. Aseri, a D. Padmanabhan, *A review of drug isomerism and its significance*. Int J Appl Basic Med Res, 2013. 3(1): p. 16-8.
94. Izake, E.L., *Chiral discrimination and enantioselective analysis of drugs: an overview*. J Pharm Sci, 2007. 96(7): p. 1659-76.
95. Dickerson, R.E., H.R. Drew, B.N. Conner, R.M. Wing, A.V. Fratini, a M.L. Kopka, *The anatomy of A-, B-, and Z-DNA*. Science, 1982. 216(4545): p. 475-85.
96. Eriksson, T., S. Bjorkman, B. Roth, A. Fyge, a P. Hoglund, *Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide*. Chirality, 1995. 7(1): p. 44-52.
97. Abelo, A., T.B. Andersson, M. Antonsson, A.K. Naudot, I. Skanberg, a L. Weidolf, *Stereoselective metabolism of omeprazole by human cytochrome P450 enzymes*. Drug Metab Dispos, 2000. 28(8): p. 966-72.
98. Kroemer, H.K., C. Fischer, C.O. Meese, a M. Eichelbaum, *Enantiomer/enantiomer interaction of (S)- and (R)-propafenone for cytochrome P450IID6-catalyzed 5-hydroxylation: in vitro evaluation of the mechanism*. Mol Pharmacol, 1991. 40(1): p. 135-42.
99. Gibaldi, M., *Stereoselective and isozyme-selective drug interactions*. Chirality, 1993. 5(6): p. 407-13.

100. Lewis, R.J., W.F. Trager, K.K. Chan, A. Breckenridge, M. Orme, M. Roland, a W. Schary, *Warfarin. Stereochemical aspects of its metabolism and the interaction with phenylbutazone*. J Clin Invest, 1974. 53(6): p. 1607-17.
101. Toon, S., K.J. Hopkins, F.M. Garstang, L. Aarons, A. Sedman, a M. Rowland, *Enoxacin-warfarin interaction: pharmacokinetic and stereochemical aspects*. Clin Pharmacol Ther, 1987. 42(1): p. 33-41.
102. Somogyi, A. a R. Gugler, *Drug interactions with cimetidine*. Clin Pharmacokinet, 1982. 7(1): p. 23-41.
103. Heimark, L.D., L. Wienkers, K. Kunze, M. Gibaldi, A.C. Eddy, W.F. Trager, R.A. O'Reilly, a D.A. Goulart, *The mechanism of the interaction between amiodarone and warfarin in humans*. Clin Pharmacol Ther, 1992. 51(4): p. 398-407.
104. Shin, J.G., K. Kane, a D.A. Flockhart, *Potent inhibition of CYP2D6 by haloperidol metabolites: stereoselective inhibition by reduced haloperidol*. Br J Clin Pharmacol, 2001. 51(1): p. 45-52.
105. Lutz, J.D., B.M. VandenBrink, K.N. Babu, W.L. Nelson, K.L. Kunze, a N. Isoherranen, *Stereoselective inhibition of CYP2C19 and CYP3A4 by fluoxetine and its metabolite: implications for risk assessment of multiple time-dependent inhibitor systems*. Drug Metab Dispos, 2013. 41(12): p. 2056-65.
106. Li, X.Q., T.B. Andersson, M. Ahlstrom, a L. Weidolf, *Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome P450 activities*. Drug Metab Dispos, 2004. 32(8): p. 821-7.
107. Sakaeda, T., H. Fujino, C. Komoto, M. Kakumoto, J.S. Jin, K. Iwaki, K. Nishiguchi, T. Nakamura, N. Okamura, a K. Okumura, *Effects of acid and lactone forms of eight HMG-CoA reductase inhibitors on CYP-mediated metabolism and MDR1-mediated transport*. Pharm Res, 2006. 23(3): p. 506-12.
108. Venkatakrisnan, K., L.L. von Moltke, a D.J. Greenblatt, *Effects of the antifungal agents on oxidative drug metabolism: clinical relevance*. Clin Pharmacokinet, 2000. 38(2): p. 111-80.
109. Gubbins, P.O. a S. Heldenbrand, *Clinically relevant drug interactions of current antifungal agents*. Mycoses, 2010. 53(2): p. 95-113.
110. Rotstein, D.M., D.J. Kertesz, K.A. Walker, a D.C. Swinney, *Stereoisomers of ketoconazole: preparation and biological activity*. J Med Chem, 1992. 35(15): p. 2818-25.
111. Dilmaghalian, S., J.G. Gerber, S.G. Filler, A. Sanchez, a J. Gal, *Enantioselectivity of inhibition of cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) by ketoconazole: Testosterone and methadone as substrates*. Chirality, 2004. 16(2): p. 79-85.
112. Novotna, A., M. Korhonova, I. Bartonkova, A.A. Soshilov, M.S. Denison, K. Bogdanova, M. Kolar, P. Bednar, a Z. Dvorak, *Enantiospecific effects of ketoconazole on aryl hydrocarbon receptor*. PLoS One, 2014. 9(7): p. e101832.

113. Nett, J.E. a D.R. Andes, *Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications*. Infect Dis Clin North Am, 2016. 30(1): p. 51-83.
114. Florea, N.R., B. Capitano, C.H. Nightingale, D. Hull, G.J. Leitz, a D.P. Nicolau, *Beneficial pharmacokinetic interaction between cyclosporine and itraconazole in renal transplant recipients*. Transplant Proc, 2003. 35(8): p. 2873-7.
115. Mahnke, C.B., R.M. Sutton, R. Venkataramanan, M. Michaels, G. Kurland, G.J. Boyle, Y.M. Law, S.A. Miller, F.A. Pigula, S. Gandhi, a S.A. Webber, *Tacrolimus dosage requirements after initiation of azole antifungal therapy in pediatric thoracic organ transplantation*. Pediatr Transplant, 2003. 7(6): p. 474-8.
116. Niwa, T., Y. Imagawa, a H. Yamazaki, *Drug interactions between nine antifungal agents and drugs metabolized by human cytochromes P450*. Curr Drug Metab, 2014. 15(7): p. 651-79.
117. Kunze, K.L., W.L. Nelson, E.D. Kharasch, K.E. Thummel, a N. Isoherranen, *Stereochemical aspects of itraconazole metabolism in vitro and in vivo*. Drug Metab Dispos, 2006. 34(4): p. 583-90.
118. Stepankova, M., B. Pastorkova, P. Bachleda, a Z. Dvorak, *Itraconazole cis-diastereoisomers activate aryl hydrocarbon receptor AhR and pregnane X receptor PXR and induce CYP1A1 in human cell lines and human hepatocytes*. Toxicology, 2017. 383: p. 40-49.
119. Agranat, I., H. Caner, a J. Caldwell, *Putting chirality to work: the strategy of chiral switches*. Nat Rev Drug Discov, 2002. 1(10): p. 753-68.
120. Nunez, M.C., M.E. Garcia-Rubino, A. Conejo-Garcia, O. Cruz-Lopez, M. Kimatrai, M.A. Gallo, A. Espinosa, a J.M. Campos, *Homochiral drugs: a demanding tendency of the pharmaceutical industry*. Curr Med Chem, 2009. 16(16): p. 2064-74.
121. Franco-Salinas, G., J.J. de la Rosette, a M.C. Michel, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tamsulosin in its modified-release and oral controlled absorption system formulations*. Clin Pharmacokinet, 2010. 49(3): p. 177-88.
122. Troost, J., S. Tatami, Y. Tsuda, M. Mattheus, L. Mehlburger, M. Wein, a M.C. Michel, *Effects of strong CYP2D6 and 3A4 inhibitors, paroxetine and ketoconazole, on the pharmacokinetics and cardiovascular safety of tamsulosin*. Br J Clin Pharmacol, 2011. 72(2): p. 247-56.
123. Kamimura, H., S. Oishi, H. Matsushima, T. Watanabe, S. Higuchi, M. Hall, S.G. Wood, a L.F. Chasseaud, *Identification of cytochrome P450 isozymes involved in metabolism of the alpha1-adrenoceptor blocker tamsulosin in human liver microsomes*. Xenobiotica, 1998. 28(10): p. 909-22.
124. Sun, F., C. Sui, Y. Zhou, X. Liu, Y. Shi, Y. Wu, a Y. Li, *Preparation, characterization and pharmacological evaluation of tolterodine hydrogels for the treatment of overactive bladder*. Int J Pharm, 2013. 454(1): p. 532-8.
125. Sanchez, C., *The pharmacology of citalopram enantiomers: the antagonism by R-citalopram on the effect of S-citalopram*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2006. 99(2): p. 91-5.

126. Kingback, M., B. Carlsson, J. Ahlner, F. Bengtsson, a F.C. Kugelberg, *Cytochrome P450-dependent disposition of the enantiomers of citalopram and its metabolites: in vivo studies in Sprague-Dawley and Dark Agouti rats*. Chirality, 2011. 23(2): p. 172-7.
127. Noehr-Jensen, L., S.T. Zwisler, F. Larsen, S.H. Sindrup, P. Damkier, a K. Brosen, *Escitalopram is a weak inhibitor of the CYP2D6-catalyzed O-demethylation of (+)-tramadol but does not reduce the hypoalgesic effect in experimental pain*. Clin Pharmacol Ther, 2009. 86(6): p. 626-33.
128. Greenblatt, D.J. a G.K. Zammit, *Pharmacokinetic evaluation of eszopiclone: clinical and therapeutic implications*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012. 8(12): p. 1609-18.
129. Becquemont, L., S. Mouajjah, O. Escaffre, P. Beaune, C. Funck-Brentano, a P. Jaillon, *Cytochrome P-450 3A4 and 2C8 are involved in zopiclone metabolism*. Drug Metab Dispos, 1999. 27(9): p. 1068-73.
130. Huedo-Medina, T.B., I. Kirsch, J. Middlemass, M. Klonizakis, a A.N. Siriwardena, *Effectiveness of non-benzodiazepine hypnotics in treatment of adult insomnia: meta-analysis of data submitted to the Food and Drug Administration*. BMJ, 2012. 345: p. e8343.
131. Schaller, B., *Zopiclone: some remarks on pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Swiss Med Wkly, 2003. 133(5-6): p. 100.
132. Robertson, P., H.H. DeCory, A. Madan, a A. Parkinson, *In vitro inhibition and induction of human hepatic cytochrome P450 enzymes by modafinil*. Drug Metab Dispos, 2000. 28(6): p. 664-71.
133. Robertson, P., Jr. a E.T. Hellriegel, *Clinical pharmacokinetic profile of modafinil*. Clin Pharmacokinet, 2003. 42(2): p. 123-37.
134. Darwish, M., M. Kirby, P. Robertson, Jr., a E.T. Hellriegel, *Interaction profile of armodafinil with medications metabolized by cytochrome P450 enzymes 1A2, 3A4 and 2C19 in healthy subjects*. Clin Pharmacokinet, 2008. 47(1): p. 61-74.
135. Krasulova, K., M. Siller, O. Holas, Z. Dvorak, a P. Anzenbacher, *Enantiospecific effects of chiral drugs on cytochrome P450 inhibition in vitro*. Xenobiotica, 2016. 46(4): p. 315-24.
136. Jeffers, B.W., J. Robbins, R. Bhambri, a D. Wajsbrot, *A Systematic Review on the Efficacy of Amlodipine in the Treatment of Patients With Hypertension With Concomitant Diabetes Mellitus and/or Renal Dysfunction, When Compared With Other Classes of Antihypertensive Medication*. Am J Ther, 2015. 22(5): p. 322-41.
137. Adik-Pathak, L., *Chiral molecules in hypertension: focus on S-amlodipine*. J Assoc Physicians India, 2004. 52: p. 187-8.
138. Galappaththy, P., Y.C. Waniganayake, M.I. Sabeer, T.J. Wijethunga, G.K. Galappaththy, a R.A. Ekanayaka, *Leg edema with (S)-amlodipine vs conventional amlodipine given in triple therapy for hypertension: a randomized double blind controlled clinical trial*. BMC Cardiovasc Disord, 2016. 16(1): p. 168.

139. Harmsze, A.M., K. Robijns, J.W. van Werkum, N.J. Breet, C.M. Hackeng, J.M. Ten Berg, H.J. Ruven, O.H. Klungel, A. de Boer, a V.H. Deneer, *The use of amlodipine, but not of P-glycoprotein inhibiting calcium channel blockers is associated with clopidogrel poor-response*. *Thromb Haemost*, 2010. 103(5): p. 920-5.
140. Nishio, S., H. Watanabe, K. Kosuge, S. Uchida, H. Hayashi, a K. Ohashi, *Interaction between amlodipine and simvastatin in patients with hypercholesterolemia and hypertension*. *Hypertens Res*, 2005. 28(3): p. 223-7.
141. Muto, K., T. Kuroda, H. Kawato, A. Karasawa, K. Kubo, a N. Nakamizo, *Synthesis and pharmacological activity of stereoisomers of 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridine-dicarboxylic acid methyl 1-(phenylmethyl)-3-piperidinyl ester*. *Arzneimittelforschung*, 1988. 38(11A): p. 1662-5.
142. Katoh, M., M. Nakajima, N. Shimada, H. Yamazaki, a T. Yokoi, *Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by 1,4-dihydropyridine calcium antagonists: prediction of in vivo drug-drug interactions*. *Eur J Clin Pharmacol*, 2000. 55(11-12): p. 843-52.
143. Eltze, M., R. Boer, K.H. Sanders, H. Boss, W.R. Ulrich, a D. Flockerzi, *Stereoselective inhibition of thromboxane-induced coronary vasoconstriction by 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonists*. *Chirality*, 1990. 2(4): p. 233-40.
144. Ma, B., T. Prueksaritanont, a J.H. Lin, *Drug interactions with calcium channel blockers: possible involvement of metabolite-intermediate complexation with CYP3A*. *Drug Metab Dispos*, 2000. 28(2): p. 125-30.
145. Ruegg, U.T. a R.P. Hof, *Pharmacology of the calcium antagonist isradipine*. *Drugs*, 1990. 40 Suppl 2: p. 3-9.
146. Stepankova, M., K. Krasulova, A. Doricakova, O. Kurka, P. Anzenbacher, a Z. Dvorak, *Optical isomers of dihydropyridine calcium channel blockers display enantiospecific effects on the expression and enzyme activities of human xenobiotics-metabolizing cytochromes P450*. *Toxicol Lett*, 2016. 262: p. 173-186.
147. Chang, T.K. a D.J. Waxman, *Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 with 7-ethoxyresorufin as substrate*. *Methods Mol Biol*, 1998. 107: p. 103-9.
148. Waxman, D.J. a T.K. Chang, *Spectrofluorometric analysis of CYP2A6-catalyzed coumarin 7-hydroxylation*. *Methods Mol Biol*, 1998. 107: p. 111-6.
149. Morse, M.A. a J. Lu, *High-performance liquid chromatographic method for measurement of cytochrome P450-mediated metabolism of 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998. 708(1-2): p. 290-3.
150. Crespi, C.L., T.K. Chang, a D.J. Waxman, *High-performance liquid chromatography analysis of CYP2C8-catalyzed paclitaxel 6alpha-hydroxylation*. *Methods Mol Biol*, 2006. 320: p. 103-7.

151. Crespi, C.L., T.K. Chang, a D.J. Waxman, *Determination of CYP2C9-catalyzed diclofenac 4'-hydroxylation by high-performance liquid chromatography*. *Methods Mol Biol*, 1998. 107: p. 129-33.
152. <http://cypex.co.uk/2c19info.htm>. 2015 [cited 2017 17.07.].
153. Crespi, C.L., T.K. Chang, a D.J. Waxman, *CYP2D6-dependent bufuralol 1'-hydroxylation assayed by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. *Methods Mol Biol*, 1998. 107: p. 141-5.
154. Lucas, D., J.F. Menez, a F. Berthou, *Chlorzoxazone: an in vitro and in vivo substrate probe for liver CYP2E1*. *Methods Enzymol*, 1996. 272: p. 115-23.
155. Guengerich, F.P., M.V. Martin, P.H. Beaune, P. Kremers, T. Wolff, a D.J. Waxman, *Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism*. *J Biol Chem*, 1986. 261(11): p. 5051-60.
156. Kronbach, T., D. Mathys, M. Umeno, F.J. Gonzalez, a U.A. Meyer, *Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4*. *Mol Pharmacol*, 1989. 36(1): p. 89-96.
157. Chauret, N., A. Gauthier, a D.A. Nicoll-Griffith, *Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes*. *Drug Metab Dispos*, 1998. 26(1): p. 1-4.
158. Copeland, R.A. *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. 2000; 2nd Edition: [
159. Grimm, S.W., H.J. Einolf, S.D. Hall, K. He, H.K. Lim, K.H. Ling, C. Lu, A.A. Nomeir, E. Seibert, K.W. Skordos, G.R. Tonn, R. Van Horn, R.W. Wang, Y.N. Wong, T.J. Yang, a R.S. Obach, *The conduct of in vitro studies to address time-dependent inhibition of drug-metabolizing enzymes: a perspective of the pharmaceutical research and manufacturers of America*. *Drug Metab Dispos*, 2009. 37(7): p. 1355-70.
160. Berry, L.M. a Z. Zhao, *An examination of IC50 and IC50-shift experiments in assessing time-dependent inhibition of CYP3A4, CYP2D6 and CYP2C9 in human liver microsomes*. *Drug Metab Lett*, 2008. 2(1): p. 51-9.
161. Burt, H.J., A. Galetin, a J.B. Houston, *IC50-based approaches as an alternative method for assessment of time-dependent inhibition of CYP3A4*. *Xenobiotica*, 2010. 40(5): p. 331-43.
162. Lu, H., *Stereoselectivity in drug metabolism*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2007. 3(2): p. 149-58.
163. Rendic, S., V. Sunjic, R. Toso, F. Kajfez, a H.H. Ruf, *Interaction of cimetidine with liver microsomes*. *Xenobiotica*, 1979. 9(9): p. 555-64.
164. Puurunen, J. a O. Pelkonen, *Cimetidine inhibits microsomal drug metabolism in the rat*. *Eur J Pharmacol*, 1979. 55(3): p. 335-6.
165. Fowler, S. a H. Zhang, *In vitro evaluation of reversible and irreversible cytochrome P450 inhibition: current status on methodologies and their utility for predicting drug-drug interactions*. *AAPS J*, 2008. 10(2): p. 410-24.

166. Greenblatt, D.J., K. Venkatakrishnan, J.S. Harmatz, S.J. Parent, a L.L. von Moltke, *Sources of variability in ketoconazole inhibition of human cytochrome P450 3A in vitro*. *Xenobiotica*, 2010. 40(10): p. 713-20.
167. Novotna, A., K. Krasulova, I. Bartonkova, M. Korhonova, P. Bachleda, P. Anzenbacher, a Z. Dvorak, *Dual effects of ketoconazole cis-enantiomers on CYP3A4 in human hepatocytes and HepG2 Cells*. *PLoS One*, 2014. 9(10): p. e111286.
168. Isoherranen, N., K.L. Kunze, K.E. Allen, W.L. Nelson, a K.E. Thummel, *Role of itraconazole metabolites in CYP3A4 inhibition*. *Drug Metab Dispos*, 2004. 32(10): p. 1121-31.
169. Koch, P., R.F.J. Rossi, C. Sennayake, a S.A. Wald, *2R, 4S-Hydroxyitraconazole isomers*, I. Sepracor, Editor. 2000, Sepracor, Inc.
170. Galetin, A., K. Ito, D. Hallifax, a J.B. Houston, *CYP3A4 substrate selection and substitution in the prediction of potential drug-drug interactions*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 314(1): p. 180-90.
171. Greenblatt, D.J., Y. Zhao, K. Venkatakrishnan, S.X. Duan, J.S. Harmatz, S.J. Parent, M.H. Court, a L.L. von Moltke, *Mechanism of cytochrome P450-3A inhibition by ketoconazole*. *J Pharm Pharmacol*, 2011. 63(2): p. 214-21.
172. Hammond, K.P., C. Nielsen, S.A. Linnebur, J.A. Langness, G. Ray, P. Maroni, a J.J. Kiser, *Priapism induced by boceprevir-CYP3A4 inhibition and alpha-adrenergic blockade: case report*. *Clin Infect Dis*, 2014. 58(1): p. e35-8.
173. Korstanje, C., W. Krauwinkel, a F.L. van Doesum-Wolters, *Tamsulosin shows a higher unbound drug fraction in human prostate than in plasma: a basis for uroselectivity?* *Br J Clin Pharmacol*, 2011. 72(2): p. 218-25.
174. von Moltke, L.L., D.J. Greenblatt, G.M. Giancarlo, B.W. Granda, J.S. Harmatz, a R.I. Shader, *Escitalopram (S-citalopram) and its metabolites in vitro: cytochromes mediating biotransformation, inhibitory effects, and comparison to R-citalopram*. *Drug Metab Dispos*, 2001. 29(8): p. 1102-9.
175. Pastoor, D. a J. Gobburu, *Clinical pharmacology review of escitalopram for the treatment of depression*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2014. 10(1): p. 121-8.
176. Kim, W., A. Tateno, R. Arakawa, T. Sakayori, Y. Ikeda, H. Suzuki, a Y. Okubo, *In vivo activity of modafinil on dopamine transporter measured with positron emission tomography and [(1)(8)F]FE-PE2I*. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2014. 17(5): p. 697-703.
177. Jalava, K.M., K.T. Olkkola, a P.J. Neuvonen, *Effect of itraconazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of zopiclone*. *Eur J Clin Pharmacol*, 1996. 51(3-4): p. 331-4.
178. Weinstock, R.J. a M.P. Johnson, *Review of Top 10 Prescribed Drugs and Their Interaction with Dental Treatment*. *Dent Clin North Am*, 2016. 60(2): p. 421-34.
179. Zhou, Y.T., L.S. Yu, S. Zeng, Y.W. Huang, H.M. Xu, a Q. Zhou, *Pharmacokinetic drug-drug interactions between 1,4-dihydropyridine calcium channel blockers and statins: factors determining interaction strength and relevant clinical risk management*. *Ther Clin Risk Manag*, 2014. 10: p. 17-26.

180. Guengerich, F.P., W.R. Brian, M. Iwasaki, M.A. Sari, C. Baarnhielm, a P. Berntsson, *Oxidation of dihydropyridine calcium channel blockers and analogues by human liver cytochrome P-450 IIIA4*. J Med Chem, 1991. 34(6): p. 1838-44.
181. Jalava, K.M., K.T. Olkkola, a P.J. Neuvonen, *Itraconazole greatly increases plasma concentrations and effects of felodipine*. Clin Pharmacol Ther, 1997. 61(4): p. 410-5.
182. Shimada, S., Y. Nakajima, K. Yamamoto, Y. Sawada, a T. Iga, *Comparative pharmacodynamics of eight calcium channel blocking agents in Japanese essential hypertensive patients*. Biol Pharm Bull, 1996. 19(3): p. 430-7.
183. Snyder, B.D., A. Rowland, T.M. Polasek, J.O. Miners, a M.P. Doogue, *Evaluation of felodipine as a potential perpetrator of pharmacokinetic drug-drug interactions*. Eur J Clin Pharmacol, 2014. 70(9): p. 1115-22.
184. Wang, Y.C., T.C. Hsieh, C.L. Chou, J.L. Wu, a T.C. Fang, *Risks of Adverse Events Following Coprescription of Statins and Calcium Channel Blockers: A Nationwide Population-Based Study*. Medicine (Baltimore), 2016. 95(2): p. e2487.
185. Jones, D.R., S. Ekins, L. Li, a S.D. Hall, *Computational approaches that predict metabolic intermediate complex formation with CYP3A4 (+b5)*. Drug Metab Dispos, 2007. 35(9): p. 1466-75.
186. Ingelman-Sundberg, M., M. Oscarson, a R.A. McLellan, *Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment*. Trends Pharmacol Sci, 1999. 20(8): p. 342-9.
187. Kim, K.A., P.W. Park, a J.Y. Park, *Effect of cytochrome P450 3A5*3 genotype on the stereoselective pharmacokinetics of amlodipine in healthy subjects*. Chirality, 2009. 21(5): p. 485-91.

10. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

1. Práce související s disertační prací

- Původní vědecké publikace v časopisech s IF:

Novotná A*, Krasulová K*, Bartoňková I, Korhoňová M, Bachleda P, Anzenbacher A, Dvořák Z. (2014) Dual Effects of Ketoconazole cis-Enantiomers on CYP3A4 in Human Hepatocytes and HepG2 Cells. PLoS ONE 9(10): e111286

**Sdílené prvoautorství*

Krasulová K, Siller M, Holas O, Dvořák Z, Anzenbacher P. (2015) Effects of chiral drugs on cytochrome P450 inhibition *in vitro*. Xenobiotica 4:1-10

Štěpánková M, Krasulová K, Dořičáková A, Kurka O, Anzenbacher P, Dvořák Z (2016): Optical isomers of dihydropyridine calcium channel blockers display enantiospecific effects on the expression and enzyme activities of human xenobiotics-metabolizing cytochromes P450. Toxicology Letters 262 173-186

Krasulová K, Holas O, Anzenbacher A. (2017) Influence of amlodipine enantiomers on human microsomal cytochromes P450: Stereospecific time-dependent inhibition of CYP3A and effects on different CYP2C9 and CYP2C19 genotypes. Bylo zasláno do Drug Metab Dispos 25. 8. 2017.

2. Ostatní publikace s tématem metabolismu xenobiotik

Kopečná Zapletalová M*, Krasulová K*, Anzenbacher P, Hodek P, Anzenbacherová E (2017) Interaction of isoflavonoids with human liver microsomal cytochromes P450: inhibition of CYP enzyme activities. Xenobiotica, 47(4):324-331

**Sdílené prvoautorství*

Spičáková A, Szotaková B, Dimunová D, Myslivečková Z, Kubíček V, Ambrož M, Lnenicková K, Krasulová K, Anzenbacher P, Skálová L: Nerolidol and Farnesol Inhibit Some Cytochrome P450 Activities but Did Not Affect Other Xenobiotic-

Metabolizing Enzymes in Rat and Human Hepatic Subcellular Fractions. (2017) *Molecules*, 22(4).

3. Seznam přednášek a posterů přednesených na veřejných odborných fórech

Krasulová K, Anzenbacher P, Dvořák Z. (2014) Enantiospecific interactions between selected clinically used chiral drugs and human cytochromes P450. 20th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Stuttgart, Německo, 17- 18. 11. 2014, posterová prezentace

Krasulová K, Anzenbacher P, Dvořák Z. (2014) Enantiospecific interactions between ketoconazole and human liver cytochromes P450. Toxcon, 24 - 26. 9. 2014, Stará Lesná, Slovenská republika, posterová prezentace

Krasulová K, Siller M, Anzenbacher P, Dvořák Z. (2015); Enantiospecific interactions between selected clinically used chiral drugs and human cytochromes P450: Example of zopiclone. XXVIII. Xenobiochemické symposium, Kremnice, Slovenská republika, 16 -19. 6. 2015, posterová prezentace

Krasulová K, Anzenbacher P, Dvořák Z. (2015) Enantiospecific effects of amlodipine enantiomers on cytochrome P450 inhibition in vitro. 65. Česko-slovenské farmakologické dny, Praha, 16 – 18. 9. 2015, posterová prezentace

Krasulová K (2015) Enantiospecific interactions of selected calcium channel antagonists with human cytochrome P450 CYP3A4 in vitro. International Conference on Pharmacology and Pharmaceutical Sciences, Vídeň, Rakouská republika, 17 – 18. 11. 2015, přednáška

Krasulová K, Anzenbacher P, Dvořák Z. (2016) The impact of enantiospecific interactions of benidipine with human cytochrome P450 in vitro. 66. Česko-slovenské farmakologické dny, Brno, 13 – 15. 9. 2016, posterová prezentace

Krasulová K, Holas O, Anzenbacher P (2017) Stereospecific reversible and time-dependent inhibition of CYP3A4 by amlodipine enantiomers. 20th International Conference on Cytochrome P450: Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Düsseldorf, Německo, 27 – 31. 8.2017

