

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**ROLE BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ V REZISTENCI NÁDOROVÝCH  
BUNĚK VŮČI STANDARDNÍM CYTOSTATIKŮM**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Anna Giannitsi

## Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.

V Hradci Králové dne \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat RNDr. Jakobovi Hofmanovi, Ph.D za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při vypracování mé diplomové práce.

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Anna Giannitsi

Školitel: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D

Název diplomové práce: **Role biotransformačních enzymů v rezistenci nádorových buněk vůči standardním cytostatikům**

Léková rezistence patří v současnosti k jednomu z hlavních problémů chemoterapie. Nádorové buňky jsou schopny pomocí různých mechanismů odolávat účinkům cytostatik, což vede k selhání protinádorové terapie. Snaha popsat nové mechanismy rezistence a vyvinout nové terapeutické postupy omezující tuto terapeutickou překážku je logicky předmětem mnoha studií. Aktivita biotransformačních enzymů a následné snížení intracelulární koncentrace cytostatika patří mezi jeden z možných mechanismů farmakokinetické rezistence. Na ochraně nádorových buněk se podílí jak enzymy I., tak II. fáze biotransformace. Cytochromy P450 jako hlavní enzymy I. fáze hrají roli v metabolismu řady cytostatik a výsledkem jejich aktivity je vznik cytotoxicky aktivních či neaktivních metabolitů. Zvýšená exprese v nádorech a zapojení jednotlivých isoformů do celkového metabolismu cytostatika, jež je danou formou deaktivováno, se zdá být jedním z důvodů přispívajících k selhávání standardní protinádorové léčby. Zhodnocení reálného dosahu tohoto jevu je bohužel velmi nesnadné kvůli několika skutečnostem, mezi něž lze zařadit zejména komplikovanost metabolických přeměn, interindividuální rozdíly v nádorově specifické expresi enzymů a také to, že rezistence je komplexní jev zahrnující celou řadu dalších mechanismů, které se na ní podílí a ve výsledku vyúsťují v selhání terapie. Podrobnější popis souvislostí mezi intratumorální expresí biotransformačních enzymů, metabolismem cytostatika a jeho případným ovlivněním by mohl pomoci optimalizovat farmakoterapii u pacientů s nádorovým onemocněním.

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Anna Giannitsi

Supervisor: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D

Title of diploma thesis: **The role of biotransformation enzymes in the resistance of cancer cells against standard cytostatics**

Drug resistance is currently one of the major problems of chemotherapy. Tumor cells are able to defend themselves against the effect of cytostatic drugs due to various mechanisms which leads to a failure of anticancer therapy. The effort to describe new mechanisms of resistance and to develop new therapeutic methods, which would limit this therapeutic obstacle, is logically the subject of many studies. The activity of drug metabolizing enzymes and the subsequent decrease of intercellular concentration of anticancer drugs belongs to one of the possible mechanisms of pharmacokinetic resistance. Enzymes of I. and II. phase of biotransformation participate in this phenomenon. Cytochromes P450, main enzymes of the I. phase, play a major role in the metabolism of many cytostatic agents producing either pharmacologically active or inactive metabolites. Increased expression in tumors and the involvement of individual isoforms into the overall metabolism of cytostatic, which is deactivated by their activity, seems to be one of the reasons that contribute to the failure of standard anticancer therapy. The evaluation of the actual impact of this phenomenon is unfortunately very difficult due to many factors, mainly including complexity of metabolic pathways, interindividual differences in tumor-specific enzyme expression and also the fact that drug resistance is a complex phenomenon that is mediated by a number of other mechanisms which, all together, lead to the failure of therapy. Detailed description of relationships between intratumoral expression of biotransformation enzymes, the metabolism of anticancer drugs and its eventual modulation could help optimize pharmacotherapy in oncological patients.

## Obsah

1. Seznam zkratk	1
2. Úvod	2
3. Biotransformace léčiv	3
3.1 I.fáze biotransformace	4
3.2 II. fáze biotransformace	5
3.2.1 Glukuronidace	5
3.2.3 N-Acetylce	6
3.2.4 Methylace	6
3.2.5 Konjugace s glutathionem	6
4. Cytochromy P450 (CYP450)	9
4.1 Struktura CYP450	10
4.2 Lokalizace a funkce cytochromů P450	12
4.3 Substráty a inhibitory cytochromů P450	16
4.3.1 CYP1 rodina	16
4.3.2 CYP2 rodina	17
4.3.3 CYP3 rodina	19
4.4 Regulace exprese cytochromů P450	21
5. Mnohočetná léková rezistence v cytostatické protinádorové terapii	24
5.1 Biotransformace cytostatik cytochromy P450	29
5.1.1 Cytostatika aktivovaná enzymy CYP450 nebo jejichž metabolity jsou cytostaticky aktivní	29
5.1.2 Cytostatika deaktivovaná enzymy CYP450	32
5.1.3 Cytostatika, jejichž metabolismus není závislý na CYP450	35
5.2 Exprese cytochromů P450 v nádorech	37
5.3 Role cytochromů P450 ve fenoménu mnohočetné lékové rezistence	42
6. Diskuze a závěr	48
7. Seznam použité literatury	50

## 1. Seznam zkratek

ABC	ATP-binding cassette
AhR	Aryluhlovodíkové receptory
ATP	Adenosintrifosfát
BCRP	Breast cancer resistance protein
CAR	Konstitutivní androstanový receptor
CYP450	Cytochrom P450
GH	Růstový hormon
GIT	Gastrointestinální trakt
GR	Glukokortikoidní receptor
GST	Glutathion-S-transferáza
MDR	Mnohočetná léková rezistence z anglického termínu multidrug resistance
MRP	Multidrug resistance associated protein
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NAT	N-acetyltransferáza
PAH	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PPARs	Receptory aktivované peroxizomovými proliferátory
PXR	Pregnanový X receptor
SRS	Místo rozpoznávající substrát
SULT	Sulfotransferáza
TPMT	Thiopurin S-methyltransferáza
UDP	Uridindifosfát
UGT	UDP-glukuronosyltransferáza

## 2. Úvod

Chemoterapie společně s radioterapií a chirurgickou léčbou patří mezi nejvýznamnější léčebné metody nádorových onemocnění. Ta se ve světě řadí k jedné z hlavních příčin úmrtí. Výsledky léčby a prognóza pacientů s maligním onemocněním často nebývají optimistické a nádorové buňky si postupně vytváří rezistenci téměř ke všem známým klinicky užívaným cytostatikům, a to prostřednictvím různých mechanismů. Léková rezistence představuje velký problém terapie, ale také velkou výzvu pro výzkum. Mezi jeho hlavní cíle tak patří snaha objasnit nové mechanismy rezistence nádorových buněk na léčbu cytostatiky a vývoj nových modulátorů, které by tyto mechanismy překonaly.

Detoxifikační systém se řadí mezi farmakokinetické mechanismy rezistence a jeho hlavními aktéry jsou biotransformační enzymy. Téměř všechna cytostatika jsou metabolizována pomocí enzymů I. a II. fáze biotransformace. Význam cytochromů P450 při metabolismu je nezastupitelný. Jsou to klíčové enzymy reakcí I. fáze biotransformace a mají důležitou roli při aktivaci či inaktivaci řady léčiv. Zvýšená exprese těchto enzymů tak může mít za následek urychlení eliminace v takové míře, že léčivo nedokáže dosáhnout svého cíle a vyvinout požadovaný efekt. K těmto reakcím nejčastěji dochází v játrech, ve střevě a v dalších metabolicky aktivních tkáních. Dalším možným místem probíhajících biotransformačních reakcí mohou být nádorové buňky. Vědci se tak začali zabývat intratumorálními biotransformačními enzymy a jejich možnou rolí v rezistenci vůči cytostatikům.

Cílem této práce je shrnout poznatky o výskytu biotransformačních enzymů, především cytochromů P450, v nádorových buňkách a jejich roli v metabolismu cytostatik a farmakokinetické lékové rezistenci.



### 3. Biotransformace léčiv

Biotransformace je proces katalyzovaný enzymy, při kterém dochází k chemické přeměně molekuly léčiva či jiného xenobiotika za účelem zvýšení jeho rozpustnosti ve vodě a následně snazšímu vyloučení z organismu. Společně s absorpcí, distribucí a exkrecí je biotransformace (metabolismus) součástí farmakokinetiky, která se jakožto věda zabývá osudem léčiva v organismu po jeho podání. Produktem metabolické přeměny je metabolit, který může mít výrazně zvýšenou farmakologickou aktivitu (látka je podávána ve formě proléčiva, tedy v neaktivní formě), případně se biotransformace může projevit vznikem toxického metabolitu a následným poškozením organismu, ve většině případů však dochází ke vzniku méně farmakologicky aktivního či úplně neaktivního produktu.<sup>1</sup>

Hlavní cestou eliminace léčiv je renální exkrece a biotransformace.<sup>2</sup> Biotransformaci lze rozdělit na dvě fáze. I. fázi, tzv. nesyntetickou, zahrnující reakce cytochrom P450 (CYP450) oxidaci, redukci a hydrolyzu a na II. fázi, tzv. syntetickou, kam patří konjugace (nejčastěji se jedná o glukuronidaci). Obě fáze, zejména pak druhá, snižují lipofilitu léčiva a usnadňují exkreci.<sup>3</sup> Biotransformace má u velkého počtu léčiv značný podíl na jejich eliminaci. Léčiva však mohou být vyloučena z organismu i v nezměněné podobě.

Přibližné procentuální zastoupení jednotlivých eliminačních cest u klinicky užívaných léčiv je uvedeno v tabulce (Tab. 1).

Tab. 1 Procentuální zastoupení jednotlivých cest eliminace.

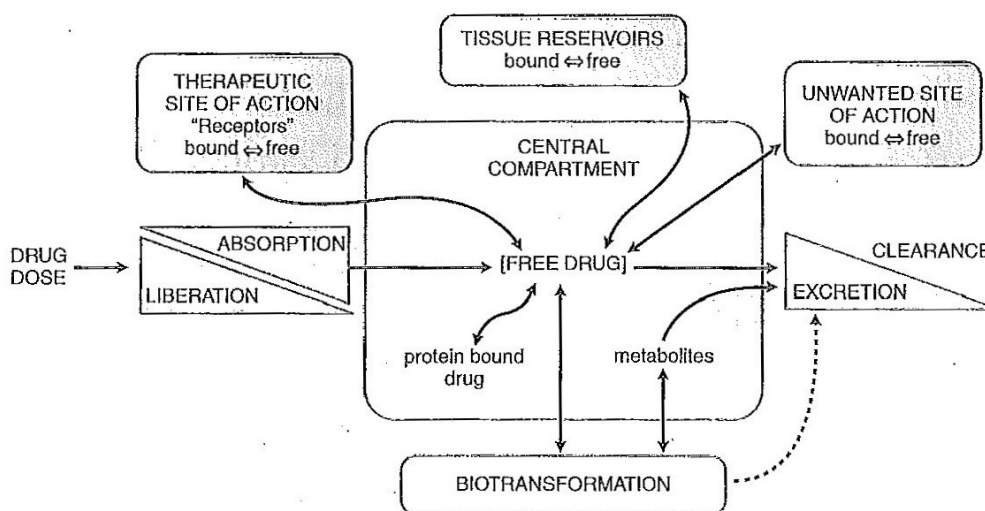
Cesta eliminace	Výskyt v %
Renální exkrece (nezměněná forma)	25
CYP450 metabolismus	
• CYP 3A4	30
• CYP 2D6	20
• CYP 2C9/19	10
Glukuronidace	10
Ostatní	5

Převzato z: <sup>2</sup>

### 3.1 I. fáze biotransformace

Nesyntetická fáze zahrnuje reakce oxidační, lokalizované výhradně v endoplazmatickém retikulu, které jsou katalyzovány CYP450. Při těchto reakcích dochází k zavedení kyslíku do molekuly léčiva. Jako příklad lze uvést hydroxylaci, O-dealkylaci a N-oxidaci. Dalším druhem jsou reakce redukční, které mají u člověka menší význam a základními typy jsou azoredukce, nitroredukce a ketoredukce. Poslední skupinou reakcí řadících se do I. fáze biotransformace jsou reakce hydrolytické, nezávislé na CYP450, probíhající mimo endoplazmatické retikulum, například hydrolyza esterů nebo amidů.<sup>1</sup>

V této fázi dochází k zavedení polární funkční skupiny do molekuly léčiva, tím se metabolit stává zpravidla reaktivnější. Hydrofilita léčiva se zvyšuje pouze mírně nebo vůbec. Takto pozměněné molekuly jsou schopny konjugace, tedy II. fáze biotransformace.<sup>1</sup> Ne vždy léčivo podstoupí II. fázi biotransformace, případně může být z organismu vyloučeno v celkově nezměněné podobě. Následující schéma (viz Obr. 1) popisuje osud léčiva v organismu.



Obr. 1 Vztah mezi absorpcí, distribucí, metabolismem a eliminací léčiva v lidském organismu. Převzato z: <sup>4</sup>

### **3.2 II. fáze biotransformace**

Tato fáze je také nazývána fází syntetickou. Produkty reakce I. fáze, nyní již obsahující reaktivní funkční skupinu, vstupují do II. fáze metabolismu a jsou spojeny s endogenními molekulami, jako jsou kyselina glukuronová, sulfát, glycin, acetát, methyl a glutathion. Konjugovány jsou v některých případech i parentní formy léčiva. Vzniká metabolit známý též pod názvem konjugát. Na rozdíl od I. fáze biotransformace je ve většině případů výrazně pozměněna chemická struktura molekuly léčiva.<sup>5</sup> Zatímco glukuronidace a glutathionylace výrazně zvyšují hydrofilitu i molekulovou hmotnost léčiva, u dalších syntetických reakcí II. fáze biotransformace tomu tak být nemusí. Syntetické reakce se odehrávají převážně v játrech, kde dochází ke vzniku hydrofilního a zpravidla farmakologicky neaktivního metabolitu.<sup>3</sup> Enzymy účastnící se II. fáze metabolismu řadíme do skupiny transferáz.<sup>6</sup> Mezi nejčastější konjugační reakce při biotransformaci xenobiotik patří glukuronidace, sulfatace, N-acetylace, methylace a konjugace s glutathionem.<sup>5</sup> Tyto reakce budou podrobněji popsány v následujících kapitolách.

#### **3.2.1 Glukuronidace**

Při glukuronidaci je kyselina glukuronová přenesena na atom molekuly léčiva (N, O nebo S), který je bohatý na elektrony a vytváří se amidová, esterová nebo thiolová vazba.<sup>3</sup> Reakce je katalyzována rodinou enzymů uridindifosfát-(UDP)-glukuronosyltransferázami. Tyto enzymy jsou lokalizovány v endoplazmatickém retikulu a liší se ve svých cDNA sekvencích.<sup>5</sup> Vedle nejčastěji se vyskytujících jaterních UDP-glukuronosyltransferáz (UGT) jsou UGT lokalizovány také mimojaterně a to například v tenkém střevě, plicích a ledvinách.<sup>7</sup> Glukuronidace je nejdůležitější konjugační reakce II. fáze biotransformace a UGT hrají také významnou roli v metabolismu endogenních molekul.<sup>8</sup>

#### **3.2.2 Sulfatace**

Při sulfataci dochází ke spojení cizorodé látky nebo endogenní molekuly se sulfátem. Donorem sulfátu je 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát a reakci katalyzuje rodina enzymů nazývaných sulfotransferázy (SULT). Byly identifikovány dvě třídy SULT. První třída SULT je vázaná na membránách v Golgiho aparátu a jejím

úkolem je sulfatace peptidů, proteinů a lipidů, oproti tomu druhá třída SULT se vyskytuje v cytosolu a je zodpovědná za sulfataci xenobiotik a menších endogenních molekul.<sup>9</sup>

### **3.2.3 N-Acetylce**

N-acetylce je hlavní cesta biotransformace u sloučenin obsahujících aromatický amin ( $\text{Ar-NH}_2$ ) nebo hydrazin ( $\text{Ar-NH-NH}_2$ ). Molekula léčiva je převedena na aromatický amid, případně hydrazid. Reakci katalyzuje N-acetyltransferáza (NAT) pro jejíž činnost je nutný kofaktor acetyl-koenzym A, který je zdrojem acetylu. U člověka se NAT vyskytuje ve dvou formách, NAT1 a NAT2, které vykazují rozdílnou substrátovou specifitu a lokalizaci.<sup>1</sup>

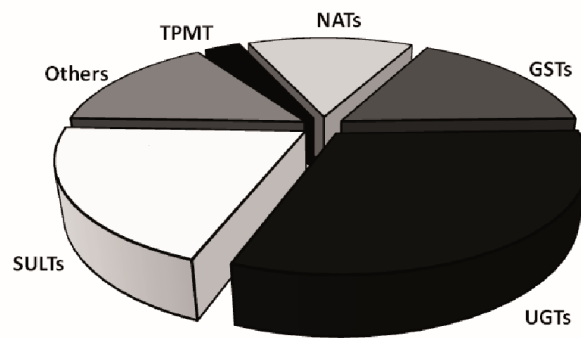
### **3.2.4 Methylce**

Thiopurin S-methyltransferáza (TPMT) je enzym katalyzující S-methylaci aromatických heterocyklických sloučenin. Tento enzym je důležitý například pro inaktivaci cytostatik a imunosupresiv jako jsou 6-merkaptopurin a azathioprin.<sup>6</sup>

### **3.2.5 Konjugace s glutathionem**

Při této syntetické reakci dochází ke spojení molekuly xenobiotika s tripeptidem glutathionem za účasti enzymů glutathion-S-transferáz (GSTs). GSTs hrají důležitou roli v detoxikaci polyaromatických uhlovodíků. Jednou z hlavních funkcí GSTs je ochrana buněk vůči oxidačnímu stresu.<sup>5</sup>

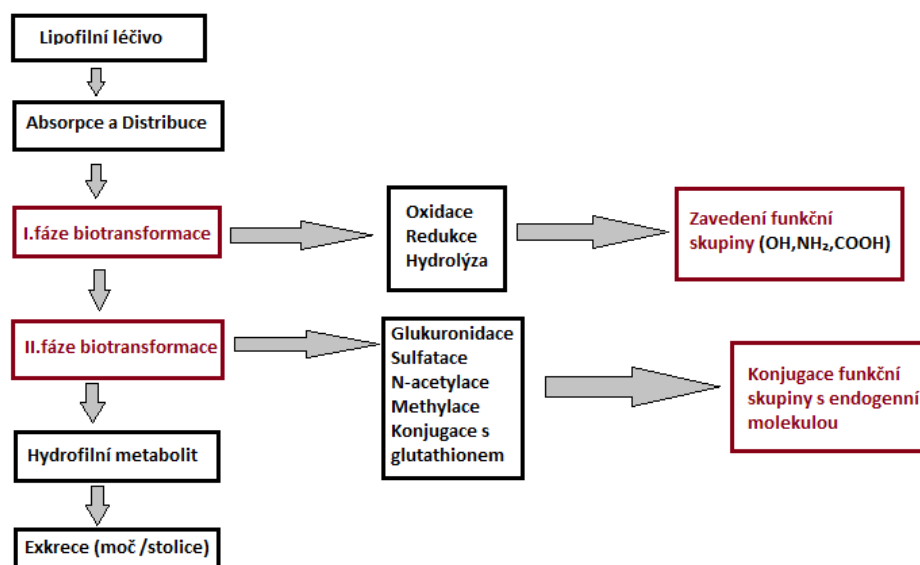
Přibližné zastoupení jednotlivých reakcí II. fáze biotransformace v metabolismu léčiv shrnuje následující graf (viz. Obr. 2).



Obr. 2 Zastoupení jednotlivých reakcí II. fáze biotransformace. Převzato z: <sup>6</sup>

Výsledkem biotransformace touto cestou jsou molekuly se zvýšenou rozpustností ve vodě, které nemohou snadno difundovat přes buněčné membrány. K přestupu využívají transportéry a dodání energie ve formě ATP. Konjugáty jsou transportovány do krve a z organismu vyloučeny ledvinami nebo žlučí. Při vylučování konjugátů léčiv žlučí může bakteriální aktivitou docházet v tenkém střevě k jejich rozkladu a následné reabsorpci parentní formy léčiva, což je označováno jako tzv. enterohepatický oběh. Tento jev výrazně prodlužuje setrvání léčiva v organismu.<sup>10</sup>

Pro jednodušší pochopení a představu o biotransformaci je zde uvedeno následující schéma (viz Obr. 3).



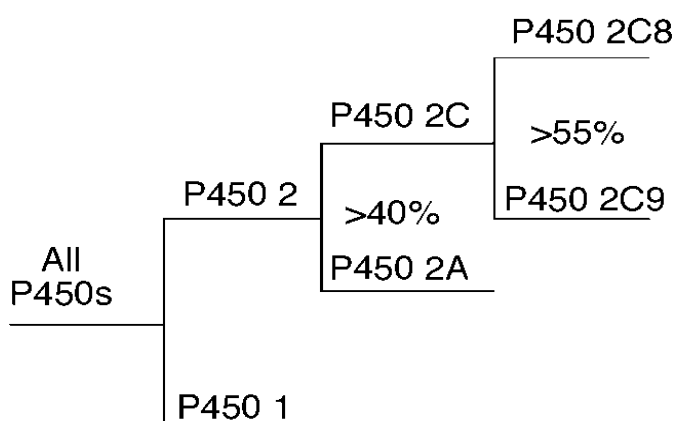
Obr. 3 Schéma jednotlivých kroků biotransformace. Modifikováno dle: <sup>11</sup>

I přesto, že enzymy katalyzující reakce v rámci II. fázi biotransformace hrají v metabolismu významnou roli, nejsou tak častým předmětem klinických studií jako CYP450, na kterých dochází k velkému množství interakcí<sup>5</sup>, a proto se jim bude věnovat podrobněji následující kapitola.

## 4. Cytochromy P450 (CYP450)

Cytochromy P450 jsou enzymy katalyzující oxidační, peroxidační a redukční reakce.<sup>11</sup> U člověka hrají významnou roli v I. fázi biotransformace<sup>12</sup>, ovlivňují farmakodynamickou aktivitu většiny léčiv, přičemž tvoří přibližně 80 % oxidačního metabolismu a 50 % eliminace u běžně klinicky užívaných léčiv.<sup>13</sup> Jedná se o evolučně velmi staré hemoproteiny vycházející z jednoho genu CYP450 archebakterií, ze kterého se za více než 1,5 miliardy let vyvinulo ohromné množství genů kódujících jednotlivé isoformy CYP450.<sup>14</sup> Můžeme je pozorovat v každém živém organismu, a to u eukaryot i prokaryot. Všechny CYP450 enzymy vykazují podobné strukturní rysy a mechanismus účinku, nicméně u jednotlivých isoform se vyskytují výrazné specifické rozdíly v detailní funkci, substrátové specifitě a struktuře.<sup>15</sup> Z enzymologického hlediska lze CYP450 zařadit do skupiny NADPH-O<sub>2</sub> dependentních monooxygenáz<sup>11</sup> se systematickým EC číslem 1.14.14.1.<sup>16</sup>

Názvosloví jednotlivých enzymů obsahuje zkratku CYP, za kterou následuje arabská číslice, která určuje rodinu enzymů a může poukazovat na jejich funkci, dále velké písmeno určující podrodinu a následně arabská číslice specifikující jednotlivého člena podrodiny CYP450<sup>15</sup> (viz. Obr. 4).



Obr. 4 Schéma znázorňuje nomenklaturu CYP450. Převzato z: <sup>17</sup>

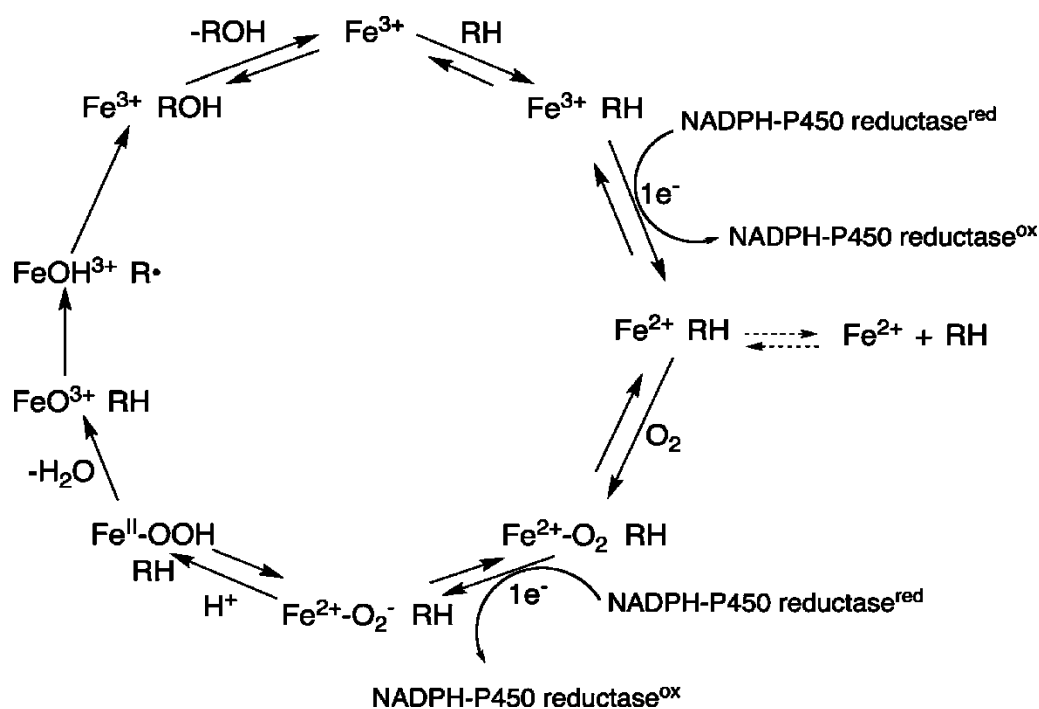
## 4.1 Struktura CYP450

Jak již bylo zmíněno, jedná se o hemoproteiny, tedy proteiny spojené s hemovou prostetickou skupinou, která obsahuje atom železa. Ten je schopný podstoupit vratnou oxidační nebo redukční reakci.<sup>14</sup> Každý člen rodiny CYP450 je složen nejméně ze dvou proteinových složek a jedné lipidové. Hemoprotein, flavoprotein (NADPH-cytochrom reduktáza) a fosfatidylcholin. Aktivní část CYP450 obsahuje centrum s hemovým železem, které váže substrát, aktivuje kyslík a poté katalyzuje zavedení aktivovaného kyslíku do substrátu. NADPH-cytochrom reduktáza funguje jako nosič pro přenos elektronů z NADPH na CYP450. Fosfatidylcholin tento přenos usnadňuje.

Katalytický cyklus, při kterém je do molekuly léčiva zaveden aktivovaný kyslík, se skládá nejméně ze 6 reakcí (viz. Obr. 5):

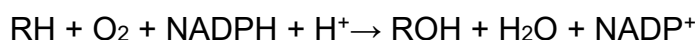
1. Substrát je navázán na železitou ( $\text{Fe III}^+$ ) formu enzymu.
2. Jeden elektron je přenesen z NADPH-CYP450 reduktázy na železo, které je ve formě  $\text{Fe III}^+$  za vzniku železnatého ( $\text{Fe II}^+$ ) komplexu enzym-substrát.
3. Redukovaný CYP450-substrát komplex váže  $\text{O}_2$  a vytváří terciární komplex s  $\text{O}_2$  vázaným na železo.
4. Druhý elektron je adován na terciární komplex pomocí reduktázy.
5. Vznik molekuly vody.
6. Vznik produktu, oxidovaného substrátu.<sup>18</sup>





Obr. 5 Schéma katalytického cyklu. Převzato z: <sup>18</sup>

Obecně lze katalytickou reakci zapsat jako:



Lidské CYP450 enzymy vykazují evolučně výrazně zachovalou prostorovou sekundární strukturu, podobnou bakteriálním CYP450.<sup>19</sup> Zachovalé strukturní jádro se skládá ze čtyř helixových svazků. Tři z nich jsou uspořádány paralelně a značí se D, L a I. Čtvrtý, antiparalelní, je označený E. Hemová prostetická skupina se nachází mezi helixy I a L.<sup>20</sup> Nejzachovalejší část obsahuje cysteinový zbytek, který poskytuje thiolátový ligand pro hemové železo<sup>19</sup>, tato část je navíc zodpovědná za charakteristickou absorpenci při 450 nm a tím udává název celé skupině.<sup>20</sup>

Bylo identifikováno šest míst rozpoznávajících substrát (SRS), která jsou zodpovědná za rozpoznání substrátu a za jeho vazbu. Struktura CYP450 je uvedena na obrázku (viz Obr. 6).



Obr. 6 Struktura cytochromu P450. Obrázek znázorňuje jednotlivé helixové svazky a místa rozpoznávající substrát (SRS). Převzato z: <sup>20</sup>

Schopnost těchto enzymů interagovat s velkým množstvím substrátů je dána částečnou plasticitou proteinů. Strukturální flexibilita se nevyskytuje pouze u jednotlivých isoform, ale i u konkrétního enzymu v přítomnosti rozdílného ligandu.<sup>19</sup>

CYP450 se vyskytují v různých formách, ty jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry homologie jejich primární struktury, tedy pořadí jednotlivých aminokyselin. Do stejné rodiny náleží ti zástupci, u kterých byla nalezena více než 40 % homologie aminokyselinové sekvence, do stejné podrodiny pak ti, kteří vykazují homologii více než 60 %.<sup>14</sup> Jednotlivé rodiny a podrodiny se neliší pouze strukturou, ale také například lokalizací v lidském těle.

## 4.2 Lokalizace a funkce cytochromů P450

CYP450 enzymy se nachází prakticky ve všech tkáních, avšak játra jsou místem s největším výskytem a zároveň nejširším zastoupením jednotlivých CYP450

isoforem. Další významná místa výskytu jsou gastrointestinální trakt, plíce, mozek, srdce, kůže<sup>21</sup> a dle některých studií dochází ke zvýšení exprese CYP450 v nádorových buňkách.<sup>22</sup> Jsou lokalizovány převážně v membránách hladkého endoplazmatického retikula, některé rovněž v membránách mitochondrií.<sup>14</sup> Lokalizace jednotlivých isoforem společně s jejich typickým substrátem je pro přehlednost uvedena v tabulce (Tab. 2).

Tab. 2 Lokalizace jednotlivých isoforem cytochromů P450 a jejich typické substráty

CYP	Lokalizace	Typický substrát
1A1	plíce, ledviny, gastrointestinální trakt (GIT), placenta, kůže, lymfocyty	polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH)
1A2	játra	aromatické aminy, PAH, kofein
1B1	ledviny, kůže, prostata, děloha, lidský plod, (prsní žlázy), mozek, játra	PAH
2A6	plíce, játra	kumarin, steroidy
2B1/2	mozek	morfin
2B6	plíce, GIT, játra, srdce	nikotin
2C8	játra, ledviny	retinoidy, taxol
2C9/10	játra	diklofenak, tolbutamid
2C19	játra, srdce	omeprazol, diazepam
2D6	GIT, játra, mozek, srdce	antidepresiva, $\beta$ -blokátory
2E1	játra, plíce, placenta, srdce, kostní dřeň	etanol, nitrosaminy, paracetamol
3A4/5	ledviny, děloha, plod, plíce, GIT, placenta, lymfocyty	blokátory kalciových kanálů, cyklosporin, paracetamol, taxol, steroidy a řada dalších
3A7	plod, placenta	isomery kyseliny retinové

Převzato z: <sup>15, 14</sup>

Hlavní funkcí CYP450 je metabolismus cizorodých látek včetně léčiv, které jsou v řadě případů toxické.<sup>14</sup> Podílí se tak na aktivní ochraně organismu, což souvisí s jejich lokalizací v tkáních kontrolujících absorpci, distribuci a exkreci. Zatímco absorpce může být aktivitou enzymů CYP450 ve střevě a játrech omezena (u léčiv je velice důležitý fenomén prvního průchodu játry výrazně snižující biologickou dostupnost), eliminace bývá naopak urychlena. Z farmakologického hlediska schopnost jednotlivých pacientů absorbovat a metabolizovat léčiva může být zásadně rozdílná v závislosti na genetických faktorech. Znalost těchto genetických faktorů může být využita k předpovědi schopnosti pacientů metabolizovat léčiva ještě před samotným začátkem terapie. Personalizovaná terapie respektující polymorfismus CYP450 u jednotlivých pacientů při léčbě rakoviny může přinášet výhody spojené se zvýšeným účinkem léčby, případně snížením toxicity (terapeutické rozmezí jednotlivých cytostatik bývá zpravidla úzké). U pacientů se stejnou nemocí produkují interindividuální rozdíly v metabolizační kapacitě výrazně se lišící odpověď na léčbu.<sup>23</sup>

Na CYP450 dochází k velkému množství farmakokinetických lékových interakcí. Snížená aktivita enzymu vlivem inhibice může vést ke snížení biotransformace cytostatika a tím k výrazné toxicitě a závažným nežádoucím účinkům, oproti tomu indukce, tedy zvýšení počtu CYP450 vede k urychlení biotransformace a tím k možnému selhání léčby. Toto tvrzení platí pro cytostatika, která jsou aktivitou enzymů odbourávána na neaktivní metabolit, ve skupině cytostatik je však také celá řada proléčiv, tedy enzymaticky aktivovaných látek (např. cyklofosamid). U těchto léčiv se klinické projevy indukce a inhibice manifestují opačně. Jelikož se jedná o závažný problém doprovázející farmakoterapii, regulační autority dávají čím dál větší důraz na odhalování interakčního potenciálu nových léčiv už v průběhu preklinických studií.

CYP450 a P-glykoprotein, což je na ATP závislý glykoprotein vypuzující cizorodé látky ven z buňky, mají rozdílné substráty, avšak některé mají společné. Tato skutečnost společně s ko-expresí ve střevě, játrech a ledvinách naznačuje spoluúčast v procesech lékové rezistence závislé na snížené absorpci látky a zároveň zvýšeném metabolismu léčiva. Proto je logické předpokládat, že současná přítomnost a aktivita CYP450 a P-glykoproteinu ve střevě je

zodpovědná za velkou variabilitu v biologické dostupnosti u některých perorálně podávaných léčiv.<sup>24</sup>

Vedle tradičních detoxikačních reakcí a aktivace léčiv se CYP450 uplatňují při potenciálně nebezpečné aktivační reakci prokarcinogenů.<sup>14</sup> CYP1A1 je považován za enzym, který je ze všech CYP450 nejvíce zapojen do metabolické aktivace prokarcinogenních polutantů životního prostředí, jako jsou polyaromatické uhlovodíky.<sup>25</sup> Tyto polutanty mohou následně způsobovat mutace a rozvoj nádorových onemocnění. Bylo také prokázáno, že za určitých okolností mohou CYP450 produkovat reaktivní kyslíkové radikály, které následně způsobují oxidační stres a smrt buňky. Mezi CYP450 nejvíce produkující tyto radikály patří CYP2E1.<sup>26</sup>

Další důležitou roli hrají enzymy CYP450 v biosyntéze endogenních látek. Dle funkce je tak možné rozlišit dvě hlavní třídy enzymů.<sup>27</sup> Rodiny 1-4 jsou zodpovědné primárně za metabolismus cizorodých látek, ale pouze částečně také za metabolismus endogenních molekul, jako jsou například steroidy, žlučové kyseliny, prostaglandiny, mastné kyseliny a další. Oproti tomu další savčí CYP450 enzymy mají klíčovou roli v biosyntetických cestách. CYP5 a 8A se účastní syntézy tromboxanu a prostacyklinu. Rodiny 11, 17, 19 a 21 jsou důležité pro syntézu steroidních hormonů a rodiny 7, 8B, 24, 27, 46 a 51 katalyzují reakce vedoucí k biosyntéze žlučových kyselin, vitamínu D6 a cholesterolu.<sup>28</sup>

Nejdůležitější formy CYP450 pro metabolismus xenobiotik jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 3).

**Tab. 3 Nejdůležitější formy CYP450 pro metabolismus xenobiotik**

<u>Jaterní</u>	1A2, 2A6, 2D6, 2C (2C8, 2C9, 2C18 a 2C19), 2E1 a 3A4.
<u>Mimojaterní</u> (plíce, ledviny, kůže, tkáně gastrointestinálního traktu a močových cest)	1A1, 2B6, 2E1 a 3A4.

Převzato z: <sup>14</sup>

Za více než 90 % oxidativního metabolismu léčiv jsou zodpovědné formy CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP3A4. Metabolismu jednoho léčiva se může účastnit víc isoform CYP450.<sup>21</sup>

Jak již bylo zmíněno v podkapitole 4.1., mají CYP450 díky svojí plasticitě schopnost spojovat se s velkým množstvím rozdílných substrátů.

### **4.3 Substráty a inhibitory cytochromů P450**

Každá jednotlivá CYP450 isoforma má charakteristické spektrum substrátů. Pro CYP450 účastníci se metabolismu xenobiotik (rodina 1-4) je typická široká a překrývající se substrátová specifita. Oproti tomu CYP450 zodpovědné za metabolismus endogenních molekul mají substrátovou specifitu výrazně užší.<sup>21</sup> Většina léčiv jsou substráty pro více isoform CYP450, metabolismus léčiv tak může zahrnovat rozdílné cesty a mohou vznikat rozdílné produkty.<sup>15</sup> Výsledkem může být také soutěž o jednotlivé formy enzymů a vznik inhibice. Inhibice způsobená kompeticí o stejný enzym může vést k nežádoucímu zvýšení koncentrace léčiva v plasmě.<sup>29</sup> Proto je inhibice CYP enzymů významná jak z terapeutického, tak i toxikologického hlediska.<sup>27</sup>

Rozlišujeme inhibici vratnou a nevratnou. Nejčastější mechanismus inhibice je inhibice vratná, kterou lze dále dělit na inhibici kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní.<sup>21</sup>

V následující části budou podrobněji probrány a uvedeny substráty, především léčiva, u nejdůležitějších forem CYP450.

#### **4.3.1 CYP1 rodina**

U člověka rozlišujeme dva členy podrodiny CYP1A, a to CYP1A1 a CYP1A2. CYP1A1 je hlavní extrahepatální forma<sup>21</sup>, oproti tomu CYP1A2 je převážně jaterní enzym a jeho substráty jsou aromatické aminy a polyaromatické uhlovodíky, mezi léčiva, která preferují metabolismus katalyzovaný CYP1A2 patří paracetamol, kofein, klozapin a teofylin. Pro přehlednost jsou další substráty a také inhibitory uvedeny v tabulce (Tab. 4). Kvůli roli CYP1A v metabolismu prokarcinogenů a následného vzniku nádorového bujení jsou jejich polymorfismy

důkladně studovány.<sup>30</sup> Za zmínku také stojí CYP1B1, který se vyskytuje převážně v nádorových buňkách a je zodpovědný za metabolismus tamoxifenu.<sup>31</sup>

Tab. 4 Substráty CYP1A2

Forma CYP450	Substrát	Inhibitor	
CYP1A2	amitriptylin	propranolol	amiodaron
	estradiol	riluzol	cimetidin
	fluvoxamin	ropivakain	fluorochinolon
	haloperidol	takrinteofylin	fluvoxamin
	imipramin	teofylin	furafylin
	klomipramin	verapamil	tiklopidin
	klozapin	warfarin	
	kofein	zileuton	
	mexiletin	zolmitriptan	
	naproxen		
	ondansetron		
	paracetamol		

Převzato z: <sup>12</sup>

#### 4.3.2 CYP2 rodina

Jedná se o největší rodinu nadrodiny CYP450.<sup>12</sup>

CYP2C podrodina se skládá ze čtyř hlavních členů: CYP2C8, 2C9, 2C10 a 2C19. První enzym se nezdá být v metabolismu léčiv příliš důležitý a jako jeho substráty byly identifikovány jen warfarin, taxol a tretinoin. Oproti tomu CYP2C9 a 2C19 metabolizují velké množství klinicky významných léčiv (Tab. 5). CYP2C10 se liší ve své struktuře a substrátové specifitě od CYP2C9 tak málo, že jsou tyto enzymy často vnímány jako jeden.<sup>15</sup>

Tab. 5 Substráty a inhibitory CYP2C19 a CYP2C9

Forma CYP 450	Substrát	Inhibitor	
2C19	amitriptylin	omeprazol	cimetidin
	citalopram	pantoprazol	felbamát
	cyklofosfamid	primidon	fluoxetin
	diazepam	progesteron	fluvoxamin
	fenytoin	proguanil	indometacin
	fenobarbital	propranolol	ketokonazol
	hexobarbital	R-warfarin	lansoprazol
	imipramin	teniposid	modafinil
	indometacin		omeprazol
	klomipramin		paroxetin
	lansoprazol		probenicid
	S-mefenytoin		tiklopidin

	methyphenobarbital moklobemid nelfinavir nilutamid		topiramát
2C9	amitriptylin celecoxib diklofenak fentyoin fluoxetin fluvastatin glipizid ibuprofen irbesartan losartan naproxen	piroxikam rosiglitazon sulfamethoxazol suprofen tamoxifen torsemid tolbutamid S-warfarin	amiodaron fenylbutazon flukonazol fluvastatin fluvoxamin isoniazid lovastatin paroxetin probenicid sertralin sulfafenazol teniposid trimethoprim zafirlukast

Převzato z: <sup>12</sup>

I přes relativně malou expresi v játrech je množství léčiv primárně metabolizovaných CYP2D6 poměrně velké, jedná se o přibližně 20 % klinicky užívaných léčiv, jako jsou například antiarytmika (propafenon), antidepresiva (amitriptylin, venlafaxin, paroxetin), antipsychotika (risperidon),  $\beta$ -blokátory (metoprolol), některá cytostatika, analgetika a další.<sup>30</sup> Celkový seznam substrátů a inhibitorů je uveden v tabulce (Tab. 6). CYP2D6 je jedním z nejvíce studovaných isoformů CYP450, a to kvůli častému výskytu polymorfismu v populaci. Podle fenotypu rozlišujeme pomalé a rychlé metabolizátory.<sup>15</sup>

**Tab. 6 Substráty a inhibitory CYP2D6**

Forma CYP450	Substrát		Inhibitor
CYP2D6	alprenolol	S-metoprolol	amiodaron
	amitriptylin	mexiletin	celecoxib
	amfetamin	minaprin	cimetidin
	bufuralol	nortriptylin	doxorubicin
	fenacetin	ondansetron	fluoxetin
	chlorpromazin	paroxetin	haloperidol
	karvedilol	perfenazin	chinidin
	kломipramin	propafenon	chlorfeniramin
	kodein	propranolol	chlorpromazin
	desipramin	risperidon	kломipramin
	dexfenfluramin	spartein	kokain
	dextrometorfan	tamoxifen	levomepromazin
	fluoxetin	thioridazin	metadon



fluvoxamin	timolol	moklobemid
haloperidol	tramadol	paroxetin
imipramin	venlafaxin	ranitidin
lidokain		ritonavir
metoklopramid		sertralin
methoxyamfetamin		terbinafin

Převzato z: <sup>12</sup>

Podrodina 2E je u savců prezentována pouze v jedné formě a to CYP2E1. Tento enzym je známý hlavně díky jeho zapojení do metabolismu etanolu. Substráty pro CYP2E1 jsou malé molekuly, jako například halogenované uhlovodíky, z léčiv lze uvést anestetika halothan, enfluran a isofluran.<sup>15</sup>

### 4.3.3 CYP3 rodina

CYP3A4 je hojně se vyskytující enzym, jenž má nejširší substrátovou specifitu ze všech CYP450. Bez debat se jedná o klinicky nejdůležitější isoformu CYP450. Známé substráty se výrazně liší ve velikosti od malých molekul jako je paracetamol (Mr 151) až po imunopresivum cyklosporin A (Mr 1201).

Zajímavým aspektem substrátové specifity CYP3A4 je její podobnost se specifitou P-glykoproteinu. Proto některé léky ze skupiny substrátů CYP3A4 byly klinicky testovány jako kompetitivní inhibitory P-glykoproteinu, aby se předešlo mnohočetné lékové rezistenci v protinádorové terapii.<sup>24</sup>

Mezi typické substráty, které jsou silné inhibitory enzymu CYP3A4, patří azolová antimykotika, makrolidová antibiotika nebo dihydropyridinové blokátory vápníkových kanálů. Substráty a inhibitory CYP3A4 jsou uvedeny v tabulce (Tab. 7).

Tab. 7 Substráty a inhibitory CYP3A4 (3A5, 3A7)

Forma CYP450	Substrát	Inhibitor	
3A4 (3A5, 3A7)	alfentanil	lovastatin	amiodaron
	alprazolam	metadon	azithromycin
	amlodipin	midazolam	cimetidin
	astemizol	nelfinavir	ciprofloxacín
	atorvastatin	nifedipin	delaviridin
	azitromycin	nisoldipin	diethyl-dithiokarbamat
	buspiron	nitrendipin	diltiazem
	cerivastatin	ondansetron	erythromycin
	chlorfeniramin	pimozid	flukonazol
	cisaprid	progesteron	fluvoxamin
	cyclosporin	propranolol	gestoden
	dapson	ritonavir	grepfruitový džus
	dextrometorfan	salmeterol	indinavir
	diazepam	saquinavir	interleukin-10
	diltiazem	sildenafil	itrakonazol
	erytromycin	simvastatin	ketoconazol
	estradiol	tacrolimus	klaritromycin
	felodipin	tamoxifen	mibefradil
	fentanyl	taxol	mifepriston
	finasterid	terfenadin	nefazodon
	haloperidol	testosteron	nelfinavir
	hydrokortison	trazodon	norfloxacín
	chinidin	triazolam	norfluoxetin
	chinin	verapamil	ritonavir
	indinavir	vinkristin	saquinavir
	klaritromycin	zaleplon	
	kofein	zolpidem	
	kokain		
	kodein		
	lerkanidipin		
	lidokain		

Převzato z: <sup>12</sup>

#### 4.4 Regulace exprese cytochromů P450

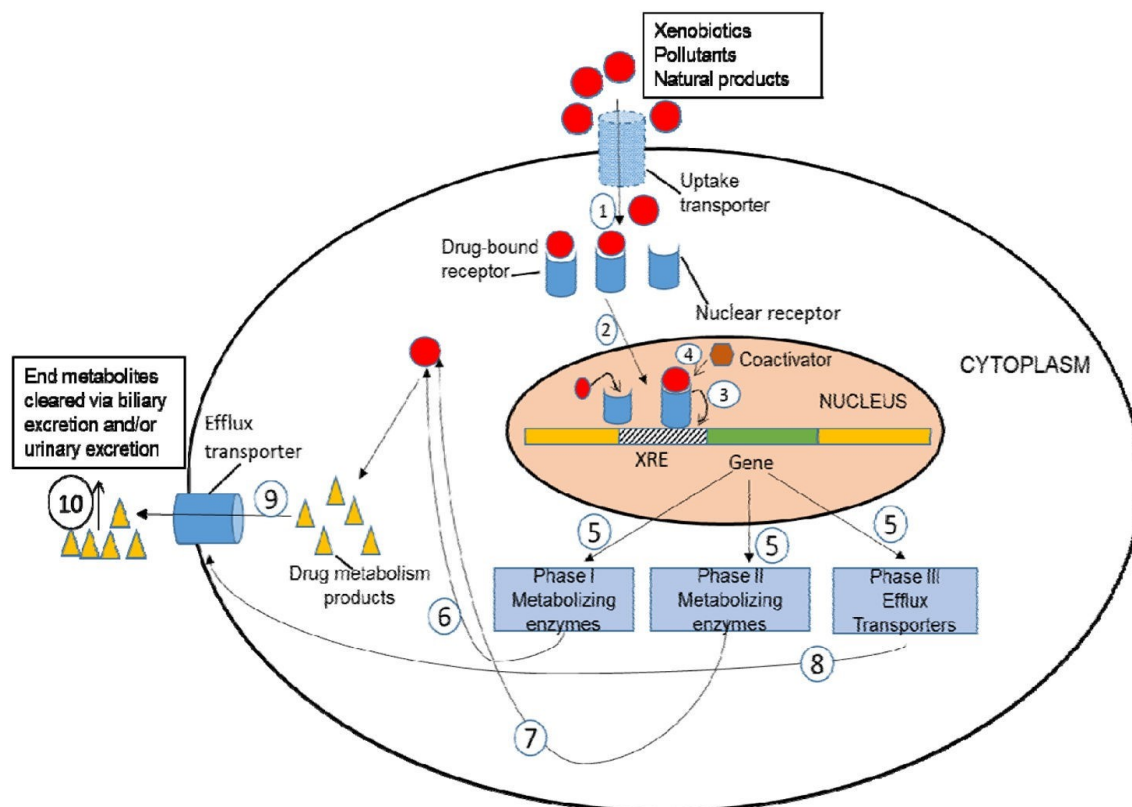
Množství CYP450 v lidském těle se mění v závislosti na mnoha faktorech. Příkladem může být výživa, věk, kouření, konzumace alkoholu a také působení léčiv. Bazální exprese enzymů CYP450 je řízena konstitutivními mechanizmy. Většina isoform CYP450 je navíc silně inducibilní, což znamená, že množství daného enzymu ve tkáních či orgánech může být signifikantně zvýšeno působením různých exogenních substancí včetně řady léčiv.<sup>14</sup>

Oproti inhibici, která produkuje okamžitou klinickou odpověď, je indukce pomalý regulovaný proces, jehož projevy se mohou objevit se zpožděním několika dnů až týdnů. Mezi významné lidské inducibilní formy patří CYP1A1, CYP2C9, CYP2E1 a CYP3A4.<sup>27</sup>

Následkem enzymové indukce je zvýšení celkového množství enzymu a tím zvýšení kapacity pro metabolismus léčiv. To může ovlivnit farmakologický efekt léčiva, jehož metabolismus je induktorem ovlivněn (dochází ke snížení terapeutického účinku až selhání terapie).<sup>29</sup> Ve většině případů indukce CYP450 zahrnuje změnu v transkripci a translaci příslušného genu.

V regulaci exprese CYP450 jsou důležité především jaderné receptory, které přeměňují extracelulární a intracelulární signály na buněčnou odpověď tím, že spouštějí transkripci cílových genů. Jejich ligandy jsou molekuly lipofilní povahy.<sup>21</sup> Rodina nukleárních receptorů je rozdělena na dvě hlavní skupiny, a to v závislosti na ligandech potřebných k aktivaci. První skupina se skládá z ligand-dependentních jaderných receptorů, která je regulována různorodou skupinou exogenních a endogenních substrátů. Jedná se například o glukokortikoidní receptor (GR) a receptor retinové kyseliny (RAR). Druhou skupinou jsou jaderné receptory zahrnující takzvané sirotčí (orphan) receptory, jejichž ligandy stále nebyly identifikovány, jsou to například receptory aktivované peroxizomovými proliferátory (PPARs), konstitutivní androstanový receptor (CAR) nebo pregnanový X receptor (PXR).<sup>32</sup> Tyto receptory patří mezi nejdůležitější a jsou schopny vytvářet heterodimery v jakékoli konfiguraci, což jim společně s velkým spektrem vázaných ligandů umožňuje vytvořit složitou a komplexní regulační síť.<sup>33</sup>

Mechanismus indukce je znázorněn na následujícím obrázku (viz Obr. 7).



Obr. 7 Jednotlivé kroky při indukci biotransformačních enzymů a efluxních transportérů. XRE- xenobiotic response element. Převzato z: <sup>34</sup>

Expres některých isoformů CYP450 je závislá na pohlaví a hlavní roli zde hraje růstový hormon (GH). Můžeme tak rozlišit nejméně dvě cesty transaktivace genu pro CYP450: 1) metabolickou, závislou na xenobiotiku nebo endogenní látce, zprostředkovanou jadernými receptory anebo 2) signální, spojenou s aktivací GH dependentních transkripčních faktorů.<sup>33</sup>

Základní roli v indukci jaterních isoformů CYP2, CYP3 a CYP4A hrají CAR, PXR a PPARs.<sup>29</sup> Oproti tomu expresi rodiny CYP1 (CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1) primárně regulují aryluhlovodíkové receptory (AhR), což jsou ligandem aktivované transkripční faktory. AhR jsou široce exprimované v lidských tkáních v placentě, srdci, játrech a jejich typickými ligandy jsou hydrofobní planární aromatické halogenované uhlovodíky vyskytující se mezi léčivy.<sup>21</sup>

Také expres efluxních transportérů je inducibilní a zahrnuje nukleární receptory. Některá chemoterapeutika mohou aktivovat nukleární receptory, a tím zvýšit expresi jak efluxních transportérů, tak metabolizačních enzymů, což následně

vede k poklesu vstřebávání ve střevě, zvýšení exkrece v játrech, případně snížení koncentrace aktivní formy léčiva v tumoru.

## 5. Mnohočetná léková rezistence v cytostatické protinádorové terapii

Chemoterapie společně s radioterapií a chirurgickou léčbou patří mezi hlavní možnosti léčby nádorových onemocnění. Odpověď na cytostatickou léčbu je dána různými faktory, mezi které patří věk pacienta, pohlaví, funkce eliminačních orgánů a další farmakoterapie. Důležitým faktorem je však i typ, aktivita a rozsah daného nádoru.<sup>35</sup>

Nádorové buňky jsou schopny odolávat účinkům cytostatik a tím způsobit selhání terapie. Pokud nádorové buňky nereagují na léčbu již při prvním kontaktu, jedná se o rezistenci primární (přírozenou), pokud dochází k postupnému snižování účinku léčby, hovoříme o sekundární (získané) rezistenci. Častým jevem je zkřížená rezistence, kdy se účinek projeví u strukturně podobných léčiv.

Mnohočetná léková rezistence (MDR z anglického termínu multidrug resistance) je speciální případ zkřížené rezistence, kdy se jednotlivá cytostatika liší jednak strukturou, ale také mechanismem účinku.<sup>36</sup>

Cytostatika, která jsou nejčastěji spojována s MDR jsou hydrofobní, amfifilní přírodní látky. Jako příklad lze uvést taxany (docetaxel a paklitaxel), antracykliny (doxorubicin, daunorubicin a epirubicin), epipodofylotoxiny (etoposid a teniposid), dále antimetabolity a topotekan.<sup>37</sup>

Vznik rezistence je spojován:

- a. Se změnou farmakokinetiky, příkladem lze uvést sníženou absorpci cytostatika, urychlení biotransformace, inaktivaci, vylučování.
- b. Se změnou cytokinety, kdy se nádorové buňky nacházejí v klidovém stavu a tím je omezena jejich náchylnost k farmakoterapii.
- c. Se změnou strukturní a funkční, kdy je ovlivněn transport léčiva do buňky a dochází ke zvýšení či snížení aktivity jednotlivých enzymů.

MDR představuje velkou komplikaci chemoterapie a zároveň velkou výzvu pro výzkum.

Mechanismy MDR lze rozdělit na farmakokinetické a farmakodynamické. Mechanismy vedoucí k poklesu léčiva v nádoru odpovídají farmakokinetické rezistenci a řadíme sem:

A) snížení influxu - většina léčiv proniká do nitra buňky pomocí pasivní difúze, endocytózy nebo facilitované difúze.

B) zvýšení efluxu, kdy rodina ATP-binding cassette (ABC) efluxních transportérů způsobí vyloučení léčiva vně buňky a tím pokles intracelulární koncentrace.

C) aktivaci detoxifikačního systému.

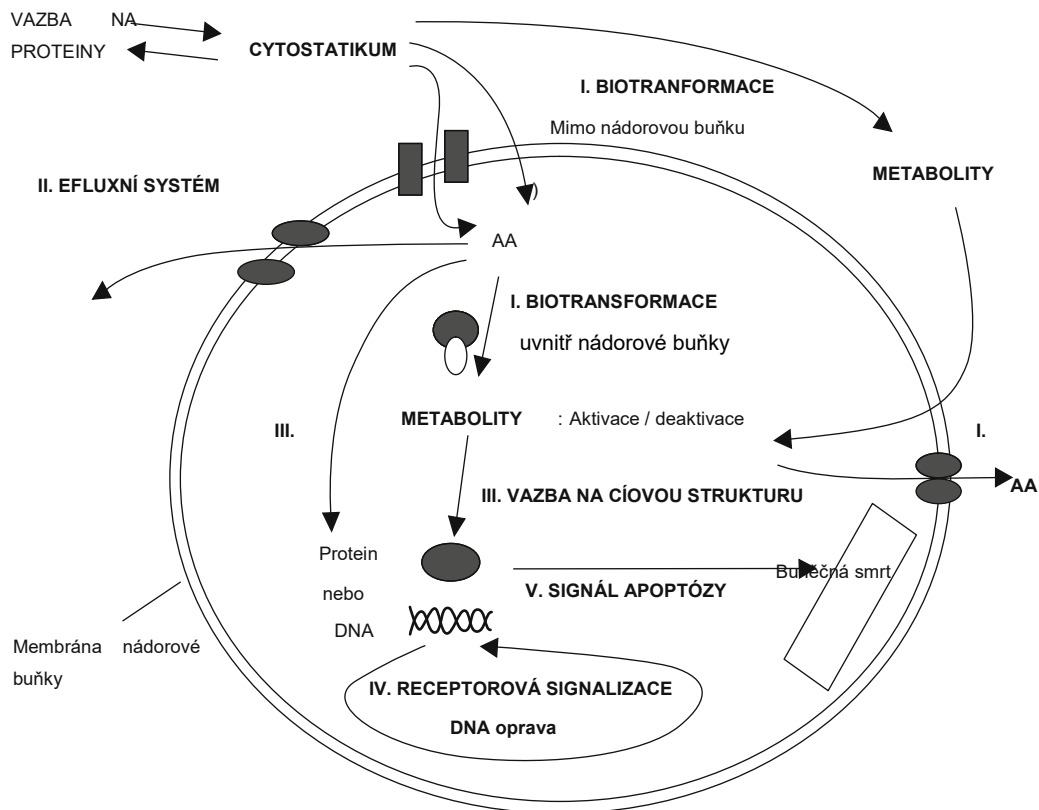
D) sekvestraci léčiva, kdy dochází vlivem pH k vychytávání léčiva v lysozomech a snížení celkové dostupné koncentrace.

U typické farmakokinetické lékové rezistence se jedná o rezistenci, za kterou je zodpovědný P-glykoprotein, ATP dependentní transmembránový protein o molekulové hmotnosti 170 kDa patřící do rodiny ABC transportérů. Tento protein je produktem *MDR1* genu a jde o efluxní pumpu, která způsobuje vylučování molekul léčiva z buňky. Svou aktivitou snižuje koncentraci cytostatika uvnitř nádorové buňky pod cytotoxickou hladinu, což vede k selhání terapie. Substrátem jsou molekuly se značně odlišnou strukturou. P-glykoprotein není jediným efluxním transportérem účastnícím se MDR. Mezi další transportéry, které hrají roli v MDR, patří breast cancer resistance protein (BCRP) a multidrug resistance associated protein 1 (MRP1). BCRP stejně jako P-glykoprotein snižuje koncentraci cytostatika uvnitř buňky a jeho fyziologická funkce je ochrana buňky vůči toxickým vlivům cizorodých látek. Typickými substráty BCRP jsou například analoga kamptotecinu, metotrexát a mitoxantron, oproti tomu cisplatina, vinblastin ani paklitaxel substráty pro BCRP nejsou. MRP1 o molekulové hmotnosti 190 kDa je transportní protein, který hraje roli při MDR, a který stejně jako P-glykoprotein snižuje intracelulární koncentraci léčiva a patří do rodiny ABC transportérů. Rodina MRP se skládá nejméně ze 6 členů, přičemž MRP1 a MRP2 mají společné spektrum substrátů.

Dalším mechanismem vzniku farmakokinetické MDR je změna detoxifikačních metabolických drah, rozdílná exprese metabolických enzymů, např. GST, a změny v distribuci.<sup>38,39</sup>

Oproti tomu biologické změny v nádorových buňkách vedou k rezistenci farmakodynamické, jako například A) změna specifických cílů léčiv, B) aktivace oprav DNA, C) modulace cest buněčné smrti a D) vliv mikroprostředí.<sup>40</sup>

Hlavní mechanismy rezistence, které se mohou objevit při léčbě cytostatiky, jsou uvedeny na následujícím obrázku (viz Obr. 8).



**Obr. 8 Osud cytostatika v nádorové buňce a možné mechanismy lékové rezistence. Modifikováno dle:** <sup>41</sup>



Výskyt mnohočetné lékové rezistence u některých cytostatik je uveden v tabulce (Tab. 8).

Tab. 8 Výskyt rezistence u některých cytostatik

MDR častá	MDR vzácná
aktinomycin D	bleomycin
doxorubicin	cisplatina
daunorubicin	cyklofosfamid
etoposid	cytosin
mitoxantron	arabinosid
taxol	5-fluorouracil
vinkristin	ifosfamid
	metotrexát
	topotekan

Převzato z: <sup>35</sup>

Ačkoli jsou CYP450 důležité pro detoxifikaci léčiv, některá léčiva, tzv. proléčiva, vyžadují nejdříve aktivaci pomocí systému CYP450. Proto exprese CYP450 v nádorech může významně ovlivnit působení chemoterapeutické léčby. Zvýšená exprese CYP450 většinou vede ke zvýšení detoxifikační aktivity a tím poklesu farmakologicky aktivní formy léčiva a selhání léčby. Pokud se však jedná o proléčiva, bude efekt opačný, při zvýšené aktivitě CYP450 se naopak bude koncentrace aktivní formy léčiva zvyšovat, což může mít za následek výskyt nežádoucích účinků léčiva.<sup>42</sup>

Efluxní transportéry a enzymy I. fáze metabolismu vytvářejí koordinovanou ochranu proti různým chemoterapeutikům. Synergický účinek vedoucí ke vzniku MDR může být zapříčiněn dvěma různými faktory. Jednak překryvem substrátové specifity a zároveň koordinovanou regulací jejich exprese. Některá chemoterapeutika mohou aktivovat jaderné receptory a tím zvýšit expresi jak efluxních transportérů, tak metabolizačních enzymů, což následně vede k poklesu vstřebávání ve střevě, zvýšení exkrece v játrech a snížení koncentrace v tumoru.<sup>43</sup> Onkologická léčiva jako docetaxel, doxorubicin, etoposid, imatinib, paclitaxel, tenoposid, vinblastin a vinkristin jsou substráty jak pro P-glykoprotein, tak pro CYP3A4, tento blízký překryv substrátové specifity a tkáňové exprese může vést k rozvoji MDR.<sup>40</sup>

Cytostatika jsou léky využívané k léčbě nádorových onemocnění, které ničí nádorové buňky. Jejich účinek však není specifický, a léčba je tak doprovázena mnoha nežádoucími účinky. Tyto účinky se liší dle typu cytostatik, byť řada z nich, jako např. alopecie, myelotoxicita, gastrointestinální toxicita aj., je společná pro všechna cytostatika.<sup>44</sup>

Cytostatika lze rozdělit podle mechanismu účinku na látky poškozující strukturu a funkci již přítomných nukleových kyselin, látky inhibující biosyntézu nukleových kyselin, sloučeniny poškozující mikrotubuly a inhibující mitózu a hormonální léčiva. Hlavní skupiny cytostatik jsou alkylační látky (deriváty dusíkatého yperitu, deriváty nitrosomočoviny a platinová cytostatika), antimetabolity (antagonisté kyseliny listové, analoga purinových bází, analoga pyrimidinových bází), rostlinné alkaloidy (vinka alkaloidy, podofylotoxiny, taxany), cytotoxická antibiotika (antracykliny, bleomyciny, mitoxantron) a hormony (hormony a analoga hormonů, hormonální antagonisté, aromatázové inhibitory).

Jednotlivá cytostatika, která jsou substráty CYP450, jsou uvedena v tabulce (Tab. 9).

Tab. 9 Cytostatika jako substráty pro cytochromy P450

<b>CYP450 enzym</b>	<b>Substrát</b>
<b>1A1</b>	docetaxel, erlotinib, tamoxifen
<b>1A2</b>	erlotinib, etoposid, flutamid, imatinib, tamoxifen
<b>2B6</b>	cyklofosfamid, ifosfamid, tamoxifen
<b>2C9</b>	cyklofosfamid, ifosfamid, imatinib, tamoxifen
<b>2C19</b>	cyklofosfamid, ifosfamid, imatinib, tamoxifen, teniposid
<b>2D6</b>	imatinib, tamoxifen, vinorelbin
<b>2E1</b>	cisplatina, etoposid, tamoxifen, vinorelbin
<b>3A4/5</b>	cisplatina, cyklofosfamid, cytarabin, dexametazon, docetaxel, doxorubicin, erlotinib, etoposid, exemestan, flutamid, fulvestrant, gefitinib, ifosfamid, imatinib, irinotecan, letrozol, medroxyprogesteron acetát, mitoxantron, paclitaxel, tamoxifen, targretin, teniposid, topotecan, vinblastin, vincristin

Převzato z: <sup>42</sup>

## 5.1 Biotransformace cytostatik cytochromy P450

Pro pochopení role biotransformačních enzymů v rezistenci nádorových buněk vůči standardním cytostatikům bude v následujících podkapitolách uveden metabolismus vybraných cytostatik v závislosti na tom, zda je aktivační nebo deaktivující. Identifikovat, které enzymy z nadrodiny CYP450 přispívají přesně a do jaké míry k celkové metabolizační cestě léků, je komplikované téma. Studie využívají klonování cDNA a expresi rekombinantních forem CYP450, která mohou poskytnout důležité informace o enzymech schopných metabolizovat specifický substrát a také o afinitě a maximální rychlosti (nicméně tato metoda nezohledňuje rozmanitost obsahu různých CYP450 proteinů v játrech). Oproti tomu metody využívající lidské jaterní mikrosomy mají výhodu ve studiu CYP450 v jejich reálné proteinové koncentraci a v kombinaci se specifickým inhibitorem CYP450 mohou být identifikovány CYP450, které se přímo podílí na určitých reakcích metabolismu dané látky.

Často až změněná farmakokinetika nebo farmakodynamika u pacienta s deficitem CYP450 objasní význam daného konkrétního enzymu v metabolismu léku.<sup>23</sup>

### 5.1.1 Cytostatika aktivovaná enzymy CYP450 nebo jejichž metabolity jsou cytostaticky aktivní

Cyklofosfamid je jedno z nejpoužívanějších cytostatik, řadí se mezi alkylační látky, deriváty dusíkatého yperitu a je podáván jako prolečivo, které vyžaduje bioaktivaci pomocí enzymů CYP450.<sup>45</sup> Aktivace cyklofosfamidů na 4-hydroxycyklofosfamid je katalyzována jaterními CYP450, konkrétně isoenzymy CYP2B6, 2C9, 2C19 a 3A4/5.<sup>46</sup> Z toho CYP2B6 se na metabolismu podílí zhruba z 45 %.<sup>47</sup> Ve II. fázi dochází k inaktivaci primárně konjugací za účasti GSTs. Mezi 4-hydroxycyklofosfamidem a jeho aldehydickým tautomerem s otevřeným kruhem, aldofosfamidem, je rovnováha. Aldofosfamid je spontánně neenzymaticky přeměňován na akrolein a fosforamid, což je účinný alkylační metabolit. 4-hydroxycyklofosfamid a fosforamid jsou přeměňovány pomocí GST na příslušné deriváty. Aldofosfamid je inaktivován aldehyddehydrogenázou.<sup>46</sup>

Ifosfamid patří do stejné skupiny jako cyklofosfamid a obdobně jako on vyžaduje iniciační aktivační krok a to 4-hydroxylaci a tím vznik 4-hydroxyifosfamid.<sup>47</sup>

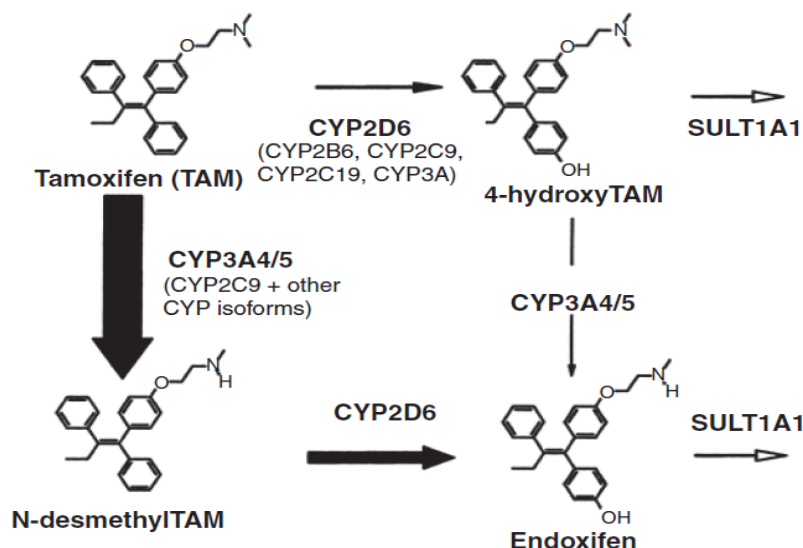
Thiotepa a její desulfurovaný metabolit triethylenfosforamid způsobují DNA zlomy zesíťováním. Jaterní CYP3A4 a CYP2B6 jsou hlavní enzymy zapojené do rychlého vzniku triethylenfosforamid oxidativní desulfurací. Thiotepa a triethylenfosforamid jsou substráty pro následný metabolismus a konjugaci s glutathionem pomocí GSTs.

Prokarbazin je substrátem pro několikastupňovou aktivační reakci zahrnující CYP450, a to konkrétně CYP1A1, CYP1A2 a CYP2E1. Po metabolismu prokarbazinu byly identifikovány tři cytostaticky aktivní produkty, primární azoprokarbazin a následně jeho azoxy izomerní sloučeniny vznikající při metabolismu azoprokarbazinu, kterými jsou methylazoxyprokarbazin a benzylazoxyprokarbazin.<sup>48, 49</sup>

Tegafur je proléčivo, jehož aktivací vzniká 5-fluorouracil. Na bioaktivaci se podílí CYP2A6 a v menší míře také CYP1A2 a CYP2C8.

Podofylotoxiny etoposid a teniposid jsou podávány intravenózně a mají významnou terapeutickou účinnost při léčbě nádorů varlat, dětské leukémii, lymfomů a rakovině plic. Po intravenózní aplikaci je přibližně 50 % z celkové dávky vyloučeno močí ve formě nezměněné či ve formě glukuronidu. Metabolismu se účastní CYP3A4 a CYP3A5, které umožňují 3-O-demethylaci a tím vznik aktivního metabolitu schopného inhibice topoisomerázy II.<sup>50, 51</sup> GST1/GSTP1 a UGT1A1 jsou hlavní inaktivační enzymy vedoucí ke vzniku konjugátů s glutathionem nebo glukuronidů.

Tamoxifen je syntetický nesteroidní antagonist estrogenu a je využíván při léčbě karcinomu prsu. V těle je tamoxifen metabolizován na účinné metabolity za účasti CYP450. CYP3A4/5 jsou hlavní isoformy zodpovědné za přeměnu tamoxifenu na N-desmethyltamoxifen, který je následně metabolizován pomocí CYP2D6 na aktivní endoxifen. Na následujícím obrázku je patrné zapojení jednotlivých isoform CYP450 do metabolismu tamoxifenu (viz Obr.9).



Obr. 9 Biotransformace tamoxifenu a jeho metabolitů. Převzato z: <sup>52</sup>

Antimitotické vinka alkaloidy vinblastin, vinkristin, vindesin a vinorelbin jsou široce užívané látky, jednak samostatně, ale také v kombinační protinádorové terapii. Vinblastin a vinkristin byly původně izolovány z rostliny *Catharanthus roseus*. Vindesin a vinorelbin jsou semisyntetické sloučeniny.<sup>53</sup> Vinka alkaloidy inhibují buněčnou proliferaci vazbou na mikrotubuly, což vede k mitotickému bloku a apoptóze. Jsou charakterizovány vysokým distribučním objemem, rychlou a úplnou plazmatickou clearance a terminálním biologickým poločasem. U lidí je hlavní eliminační cestou vinka alkaloidů exkrece stolicí. Farmakokinetika je závislá na dávce a čase a vykazuje značné intra a interindividuální rozdíly<sup>54</sup>, které jsou patrně způsobené v důsledku metabolismu CYP450.<sup>55</sup>

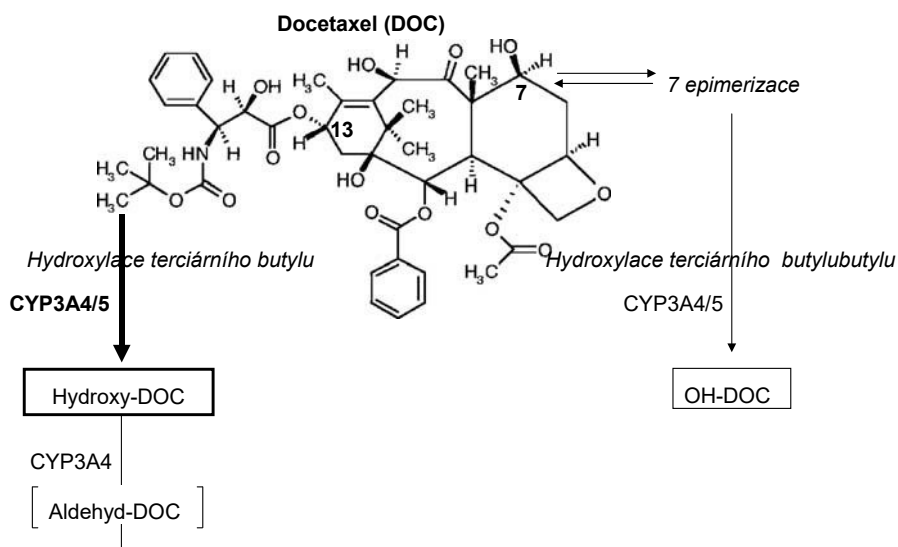
Do skupiny vinka alkaloidů, jejichž metabolity jsou více aktivní než parentní látka můžeme zařadit vinblastin, který je metabolizován na deacetylvinblastin. Do metabolismu je zapojen CYP3A.<sup>56</sup> Jako další lze uvést vinorelbin, který je metabolizován na jeho hlavní aktivní metabolit 4-O-deacetylvinorelbin a další dva minoritní metabolity, ty jsou přibližně stejně aktivní jako parentní látka. Hlavním enzymem účastnícím se přeměny je CYP3A4.<sup>57</sup>

Flutamid je nesteroidní antiandrogen využívaný při léčbě rakoviny prostaty. Jedná se o prolečivo, které musí podstoupit metabolickou hydroxylaci na CYP450 a to isoformách CYP1A1, 1A2 a 1B1.<sup>58</sup>

Aktivovaná léčiva nejsou obětí farmakokinetické MDR zprostředkované biotransformačními enzymy, neboť hladina aktivního cytostatika se zvyšuje. Léčba tedy neselhává vlivem zvýšené metabolizační aktivity, naopak může být účinnější, avšak s možným nadměrným výskytem nežádoucích účinků, jelikož terapeutické rozmezí cytostatik je úzké.

### 5.1.2 Cytostatika deaktivovaná enzymy CYP450

Taxany paklitaxel a docetaxel jsou často používaná cytostatika, obě léčiva jsou metabolizována pomocí CYP450 na neaktivní metabolity, které jsou z organismu vylučovány do žluči a následně stolicí. I přesto, že mají látky podobnou chemickou strukturu, jsou oxidovány dvěma různými enzymy. CYP2C8 je hlavní enzym zodpovědný za 6-hydroxylaci taxanového kruhu paklitaxelu a CYP3A4/5 se účastní oxidace docetaxelu na terciární butylové skupině postranního řetězce na C13<sup>59</sup> a také metabolismu paklitaxelu<sup>60</sup> (viz Obr. 10).

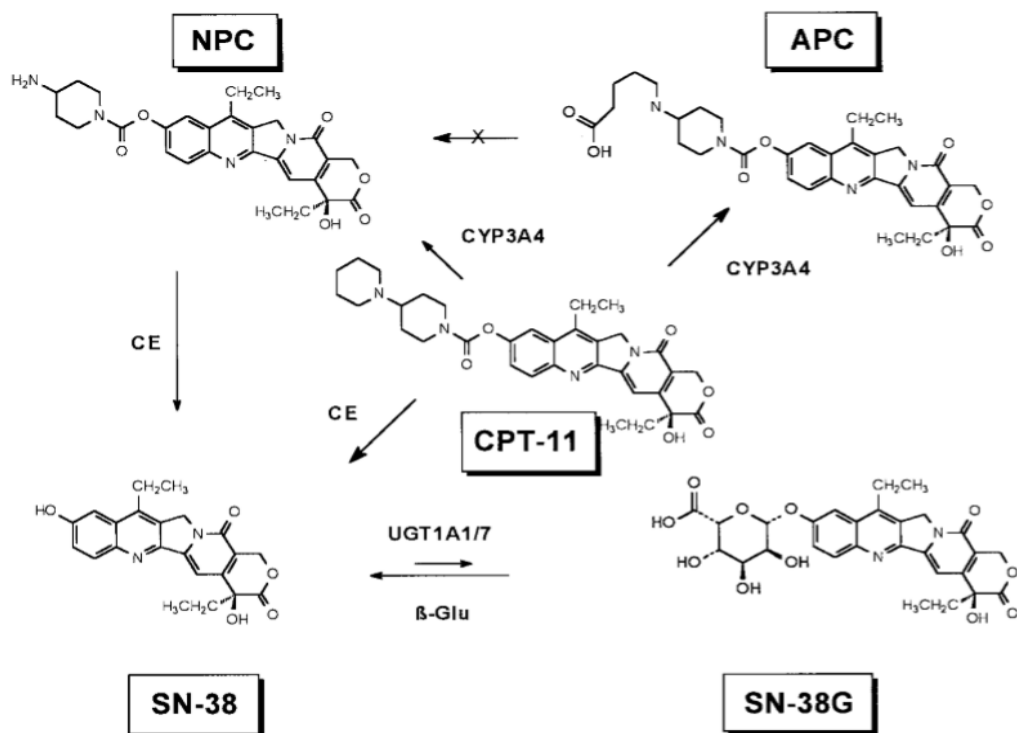


Obr. 10 Metabolismus docetaxelu. Převzato z: <sup>22</sup>

Mezi vinka alkaloidy, jejichž aktivita je vlivem CYP450 značně redukována, patří vinkristin. *In vitro* a *in vivo* data poukazují na dominantní roli CYP3A enzymů při eliminaci vinkristinu. CYP3A4 a CYP3A5 jsou jediné isoenzymy z nadrodiny CYP450, které jsou zodpovědné za vznik hlavního metabolitu M1, jenž je

mnohem méně aktivní než mateřská látka.<sup>61</sup> Při vzniku M1, sekundárního aminu, byl efektivnější katalyzátor CYP3A5 než CYP3A4<sup>62</sup> a výzkumy naznačují, že změny v expresi CYP3A5 mohou značně ovlivnit clearance vinkristinu.<sup>63</sup> Nejčastějším a nejdůležitějším nežádoucím účinkem při léčbě vinkristinem je neurotoxicita.<sup>64</sup> Léky, které jsou potenciálními induktory neurotoxicity vinkristinu, jsou látky, které inhibují enzymy CYP3A nebo inhibitory ABCB1. Jako příklad lze uvést nifedipin, cyklosporin a itrakonazol.<sup>63</sup> Oproti tomu karbamazepin a fenytoin jako induktory systému CYP3A zvyšují clearance vinkristinu a tím snižují jeho neurotoxicitu.<sup>65</sup>

Studie poukazují na to, že irinotekan, derivát kamptotecinu, který způsobuje inhibici topoizomerázy I, je značně metabolizován v játrech a následně vyloučen žlučí. Metabolické cesty se účastní různé enzymy jako jsou karboxylesteráza, UGTs a CYP3A4. Přeměna irinotekanu na aktivní metabolit SN-38 je zprostředkována karboxylesterázou, ten je vyloučen v neaktivní formě za účasti UGTs. Oproti tomu CYP3A4 je zodpovědný za přeměnu irinotekanu na velmi málo cytotoxicky aktivní metabolity (APC a NPC)<sup>66</sup> (viz Obr. 11). Murry et al. publikoval případ, kdy současné podávání silného induktoru CYP3A4, fenytoinu, zapříčinil snížení koncentrace aktivního metabolitu SN-38 vlivem urychleného metabolismu irinotekanu na neaktivní formu pomocí CYP3A4.<sup>67</sup>



**Obr. 11 Metabolismus irinotekanu.** APC a NPC – málo aktivní metabolity irinotekanu, SN-38 – aktivní metabolit irinotekanu, CE- karboxylesteráza **Převzato z:** <sup>66</sup>

Cytostatika jsou obvykle metabolizována řadou paralelních nebo sekvenčních reakcí a CYP450 mohou vlivem jejich deaktivace zapříčinit metabolickou farmakokinetickou rezistenci. Obvykle však až zapojení biotransformačních enzymů II. fáze zapříčiní úplnou ztrátu cytotoxického účinku, takže jejich účast na tomto fenoménu má pravděpodobně rozhodující roli.



### 5.1.3 Cytostatika, jejichž metabolismus není závislý na CYP450

Doxorubicin a daunorubicin jsou přírodní antracykliny, zatímco idarubicin a epirubicin jsou analoga. Přibližně 50 % doxorubicinu je z těla vyloučeno v nezměněné podobě. Druhých 50 % je metabolizováno, a to hlavně pomocí redukce ketonu na C13 na hlavní hydroxy metabolit doxorubicinol, jenž je mnohem méně aktivní než parentní látka. Redukce je katalyzována pomocí lidských enzymů redukujících karbonylovou skupinu.<sup>68</sup> Podobná situace platí i pro ostatní antracykliny.

Topotekan, jehož protinádorová aktivita spočívá v inhibici topoizomerázy I, je užíván například při metastazujícím karcinomu ovaríí. Reverzibilní interkonverze mezi formou aktivní se zavřeným kruhem-laktonovou formou a inaktivní s otevřeným kruhem s hydroxylovou kyselinou závisí na pH. Metabolismus v játrech není příliš důležitý a zahrnuje N-dealkylaci a glukuronidaci. N-demetylovaný metabolit má podobnou aktivitu jako mateřská látka. Topotekan je metabolizován převážně hydrolýzou laktonového kruhu za vzniku karboxylátu s otevřeným kruhem.<sup>69,70</sup>

Fludarabin fosfát je rychle defosforylován, následně vstupuje do buněk, kde je přeměněn pomocí kinázy na aktivní trifosfát, který je schopen inhibice ribonukleotidreduktázy, DNA polymerázy alfa, delta a epsilon, DNA primázy a DNA ligázy a tím inhibuje syntézu DNA.<sup>71</sup>

Thiopuriny, 6-merkaptopurin a 6-thioguanin jsou užívány převážně na léčbu akutní leukémie. 6-merkaptopurin je předmětem rozsáhlého metabolismu v játrech. Enzym hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza je zodpovědný za bioaktivaci thiopurinů. Oproti tomu thiopurin S-methyltransferáza a xantinoxidáza jsou enzymy katalyzující katabolické reakce thiopurinů. Vzhledem k účasti xantinoxidázy na metabolismu thiopurinů je při léčbě vhodné zvážit lékovou interakci s allopurinolem, inhibitorem xantinoxidázy.<sup>72</sup>

Cytarabin a gemcitabin. Cytarabin neboli cytosinarabinosid je antimetabolit ze skupiny pyrimidinů, který se využívá především k léčbě akutní myeloidní leukemie. Gemcitabin je využíván převážně k léčbě solidních nádorů. Metabolismus obou látek je podobný. Obě látky jsou postupně fosforylovány pomocí kináz, což jsou enzymy zodpovědné za bioaktivační proces. Po

bioaktivaci dochází ke vzniku trifosfátu, který je inkorporován do DNA. Více než 90 % je inaktivováno na difluorodeoxyuridin a uracil arabinosid pomocí cytidindeaminázy. Zbývá tak velmi malé množství látky schopné cytotoxického efektu.<sup>73</sup>

5-fluorouracil je často užívané cytostatikum k léčbě například kolorektálního karcinomu převážně v kombinaci (oxaliplatina nebo irinotekan). Dihydropyrimidindehydrogenáza je počáteční enzym zahajující metabolismus 5-fluorouracilu výsledkem je vznik neaktivního metabolitu dihydrofluorouracilu, který je následně přemeňován dalšími enzymy. Aktivační cesta je naopak důležitá pro přeměnu 5-fluorouracilu na aktivní metabolit monofosfát a následnou inhibici thymidylátsyntázy.<sup>74</sup>

Metotrexát je analog kyseliny listové, jenž je využíván k léčbě rakoviny a také autoimunitních chorob. Metotrexát je velmi rychle intracelulárně přeměňován na polyglutamát metotrexátu, který se hromadí v buňce a inhibuje enzymy důležité pro tvorbu purinů a pyrimidinů.<sup>75</sup> Interindividuální variabilita při léčbě metotrexátem je zapříčiněna genetickou rozdílností exprese membránových transportních proteinů s afinitou k metotrexátu.<sup>76</sup>

Busulfan je vysoce lipofilní látka, která snadno prostupuje přes membrány. Je značně metabolizován a pouze méně než 2 % procenta jsou vyloučeny ledvinami v nezměněné podobě. Busulfan je primárně metabolizován v játrech konjugací s glutathionem pomocí GSTs.<sup>77</sup> Hlavní cesta biotransformace busulfanu je přes enzym GSTA1, který je nejvíce exprimován v játrech. U člověka existuje výrazná interindividuální rozdílnost v expresi GSTs a byl prokázán také genetický polymorfismus. Výsledkem může být rozdílná reakce na léčbu busulfanem u jednotlivých pacientů.<sup>78</sup> Při léčbě busulfanem je doporučeno terapeutické monitorování hladiny léčiva, aby se předešlo nežádoucím účinkům.

Chlorambucil, patří mezi alkylační cytostatika, deriváty dusíkatého yperitu, a na rozdíl od cyklofosfamidu nemusí být předem aktivován. Jeho metabolismus spočívá v  $\beta$ -oxidaci kyseliny máselné, která je součástí postranního řetězce.<sup>79</sup> K rezistenci na léčbu chlorambucilem dochází vlivem zvýšené exprese glutathionu a tím zvýšené aktivity GSTs, které mají za úkol bránit buňku před cizorodými látkami, jedná se o získanou (sekundární) rezistenci.<sup>80</sup>

Melfalan, patří rovněž mezi alkylační látky, deriváty dusíkatého yperitu, nepodstupuje metabolickou aktivaci a je inaktivován v plazmě neenzymatickou hydrolýzou na monohydroxymelfalan a dihydroxymelfalan.<sup>81</sup> Okolo 10-15 % podané dávky melfalanu je eliminováno renální exkrecí v nezměněné formě.

Je tedy zřejmé, že existuje mnoho cytostatik, jejichž metabolismus není závislý na CYP450, a proto při zvýšené expresi a aktivitě enzymů CYP450 nedochází ke změně farmakokinetiky ani terapeutického efektu po podání daného cytostatika. Tento jev naopak nelze vyloučit u cytostatik, na jejichž metabolismu se podílí biotransformační enzymy II. fáze. Tato oblast však není předmětem této diplomové práce.

## **5.2 Exprese cytochromů P450 v nádorech**

Výskyt CYP450 v nádorech byl zjišťován v mnoha studiích, za využití různých metod k detekci hladiny CYP450, jako příklad lze uvést měření biotransformační aktivity, imunohistochemické metody s využitím protilátek, detekce mRNA a další. Názory na jejich výskyt se značně liší, a to především vezmeme-li v úvahu starší studie. Přítomnost jednotlivých forem CYP450 byla v minulosti zkoumána u rakoviny plic (Toussaint et al.,1993)<sup>82</sup>, prsu (Albin et al.,1993)<sup>83</sup> nebo střev (Peters et al.,1992)<sup>84</sup> za účelem poukázat na změnu metabolismu protinádorových léčiv a odpovědi organismu na léčbu. Tyto starší studie obecně ukázaly, že hladina CYP450 v nádorové tkáni je výrazně redukována či CYP450 oproti normální tkáni nejsou vůbec přítomny. Nicméně jiné studie, například podle Murray et al., 1997, poukazují na zvýšený výskyt CYP450 a to především formy CYP1B1, ta se zdá být nadměrně exprimována v různých typech nádorů, nicméně ve zdravé tkáni téměř nebyla detekována.<sup>85</sup> Účast CYP450 na rozvoji rakovinného bujení je zprostředkována především metabolickou aktivací kancerogenů jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, heterocyklické aminy, nitrosoaminy a alkylační látky. CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4/5 jsou hlavní CYP450 účastníci se metabolismu kancerogenů.<sup>86</sup>

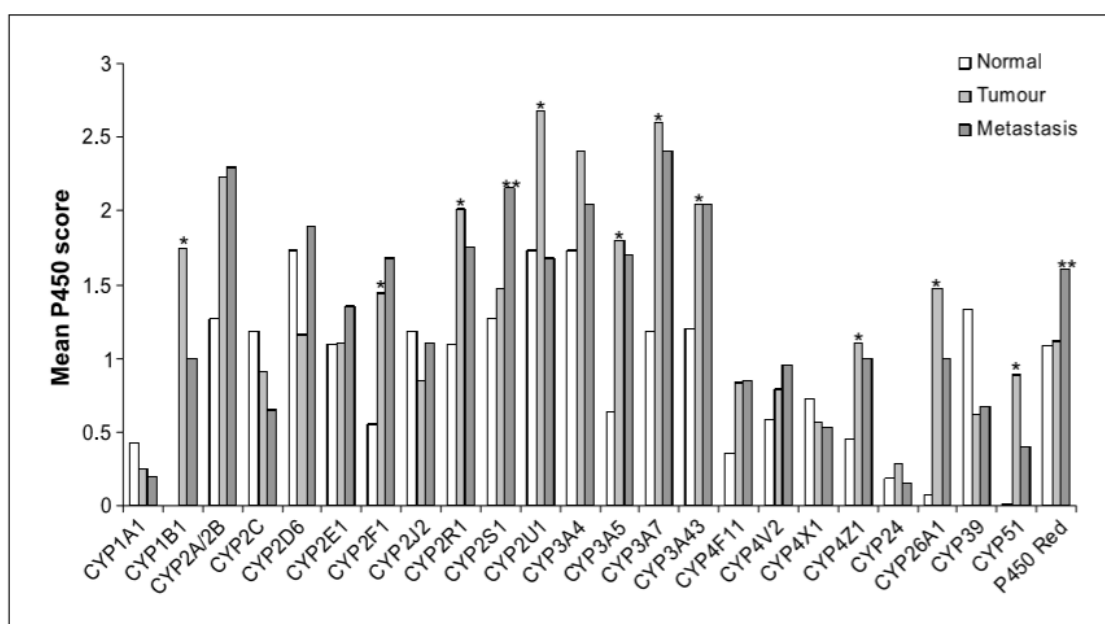
Výskyt CYP450 a jejich stanovení u rakoviny prsu má význam pro léčbu a prognózu pacientek, jelikož jsou to hlavní enzymy zprostředkovávající metabolismus estrogenu a tím se přímo účastní iniciace a progresu rakoviny

prsu.<sup>87</sup> Estrogeny jsou známy jako růstové faktory, které podporují růst rakovinných buněk a biosyntéza estrogenů z androgenů je katalyzována aromatázou, tedy CYP19. Nedávné studie věnující se expresi a regulaci genu CYP19 odhalily důležitou roli v lokální expresi ve tkáních, které regulují hladinu buněčného estrogenu.<sup>88</sup> Intratumorální produkce estrogenu má význam pro proliferaci rakovinných buněk u nádorů prsu, především u postmenopauzálních žen. Více než 70 % karcinomů prsu je totiž estrogen dependentní a aromatáza exprimovaná v buňkách rakoviny prsu je upregulována ve srovnání se zdravými buňkami.<sup>89</sup> Další forma CYP450 exprimovaná u rakoviny prsu je isoforma CYP1B1 přeměňující 17 $\beta$ -estradiol na rakvinotvorný 4-hydroxyestradiol, což naznačuje, že zvýšená exprese v prsní tkáni může být spojena se zvýšeným rizikem rozvoje rakoviny prsu. Výskyt CYP1A1 a CYP3A4, které katalyzují konverzi estradiolu na nekarcinogenní 2-hydroxyestradiol, může buňky chránit, zároveň však může negativně ovlivnit metabolismus cytotoxických léčiv. Proto je exprese cytochromů v prsní a okolní tkáni velmi zajímavým předmětem výzkumu. Bylo identifikováno mnoho isoform CYP450 vyskytujících se u rakoviny prsu a byla prokázána exprese CYP1A1. Ve studii Goth-Goldstein et al., 2000 bylo zjištěno, že exprese CYP1A1 je vyšší u rakoviny prsu ve srovnání se zdravou tkání.<sup>90</sup> Oproti tomu ve studii El-Rayes et al., 2003, která testovala expresi CYP1A1, 2B6, 2E1 a 3A4 bylo prokázáno výrazné snížení hladiny CYP450 v maligní tkáni ve srovnání se sousední morfoloicky normální tkání.<sup>91</sup> Ve studii Murray et al., 1993 bylo testováno 54 vzorků u pacientek s rakovinou prsu v rozmezí 31-80 let na přítomnost biotransformačních enzymů konkrétně epoxidhydrolázy, CYP450, a to isoform CYP1A a CYP3A a také na tři isoformy GSTs. Pouze u jednoho tumoru nebyl nalezen ani jeden metabolický enzym, zatímco ostatní zkoušené vzorky vykazovaly pozitivní imunoreakci nádorových buněk alespoň na jeden. 21 vzorků z 54 vykazovalo pozitivní imunoreakci na CYP1A a 12 vzorků na přítomnost CYP3A.<sup>92</sup>

Další zajímavé výsledky přinesl výzkum zabývající se expresí CYP450 u primární rakoviny a metastazující rakoviny vaječníků, kdy ve zdravých vaječnících byly nalezeny všechny testované CYP450 kromě CYP1B1. Enzymy, které byly nejčastěji exprimovány a vykazovaly nejvyšší úroveň intenzity imunoreakce byly CYP2U1 a CYP3A4, zatímco většina ostatních CYP450 vykazovala slabou až

střední imunoreaktivitu. U rakoviny vaječníků měly pozitivní imunoreakci všechny zkoušené CYP450 a všechny byly ve zvýšené míře exprimovány, s výjimkou CYP1A1, CYP4F11, CYP24 a CYP39 v porovnání se zdravými ovarii. Největší procento silné positivity bylo pozorováno u CYP2U1 a CYP3A7. Zvýšená intenzita byla pozorována také u CYP1B1, CYP2A, CYP2B, CYP3A4, CYP3A5 a dalších v porovnání s normálními vaječníky.<sup>93</sup>

Následující obrázek (viz Obr. 12) shrnuje výsledky výzkumu ve formě grafu.



Obr. 12 Výskyt CYP450 ve zdravých vaječnicích, u primární rakoviny a u metastazující rakoviny ovarii. Převzato z: <sup>93</sup>

Jelikož plíce jsou hlavním cílem pro inhalované toxické látky a většina z nich podstoupí metabolickou přeměnu přes CYP450 na více reaktivní produkty, je exprese CYP450 ve zdravé plicní, ale také nádorové tkáni, důležitým předmětem výzkumu. Již zmíněná starší studie z roku 1993 (Toussaint et al.) zabývající se expresí CYP450 u rakoviny plic uvádí ve svých výsledcích sníženou hladinu CYP1A1 a CYP1A2. U ostatních isoform se nepodařilo nalézt žádnou odpověď a jejich přítomnost tak nebyla prokázána.<sup>82</sup> Kivisto et al., 1996, identifikovali přítomnost CYP3A5 jako hlavního enzymu z rodiny CYP3A u nemalobuněčného karcinomu plic, zatímco CYP3A4 mRNA nebyla nalezena v žádném tumoru.<sup>94</sup> Fujitaka et al., 2001 poukazují na přítomnost CYP2C u rakoviny plic, kdy se tento enzym vyskytoval v nadměrné míře v nádorové tkáni.<sup>95</sup> Hladina CYP2E1,

enzymu běžně přítomného v plicní tkáni, naopak při nádorovém bujení klesá.<sup>96</sup> Obecně neexistují důkazy, které by dokázaly expresi CYP3A4 jak v nádorové, tak peritumorální plicní tkáni. V následující tabulce je pro názornost zobrazeno, zda hladina v nádoru ve srovnání se zdravou tkání klesá nebo roste (Tab.10).

Tab. 10 Růst či pokles isoformů CYP450 u rakoviny plic.

CYP450	Efekt	Použitá metoda
1A1	↓ ↑ (kuřáci) ↑	protein mRNA aktivita
1A2	↓	protein
1B1	↑	protein, mRNA, aktivita
2A6	↑ (kuřáci)	aktivita
2B7	↓	mRNA
2C	↑	mRNA
2D6	↑	protein
2E1	↓	protein, mRNA, aktivita
3A4	→	mRNA
3A5	↑	protein, mRNA
4B1	↓	mRNA

↑ zvýšení, ↓ snížení, → žádná změna. Převzato z: <sup>97</sup>

Ve výzkumu Dhaini et al., 2003 byla zkoumána exprese hlavních forem CYP450: CYP1A1, 1A2, 1B1, 2B6, 2D6, 3A4 a 3A5 za účelem zjistit roli CYP450 u pacientů s osteosarkomem. Výsledkem byl výskyt forem CYP1A1 a 1A2, CYP1B1, CYP3A4 a 3A5, zatímco formy 2B6 a 2D6 nebyly detekovány.<sup>98</sup>

Výzkum z roku 1993 zabývající se expresí CYP450 v tlustém střevě zjistil, že 75 % vzorků karcinomu tlustého střeva vykazovalo pozitivní imunoreakci na přítomnost CYP1A a na CYP3A bylo pozitivních 65 % vzorků. U vzorků adenomu tlustého střeva byla přítomnost jak CYP1A, tak CYP3A 100 %.<sup>99</sup> Zdá se, že v rodině CYP1 má CYP1B1 predominantní úlohu u rakoviny tlustého střeva, zatímco CYP1A1 u střeva zdravého. Další výzkum poukazuje na výrazně

zvýšenou imunoreaktivitu pro CYP1B1, CYP2S1, CYP2U1, CYP3A5 a CYP51 u kolorektálního karcinomu v porovnání se zdravým tlustým stěvem. Nicméně na CYP1A1, CYP2F1, CYP2R1, CYP4F11, CYP4V2 a CYP4Z1 byla většina vzorků negativní.<sup>100</sup> Oproti tomu již zmíněná studie z roku 1992 (Peters et al.), srovnávající výskyt metabolizačních enzymů v mukóze zdravého tlustého střeva a u karcinomu ve svých výsledcích udává celkové snížení hladiny CYP450 oproti výraznému zvýšení hladiny GSTs.<sup>84</sup>

U 51 vzorků rakoviny prostaty od pacientů ve věku 60-92 let byla zjišťována exprese metabolizačních enzymů. Každý vzorek vykazoval přítomnost minimálně jednoho enzymu. Přítomnost CYP1A byla identifikována u 32 vzorků (63 %), CYP2C u 13 vzorků (25 %) a CYP3A u 31 vzorků (61 %). Hlavní forma CYP450 účastnící se metabolické inaktivace androgenů je CYP3A, přítomnost této formy u rakoviny prostaty poukazuje na možné snížení efektu androgenů na rozvoj rakoviny prostaty díky intratumorálnímu metabolismu. Navíc přítomnost CYP1A a CYP3A díky metabolické aktivaci zvyšuje účinnost antiandrogenního cytostatika flutamidu využívaného v léčbě nádorů prostaty.<sup>101</sup>

Většina CYP450, které jsou důležité pro metabolismus léčiv, jsou přítomny také u hepatocelulárního karcinomu. Zatímco některé studie poukazují na snížení hladiny a aktivity CYP450<sup>102</sup>, u jiných naopak výsledky vykazují značnou interindividuální rozdílnost.<sup>103</sup>

Zvýšená exprese jednotlivých isoform CYP450 byla také zjištěna u různých dalších typů nádorů včetně jícnu, žaludku, močového měchýře.<sup>104</sup>

Isoformou, která se vyskytuje téměř ve všech nádorech, je CYP1B1. Imunochemickými metodami byla prokázána její přítomnost u rakoviny prsu, kolorektálním karcinomu, rakoviny plic, jícnu, lymfatických uzlin, mozku a varlat, v přilehlé zdravé tkáni však nebyla přítomna. Přítomnost CYP1B1 v nádorech poukazuje na jeho zásadní endogenní funkci v nádorových buňkách a může také přispět k rezistenci vůči cytostatikům.<sup>85</sup> Interakce některých běžně užívaných cytostatiky s isoformou CYP1B1 budou podrobněji probrány v následující kapitole. Výzkum jejich exprese v různých typech nádorů je shrnut v následující tabulce (Tab. 11).

Tab. 11 Výskyt CYP1B1 u zdravé a nádorové tkáně.

typ tkáně	normální (počet pozitivních/počet vzorků)	tumor (počet pozitivních/počet vzorků)
močový měchýř	0/8	8/8
mozek	0/12	11/12
prsa	0/10	12/12
tlusté střevo	0/10	11/12
pojivová tkáň	0/9	8/9
jícen	0/8	8/8
ledviny	0/11	11/11
játra	0/8	netestováno
plice	0/8	7/8
lymfatické uzliny	0/5	9/9
vaječníky	0/5	7/7
kůže	0/6	6/6
tenké střevo	0/5	netestováno
žaludek	0/10	9/10
varle	0/8	8/8
děloha	0/7	7/7
celkem	0/130	122/127

Převzato z: <sup>85</sup>

Expresí CYP450 se liší především jednotlivými isoformami, které jsou typické pro určitý typ nádoru. Rozdílnost v expresi může také zapříčinit interindividuální variabilita.

### 5.3 Role cytochromů P450 ve fenoménu mnohočetné lékové rezistence

Rezistence nádorů na léčbu cytostatiky může být způsobena velkým množstvím faktorů, přičemž metabolismus léčiv se řadí mezi jeden z nich. Na rezistenci lze pohlížet jako na zcela přirozenou věc, protože enzymy účastníci se metabolismu léčiv byly evolučně vyvinuty jako ochranné prostředky a ve spolupráci s ABC efluxními transportéry mají za úkol chránit buňky proti toxickým látkám.

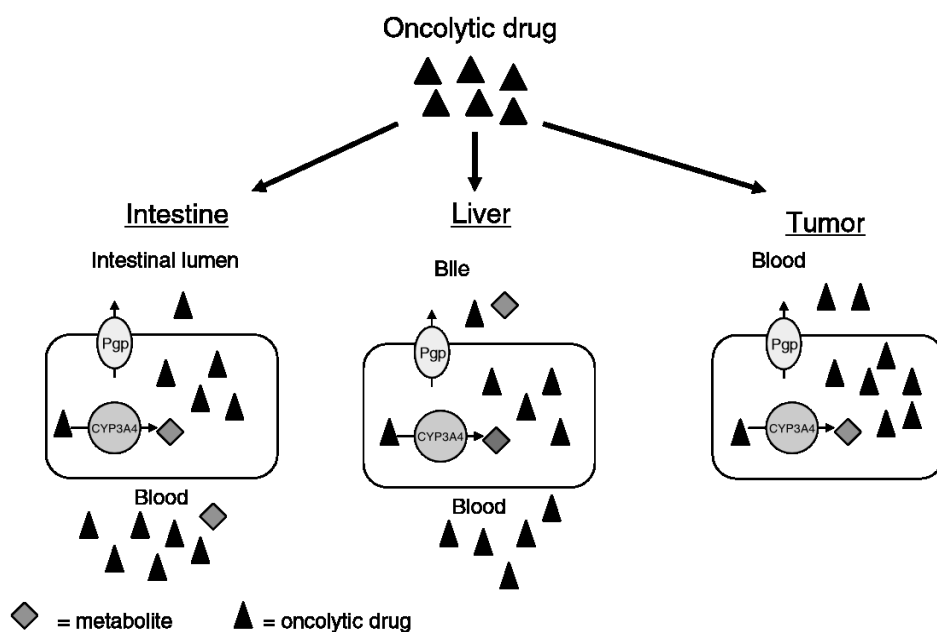


V mnoha případech se oxidativní metabolismus léčiv prostřednictvím CYP450 může projevit tak rychle, že léčivo není schopno dosáhnout svého cílového orgánu a vyvinout terapeutický účinek.<sup>105</sup>

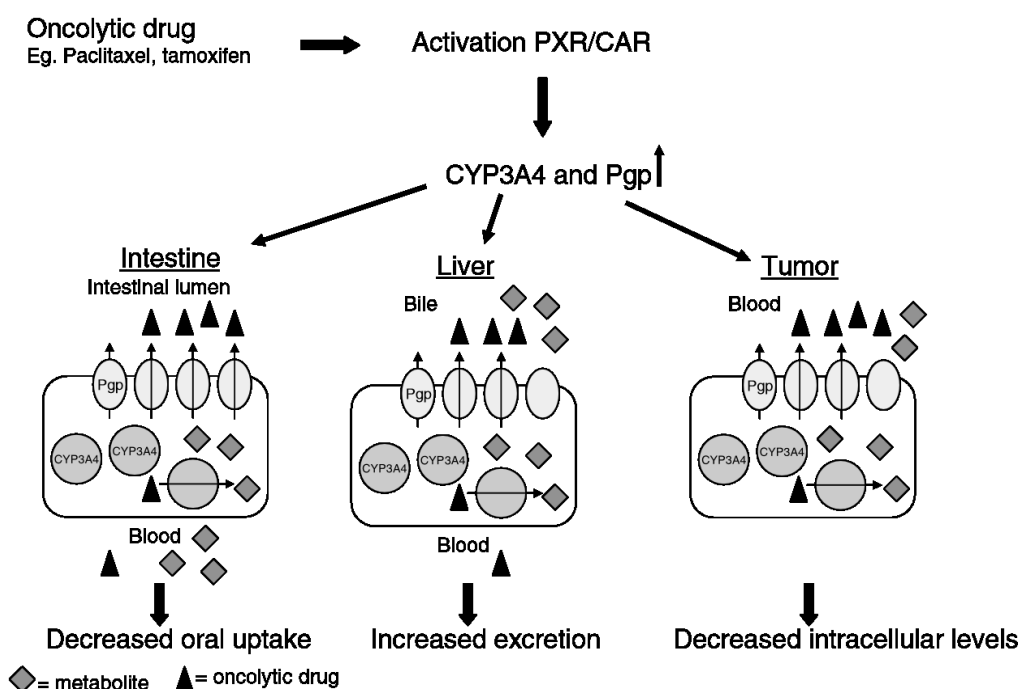
Nicméně hladiny CYP450 vyskytující se v nádorech jsou obecně mnohonásobně nižší než v játrech, kde probíhá hlavní metabolismus léčiva, i přesto je hladina dostačující, aby se mohl nádor zapojit do metabolismu cytostatika. Je nutné rozlišovat celosystémovou rezistenci, tedy rezistenci navozenou aktivitou enzymů v jaterní tkáni, ovlivňující systémovou farmakokinetiku cytostatika, a tumorální rezistenci, kdy dochází ke změně farmakokinetiky v rámci nádorové buňky.

Následující dvě schémata zobrazují koordinovanou roli CYP450 a P-glykoproteinu v organismu za normální situace po podání cytostatika (viz obr. 13 A) a situaci, kdy dochází ke zvýšené aktivitě regulací přes PXR a CAR (viz obr. 13 B).<sup>43</sup>

A)



B)



Obr. 13 Koordinovaná role CYP450 a P-glykoproteinu v organismu. Převzato z: 43

A) V případě normální hladiny CYP3A4 a P-glykoproteinu je detoxifikační kapacita CYP3A4 nedostatečná, velké množství cytostatika se dostává do krve a intracelulární hladina v tumoru je vysoká.

B) Koordinované zvýšení exprese CYP3A4 a P-glykoproteinu zprostředkované PXR nebo CAR způsobí rezistenci díky zvýšené detoxifikaci pomocí CYP3A4. Intracelulární hladina uvnitř nádorové buňky je nízká.

Jak lze pochopit ze schématu, nadměrná exprese CYP450 může v organismu způsobit sníženou absorpci po perorálním podání, zvýšit exkreci a snížit intracelulární hladinu v tumoru. Tím je značně sníženo celkové množství cytostatika, které tak není schopno vykonat svůj farmakologický efekt v dostatečné míře a tím dochází k navození rezistence.

Efekt cytostatik, která jsou metabolizována na méně aktivní metabolity, může být značně ovlivněn množstvím CYP450. Proto například vzrůst hladiny CYP2C u nemalobuněčného karcinomu plic ve srovnání se zdravou plicní tkání může urychlit cytochromem 2C8 zprostředkovaný metabolismus paklitaxelu, a tím snížit intratumorální koncentraci účinné formy léčiva.<sup>97</sup>

CYP3A4/5 jsou předmětem zájmu, protože byla prokázána jejich účast při aktivaci či inaktivaci některých chemoterapeutik včetně látek používaných při

léčbě osteosarkomu. Dhaini et al., 2003 přišli s technikou, která jim umožnila změřit hladinu tohoto enzymu v archivních vzorcích nádoru. Porovnání výsledků u vzorků s metastázemi s těmi bez poukazuje na to, že CYP3A4/5 může být prognostickým znakem pro metastáze u osteosarkomu a může také hrát roli v rezistenci na chemoterapii. Zvýšená exprese CYP3A4/5 v primárních tumorech, které metastazují, je zajímavým zjištěním. Overexprese CYP3A4/5 u malignit s metastatickým potenciálem může být ukázkou protektivního mechanismu buněk, které jsou díky urychlenému metabolismu zvýhodněny tím, že je urychlena inaktivace chemoterapeutik. Je také možné, že CYP3A4/5 mohou být zapojeny do růstové regulace díky metabolismu endogenních růstových regulačních faktorů. Výsledky této studie tak poukazují na možnost identifikovat pacienty s vysokým rizikem a použít množství CYP450 jako jeden z prognostických faktorů nejen u osteosarkomu, ale i u jiných malignit.<sup>98</sup>

CYP1B1 se účastní metabolismu prokancerogenů a xenobiotik a ukazuje se překryv katalytické aktivity s CYP1A1 a CYP1A2. Lidský CYP1B1 byl detekován v různých tumorech, ale nebyl nalezen v sousední zdravé tkáni nebo játrech. To poukazuje na možnost, že by CYP1B1 mohl přeměňovat cytostatika specificky v cílové buňce. Toto zjištění může představovat nový pohled pro vývoj cytostatik, která by podstoupila bioaktivaci až v cílové tkáni. Bylo testováno 12 běžně užívaných cytostatik za účelem zjistit jejich interakci s CYP1B1. Zatímco 5-fluorouracil, vinkristin, vinblastin, etoposid a cyklofosfamid nevykazovaly zjevnou interakci s CYP1B1, doxorubicin, daunorubicin a tamoxifen vykazovaly smíšenou nebo nekompetitivní inhibici CYP1B1, což poukazuje na to, že nejsou CYP1B1 substráty, ale spíše interagují skrze vazbu na kofaktor nebo dalším nepřímým mechanismem. Zbylá čtyři léčiva flutamid, mitoxantron, paklitaxel a docetaxel se projevila jako kompetitivní inhibitory, což poukazuje na situaci, že by tato cytostatika teoreticky mohla být substráty CYP1B1.

Interakce flutamidu s CYP1B1 byla dále zkoumána. Byly identifikovány dva hlavní metabolity M1 a M2, zatímco M2 byl identifikován jako aktivní 2-hydroxyflutamid, produkt CYP1A2 aktivity a zároveň CYP1A1 a CYP1B1. M1 se oproti tomu tvoří pod kontrolou CYP3A4.<sup>106</sup>

Jedna z prvních studií naznačujících, že metabolismus cytostatik pomocí CYP1B1 by mohl být jedním z možných mechanismů rezistence, pochází z roku 2001. S využitím buněk ovarií křečička čínského byl pozorován vliv CYP1B1 na cytotoxickou aktivitu některých chemoterapeutik. Ze zkoušených cytostatik jediný docetaxel vykazoval sníženou cytotoxickou aktivitu na buňky s exprimovaným CYP1B1. To poukazuje na možnost účasti CYP1B1 na metabolismu docetaxelu a snížení jeho efektu v nádorových buňkách s exprimovaným CYP1B1.<sup>107</sup>

Jiný výzkum *in vitro*, který zkoumal metabolismus docetaxelu v přítomnosti rekombinantního lidského CYP1B1 a CYP3A4 poukazuje na jasnou roli CYP3A4, přičemž však v přítomnosti CYP1B1 tento metabolismus nebyl pozorován.<sup>108</sup>

Potvrzení či vyvrácení toho, zda může CYP1B1 přispět k metabolismu docetaxelu a případně se zapojit do možné rezistence nádorových buněk k tomuto cytostatiku, vyžaduje rozsáhlejší studie.

Ve studii zaměřené na karcinom tlustého střeva se vědci snažili potvrdit možný dopad CYP3A na aktivaci (cyklofosfamid, ifosfamid) či inaktivaci (vinka alkaloidy, paklitaxel a docetaxel). Výsledky potvrzují předpoklad lokální inaktivace léčiv uvnitř rakovinných buněk, široké rozmezí enzymové aktivity u vzorků nádorů naznačuje, že lokální metabolismus protinádorových léčiv v nádorové tkáni se očekává s vysokou interindividuální variabilitou. Výsledky této studie naznačují, že u karcinomu tlustého střeva metabolismus paklitaxelu probíhá převážně pomocí isoformy CYP3A4, zatímco systémová eliminace převážně pomocí CYP2C8. Autoři práce navrhují možnost podání ketokonazolu (inhibitoru CYP3A4) za účelem snížení lokálního metabolismu bez ovlivnění metabolismu systémového.<sup>60</sup>

Jako další případ poukazující na možnou roli CYP3A4 v rezistenci k docetaxelu lze uvést skupinu pacientek s rakovinou prsu, u kterých byla odpověď na léčbu docetaxelem snížena vlivem zvýšené hladiny CYP3A4 mRNA v tumoru.<sup>109</sup>

Docetaxel, jedno z nejaktivnějších antineoplastických léčiv, je primárně oxidován pomocí CYP3A4 v játrech a jeho metabolity mají minimální či žádnou cytotoxickou aktivitu. Spekuluje se proto o tom, že intratumorální CYP3A4 může inaktivovat docetaxel a že vysoká exprese CYP3A4 způsobuje rezistenci tumoru na léčbu docetaxelem. Ve studii Miyoshi et al., 2002 byla zjišťována souvislost

mezi množstvím CYP3A4 mRNA a odpovědí na léčbu docetaxelem v porovnání s léčbou cyklofosfamidem a epirubicinem. Bylo testováno 23 pacientů léčených docetaxelem a 15 pomocí cyklofosfamidu a epirubicinu, ti byli rozděleni do dvou skupin podle hladiny CYP3A4 mRNA a to na skupinu s vysokou a nízkou hladinou. Pacienti s nízkou hladinou vykazovali výrazně vyšší odpověď na léčbu docetaxelem než ti s vysokou hladinou. Nicméně nebyla zjištěna souvislost mezi hladinou CYP3A4 mRNA a odpovědi na léčbu cyklofosfamidem a epirubicinem. Toto zjištění lze odůvodnit tím, že epirubicin není metabolizován pomocí CYP3A4. Výsledky potvrzují tvrzení, že intratumorální inaktivace docetaxelu pomocí CYP3A4 může hrát významnou roli při rezistenci na léčbu docetaxelem. Nicméně pro jednoznačné závěry by tato studie musela být ověřena na větším množství pacientů.<sup>109</sup>

Zdá se, že lokální intratumorální metabolismus by mohl mít vliv na schopnost buněk odolávat cytotoxickým účinkům některých chemoterapeutik. Otázkou však stále zůstává, jakou měrou přispívá metabolismus zprostředkovaný nádorovými buňkami k celkové eliminaci léčiva a zda ho lze považovat jako jeden z možných mechanismů rezistence na celosystémové úrovni.

## 6. Diskuze a závěr

Selhání farmakoterapie maligních onemocnění bývá způsobeno schopností nádorových buněk odolávat účinkům cytostatik. Mechanismy MDR lze obecně rozdělit na farmakodynamické a farmakokinetické. Mezi farmakokinetické lze mimo efluxních transportérů zařadit také biotransformační enzymy, které hrají důležitou roli v redukci intracelulární koncentrace léčiv. Efluxní transportéry a CYP450 mají koordinovanou roli v ochraně nádorových buněk vůči působení cytostatik. Synergický účinek je způsoben překryvem substrátové specifity a koordinovanou regulací exprese.

Pro pochopení role biotransformačních enzymů, konkrétně CYP450, ve fenoménu mnohočetné lékové rezistence je potřebná znalost účasti jednotlivých isoform CYP450 na metabolismu daného cytostatika a jeho povaze (metabolismus aktivační či inaktivační). Ke snížení terapeutického efektu vlivem zvýšené exprese a aktivity CYP450 dochází pouze u cytostatik, která jsou CYP450 přeměněna na méně aktivní metabolity. Informace o zapojení biotransformačních enzymů a konkrétních isoform CYP450 bohužel nebývají jednotné. Často se celkového metabolismu účastní více biotransformačních enzymů a sjednotit poznatky o míře zapojení jednotlivých isoform do metabolismu cytostatika je komplikované. Mezi cytostatika, která jsou inaktivována za účasti CYP450, lze s jistotou zařadit taxany paklitaxel a docetaxel, z vinca alkaloidů vinkristin a také irinotekan, jehož jeden z neaktivních metabolitů vzniká za účasti CYP3A4.

Mnoho studií poukazuje na přítomnost biotransformačních enzymů v nádorech. Stejně jako v případě substrátové specifity se však výsledky mezi jednotlivými studii výrazně liší. Nelze obecně říci, zda je hladina CYP450 v nádorové tkáni vyšší či nižší, protože závisí na typu nádoru, jednotlivých isoformách CYP450 a také na interindividuálních rozdílech. U starších studií se zdá být přítomnost CYP450 v tumorech oproti normální tkáni snížena, naopak novější literární zdroje většinou poukazují na zvýšené hladiny CYP450. Překvapivě jednotné jsou důkazy o expresi isoformy CYP1B1 v nádorech. Substráty pro tuto isoformu se jeví být flutamid, mitoxantron, paklitaxel a docetaxel, tuto skutečnost a její vliv na případnou chemoterapeutickou rezistenci je však potřeba prokázat dalšími

studiemi. Hladiny CYP450 v nádorové tkáni jsou obecně mnohonásobně nižší než v játrech, i přesto některé studie poukazují na možnost urychleného metabolismu vlivem zvýšené exprese v nádorové tkáni a následného vzniku intratumorální farmakokinetické rezistence.

Závěrem lze konstatovat, že biotransformační enzymy se v některých případech mohou podílet na vzniku farmakokinetické rezistence. Zhodnocení reálného dosahu tohoto jevu je bohužel velmi nesnadné vzhledem k výše zmíněným skutečnostem, mezi něž se řadí zejména komplikovanost metabolických přeměn, interindividuální rozdíly v nádorově specifické expresi enzymů a také to, že rezistence je komplexní jev zahrnující celou řadu dalších mechanismů, které se na ní podílí a ve výsledku vyúsťují v selhání terapie. Rozhodně je však tato oblast hodna bližšího vědeckého zájmu, jelikož podrobnější informace by mohly pomoci individualizovat protinádorovou léčbu u onkologických pacientů a zefektivnit jak její účinnost, tak i bezpečnost.

## 7. Seznam použité literatury

1. Timbrell JA, Marrs TC. Biotransformation of Xenobiotics. In: *General and Applied Toxicology.* ; 2009. doi:10.1002/9780470744307.gat004.
2. Gardiner SJ, Begg EJ. Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinical practice. *Pharmacol Rev.* 2006;58(3):521-590. doi:10.1124/pr.58.3.6.521.
3. Rang, H.P., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson G. *Rang & Dale's Pharmacology, 8th Edition.*; 2015.
4. Buxton I, Benet L. Pharmacokinetics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination. *Goodman Gilman's Pharmacol Basis Ther.* 2011:17-39.
5. Mottino AD, Catania VA, Vore M. Hormonal Regulation of Hepatic Drug Biotransformation and Transport Systems. 2013;3(October):1721-1740. doi:10.1002/cphy.c130018.
6. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2010;154(2):103-116. doi:10.5507/bp.2010.017.
7. Mazerska Z, Mróz A, Pawłowska M, Augustin E. The role of glucuronidation in drug resistance. *Pharmacol Ther.* 2016;159:35-55. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.01.009.
8. Miners JO, Mackenzie PI. Drug glucuronidation in humans. *Pharmacol Ther.* 1991;51(3):347-369. doi:10.1016/0163-7258(91)90065-T.
9. Gamage N, Barnett A, Hempel N, et al. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol Sci.* 2006;90(1):5-22. doi:10.1093/toxsci/kfj061.
10. Nassar AF. *Biotransformation and Metabolite Elucidation of Xenobiotics.*; 2010. doi:10.1002/9780470890387.
11. Knejzlik Z, Kas J, Ruml T. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem List.* 2000;94:913-918.



12. P.B. Danielson BSP. The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. *Curr Drug Metab.* 2002;3(6):561-597. doi:10.2174/1389200023337054.
13. Danton AC, Montastruc F, Sommet A, et al. Importance of cytochrome P450 (CYP450) in adverse drug reactions due to drug-drug interactions: A PharmacoVigilance study in France. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013;69(4):885-888. doi:10.1007/s00228-012-1394-3.
14. Stiborová M, Hudeček J, Hodek P, Frei E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem List.* 1999;93:229-237.
15. Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(5):737-747. doi:10.1007/PL00000897.
16. Zuber R, Anzenbacherová E, Anzenbacher P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med.* 2002;6(2):189-198. doi:10.1111/j.1582-4934.2002.tb00186.x.
17. Anzenbacher P, Zanger UM. *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics.*; 2012. doi:10.1002/9783527630905.
18. Isin EM, Guengerich FP. Substrate binding to cytochromes P450. *Anal Bioanal Chem.* 2008;392(6):1019-1030. doi:10.1007/s00216-008-2244-0.
19. Nair PC, McKinnon RA, Miners JO. Cytochrome P450 structure–function: insights from molecular dynamics simulations. *Drug Metab Rev.* 2016;48(3):434-452. doi:10.1080/03602532.2016.1178771.
20. Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev.* 2005;105(6):2253-2277. doi:10.1021/cr0307143.
21. Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: Current status. *Arch Toxicol.* 2008;82(10):667-715. doi:10.1007/s00204-008-0332-8.
22. Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M. Cytochrome P450

- pharmacogenetics and cancer. *Oncogene*. 2006;25(11):1679-1691. doi:10.1038/sj.onc.1209377.
23. van Schaik RHN. CYP450 pharmacogenetics for personalizing cancer therapy. *Drug Resist Updat*. 2008;11(3):77-98. doi:10.1016/j.drug.2008.03.002.
  24. Marquez B, Van Bambeke F. ABC multidrug transporters: target for modulation of drug pharmacokinetics and drug-drug interactions. *Curr Drug Targets*. 2011;12(5):600-620. doi:10.2174/138945011795378504.
  25. Rendic S, Carlo FJ Di. Human Cytochrome P450 Enzymes: A Status Report Summarizing Their Reactions, Substrates, Inducers, and Inhibitors. *Drug Metab Rev*. 1997;29(1-2):413-580. doi:10.3109/03602539709037591.
  26. Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: Studies with CYP2E1. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2005;569(1-2):101-110. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.04.021.
  27. Lin JH, Lu AY. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 1998;35(5):361-390. doi:10.2165/00003088-199835050-00003.
  28. Kikuchi H. Regulation of cytochrome P-450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Nihon Eiseigaku Zasshi*. 2002;56:622-628. doi:10.1042/0264-6021:3470321.
  29. Hollenberg PF. Characteristics and common properties of inhibitors, inducers, and activators of CYP enzymes. *Drug Metab Rev*. 2002;34(1-2):17-35. doi:10.1081/DMR-120001387.
  30. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 2013;138(1):103-141. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.12.007.
  31. Akhdar H, Legendre C, Aninat C, Morel F. Anticancer Drug Metabolism : Chemotherapy Resistance and New Therapeutic Approaches. *Biol Metab*

- Cancer*. 2012;1:138-156. doi:10.5772/30015.
32. Chen Y, Tang Y, Guo C, Wang J, Boral D, Nie D. Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochem Pharmacol*. 2012;83(8):1112-1126. doi:10.1016/j.bcp.2012.01.030.
  33. Piotr Czekaj and Rafał Skowronek. Transcription Factors Potentially Involved in Regulation of Cytochrome P450 Gene Expression. *Top Drug Metab*. doi:10.1111/j.1740-8784.2012.00295.x.
  34. Prakash C, Zuniga B, Song CS, et al. Nuclear Receptors in Drug Metabolism, Drug Response and Drug Interactions HHS Public Access. *Nucl Recept Res*. 2015;2. doi:10.11131/2015/101178.
  35. Nosková V, Hajdúch M, Mihál V, Cwierka K. Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi I. Typická MDR. *Klin Onkol*. 2000;13(SUPPL. 2):4-9.
  36. Gillet J-P, Gottesman MM. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer. 2010:47-76. doi:10.1007/978-1-60761-416-6\_4.
  37. Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Lett*. 2006;580(12):2903-2909. doi:10.1016/j.febslet.2006.02.020.
  38. Elmbach HH, Ossmann ER, Ern MAK, Chadendorf DS. Drug-Resistance in Human Melanoma. 2001;622(February):617-622. doi:10.1002/ijc.1378.
  39. Dantzig a H, Law KL, Cao J, Starling JJ. Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator, LY335979, from the bench to the clinic. *Curr Med Chem*. 2001;8(1):39-50. doi:10.2174/0929867013373903.
  40. Azzariti A, Porcelli L, Quatrone AE, Silvestris N, Paradiso A. The coordinated role of CYP450 enzymes and P-gp in determining cancer resistance to chemotherapy. *Curr Drug Metab*. 2011;12(8):713-721. doi:10.2174/138920011798357042.
  41. Rochat B. Role of Cytochrome P450 Activity in the Fate of Anticancer Agents and in Drug Resistance. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44(4):349-366.

doi:10.2165/00003088-200544040-00002.

42. Vadlapatla RK, Vadlapudi a D, Pal D, Mitra a K. Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy: Coordinated Role and Regulation of Efflux Transporters and Metabolizing Enzymes. *Curr Pharm Des.* 2013;7126-7140. doi:10.2174/13816128113199990493.
43. Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JHM. Combined action and regulation of phase II enzymes and multidrug resistance proteins in multidrug resistance in cancer. *Cancer Treat Rev.* 2008;34(6):505-520. doi:10.1016/j.ctrv.2008.03.002.
44. Jiří Vorlíček, Zdeněk Adam HV. *Chemoterapie a Vy.* 1997:27.
45. Takada K, Arefayene M, Desta Z, et al. Cytochrome P450 pharmacogenetics as a predictor of toxicity and clinical response to pulse cyclophosphamide in lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(7):2202-2210. doi:10.1002/art.20338.
46. Gor PP, Su HI, Gray RJ, et al. Cyclophosphamide-metabolizing enzyme polymorphisms and survival outcomes after adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: a retrospective cohort study. *Breast Cancer Res.* 2010;12(3):R26. doi:10.1186/bcr2570.
47. Zhang J, Tian Q, Yung Chan S, et al. Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. *Drug Metab Rev.* 2005;37(4):611-703. doi:10.1080/03602530500364023.
48. Shiba DA, Weinkam- RJ, Weinkam RJ. Quantitative analysis of procarbazine, procarbazine metabolites and chemical degradation products with application to pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1982;229(2):397-407. doi:10.1016/S0378-4347(00)84282-6.
49. Jacobson P, Green K, Birnbaum A, Remmel R. Cytochrome P450 isozymes 3A4 and 2B6 are involved in the in vitro human metabolism of thiotepa to TEPA. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002;49(6):461-467. doi:10.1007/s00280-002-0453-3.

50. Zhuo X, Zheng N, Felix CA, Blair IA. Kinetics and regulation of cytochrome P450-mediated etoposide metabolism. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(9):993-1000.
51. Relling M V, Nemec J, Schuetz EG, Schuetz JD, Gonzalez FJ, Korzekwa KR. O-demethylation of epipodophyllotoxins is catalyzed by human cytochrome P450 3A4. *Mol Pharmacol.* 1994;45(2):352-358.
52. Lyon E, Gastier Foster J, Palomaki GE, et al. Laboratory testing of CYP2D6 alleles in relation to tamoxifen therapy. *Genet Med.* 2012;14(12):990-1000. doi:10.1038/gim.2012.108.
53. Noble RL. The discovery of the Vinca alkaloids - chemotherapeutic agents against cancer. *Biochem Cell Biol Biol Cell.* 1990;68(12):1344-1351. doi:10.1139/o90-197.
54. Zhou XJ, Zhou-Pan XR, Gauthier T, Placidi M, Maurel P, Rahmani R. Human liver microsomal cytochrome P450 3A isozymes mediated vindesine biotransformation. Metabolic drug interactions. *Biochem Pharmacol.* 1993;45(4):853-861. doi:10.1016/0006-2952(93)90169-W.
55. Yao D, Ding S, Burchell B, Wolf CR, Friedberg T. Detoxication of vinca alkaloids by human P450 CYP3A4-mediated metabolism: implications for the development of drug resistance. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;294(1):387-395.
56. Zhou-Pan XR, Seree E, Zhou XJ, et al. Involvement of human liver cytochrome P450 3A in vinblastine metabolism: drug interactions. *Cancer Res.* 1993;53:5121-5126.
57. Beulz-Riché D, Grudé P, Puozzo C, et al. Characterization of human cytochrome P450 isoenzymes involved in the metabolism of vinorelbine. *Fundam Clin Pharmacol.* 2005;19(5):545-553. doi:10.1111/j.1472-8206.2005.00367.x.
58. Ortiz de Montellano PR. Cytochrome P450-activated prodrugs. *Future Med Chem.* 2013;5(2):213-228. doi:10.4155/fmc.12.197.
59. Cresteil T, Monsarrat B, Alvinerie P. Taxol Metabolism by Human Liver

Microsomes : Identification of Cytochrome P450 Isozymes Involved in Its Biotransformation. *Cancer Res.* 1994;386-392.

60. Pizarro RM, Garc FJ, Agu JAG, et al. Expression of paclitaxel-inactivating CYP3A activity in human colorectal cancer: implications for drug therapy. *Br J Cancer.* 2002;87(6):681-686. doi:10.1038/sj.bjc.6600494.
61. Dennison JB, Kulanthaivel P, Barbuch RJ, Renbarger JL, Ehlhardt WJ, Hall SD. Selective metabolism of vincristine in vitro by CYP3A5. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(8):1317-1327. doi:10.1124/dmd.106.009902.
62. Dennison JB, Jones DR, Renbarger JL, Hall SD. Effect of CYP3A5 expression on vincristine metabolism with human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321(2):553-563. doi:10.1124/jpet.106.118471.
63. Dennison JB, Mohutsky M a, Barbuch RJ, Wrighton S a, Hall SD. Apparent High CYP3A5 Expression Is Required for Significant Metabolism of Vincristine by Human Cryopreserved Hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;327(1):248-257. doi:10.1124/jpet.108.139998.
64. Gidding CEM, Kellie SJ, Kamps WA, De Graaf SSN. Vincristine revisited. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1999;29(3):267-287. doi:10.1016/S1040-8428(98)00023-7.
65. Villikka K, Kivistö KT, Mäenpää H, Joensuu H, Neuvonen PJ. Cytochrome P450-inducing antiepileptics increase the clearance of vincristine in patients with brain tumors. *Clin Pharmacol Ther.* 1999;66(6):589-593. doi:10.1053/cp.1999.v66.103403001.
66. Ron H. J. Mathijssen, Robbert J. van Alphen, Jaap Verweij, Walter J. Loos KN, Gerrit Stoter and AS. Clinical Pharmacokinetics and Metabolism of Irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res.* 2001;9(1,2):81-89. doi:10.1163/156856001300248353.
67. Murry DJ, Cherrick I, Salama V, et al. Influence of phenytoin on the disposition of irinotecan: a case report. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2002;24(2):130-133.
68. Joerger M, Huitema ADR, Meenhorst PL, Schellens JHM, Beijnen JH.

- Pharmacokinetics of low-dose doxorubicin and metabolites in patients with AIDS-related Kaposi sarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;55(5):488-496. doi:10.1007/s00280-004-0900-4.
69. Bai F, Kirstein MN, Hanna SK, Iacono LC, Johnston B, Stewart CF. Determination of plasma topotecan and its metabolite N-desmethyl topotecan as both lactone and total form by reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2003;784(2):225-232. doi:10.1016/S1570-0232(02)00798-5.
  70. MUDr. Jaromír Roubec PD. Lékové formy Perorální topotekan ve druhé linii léčby malobuněčného karcinomu plic. *Remedia.* 2009.
  71. Plunkett W, Huang P, Gandhi V. Metabolism and action of fludarabine phosphate. *Semin Oncol.* 1990;17:3-17.
  72. Evans WE, Horner M, Chu YQ, Kalwinsky D, Roberts WM. Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects, and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphocytic leukemia. *J Pediatr.* 1991;119(6):985-989. doi:10.1016/S0022-3476(05)83063-X.
  73. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol.* 2006;17(SUPPL. 5):7-12. doi:10.1093/annonc/mdj941.
  74. Miura K, Kinouchi M, Ishida K, et al. 5-FU metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs. *Cancers (Basel).* 2010;2(3):1717-1730. doi:10.3390/cancers2031717.
  75. Veleta T, Soukup T, Pávek P, Nekvindová J, Vlček J, Bradna P. Farmakogenetika metotrexátu v léčbě revmatoidní artritidy. *Klin Farmakol a Farm.* 2013;27:131-135.
  76. Rau T, Erney B, Göres R, Eschenhagen T, Beck J, Langer T. High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: Impact of ABCC2 polymorphisms on plasma concentrations. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;80(5):468-476. doi:10.1016/j.clpt.2006.08.012.

77. McCune JS, Holmberg LA. Busulfan in hematopoietic stem cell transplant setting. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009;5(8):957-969. doi:10.1517/17425250903107764.
78. Kusama M, Kubota T, Matsukura Y, et al. Influence of glutathione S-transferase A1 polymorphism on the pharmacokinetics of busulfan. *Clin Chim Acta.* 2006;368(1-2):93-98. doi:10.1016/j.cca.2005.12.011.
79. McLean A, Newell D, Baker G, Connors T. The metabolism of chlorambucil. *Biochem Pharmacol.* 1980;29(14):2039-2047. doi:10.1016/0006-2952(80)90489-X.
80. Zhang J, Ye Z, Lou Y. Metabolism of chlorambucil by rat liver microsomal glutathione S-transferase. *Chem Biol Interact.* 2004;149(1):61-67. doi:10.1016/j.cbi.2003.07.002.
81. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Pharmaceuticals. Volume 100 A. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2012;100(Pt A):1-401. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
82. Toussaint C, Albin N, Massaad L, et al. Main drug- and carcinogen-metabolizing enzyme systems in human non- small cell lung cancer and peritumoral tissues. *Cancer Res.* 1993;53(19):4608-12.
83. Albin N, Massaad L, Toussaint C, et al. Main Drug-metabolizing Enzyme Systems in Human Breast Tumors and Peritumoral Tissues. *Cancer Res.* 1993;53(19):3541-3546.
84. Peters WHM, Boon CEW, Roelofs HMJ, Wobbes T, Nagengast FM, Kremers PG. Expression of drug-metabolizing enzymes and P-170 glycoprotein in colorectal carcinoma and normal mucosa. *Gastroenterology.* 1992;103(2):448-455. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0016-5085(92)90833-K.
85. Murray GI, Taylor MC, McFadyen MCE, et al. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res.* 1997;57(14):3026-3031.
86. Gonzalez FJ, Gelboin H V. Role of human cytochromes P450 in the



- metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev.* 1994;26(1-2):165-183. doi:10.3109/03602539409029789.
87. Husbeck B, Powis G. The redox protein thioredoxin-1 regulates the constitutive and inducible expression of the estrogen metabolizing cytochromes P450 1B1 and 1A1 in MCF-7 human breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 2002;23(0143-3334 (Print)):1625-1630.
  88. Simpson ER, Davis SR. Minireview: Aromatase and the Regulation of Estrogen Biosynthesis—Some New Perspectives. *Endocrinology.* 2001;142(11):4589-4594. doi:10.1210/endo.142.11.8547.
  89. Chen S, Itoh T, Wu K, Zhou D, Yang C. Transcriptional regulation of aromatase expression in human breast tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002;83(1-5):93-99. doi:10.1016/S0960-0760(02)00276-5.
  90. Goth-Goldstein R, Stampfer MR, Erdmann C a, Russell M. Interindividual variation in CYP1A1 expression in breast tissue and the role of genetic polymorphism. *Carcinogenesis.* 2000;21(11):2119-2122.
  91. El-rayes BF, Ali S, Heilbrun LK, et al. Cytochrome P450 and Glutathione Transferase Expression in Human Breast Cancer. 2003;9(May):1705-1709.
  92. Murray GI, Weaver RJ, Paterson PJ, Ewen SW, Melvin WT, Burke MD. Expression of xenobiotic metabolizing enzymes in breast cancer. *J Pathol.* 1993;169(3):347-353. doi:10.1002/path.1711690312.
  93. Downie D. Profiling Cytochrome P450 Expression in Ovarian Cancer: Identification of Prognostic Markers. *Clin Cancer Res.* 2005;11(20):7369-7375. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0466.
  94. Kivistö KT, Griese EU, Fritz P, et al. Expression of cytochrome P 450 3A enzymes in human lung: a combined RT-PCR and immunohistochemical analysis of normal tissue and lung tumours. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1996;353(2):207-212.
  95. Fujitaka K, Oguri T, Isobe T, Fujiwara Y, Kohno N. Induction of cytochrome P450 3A4 by docetaxel in peripheral mononuclear cells and its expression

- in lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001;48(1):42-46. doi:10.1007/s002800100291.
96. Forkert PG, Malkinson AM, Rice P, Moussa M. Diminished CYP2E1 expression and formation of 2-S-glutathionyl acetate, a glutathione conjugate derived from 1,1-dichloroethylene epoxide, in murine lung tumors. *Drug Metab Dispos.* 1999;27(1):68-73.
  97. Gharavi N, El-Kadi AOS. Expression of cytochrome P450 in lung tumor. *Curr Drug Metab.* 2004;5(2):8183. doi:10.2174/1389200043489045.
  98. Dhaini HR, Thomas DG, Giordano TJ, et al. Cytochrome P450 CYP3A4/5 expression as a biomarker of outcome in osteosarcoma. *J Clin Oncol.* 2003;21(13):2481-2485. doi:10.1200/JCO.2003.06.015.
  99. McKay JA, Murray GI, Weaver RJ, Ewen SWB, Melvin WT, Burke MD. Xenobiotic metabolising enzyme expression in colonic neoplasia. *Gut.* 1993;34(9):1234-1239. doi:10.1136/gut.34.9.1234.
  100. Kumarakulasingham M, Rooney PH, Dundas SR, et al. Cytochrome P450 profile of colorectal cancer: Identification of markers of prognosis. *Clin Cancer Res.* 2005;11(10):3758-3765. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1848.
  101. Murray GI, Taylor VE, McKay JA, et al. The immunohistochemical localization of drug-metabolizing enzymes in prostate cancer. *J Pathol.* 1995;177(2):147-152. doi:10.1002/path.1711770208.
  102. Mouelhi M El, Didolkar MS, Elias EG, Liver H, Guengerich FP, Kauffman FC. Hepatic Drug-metabolizing Enzymes in Primary and Secondary Tumors of Human Liver Hepatic Drug-metabolizing Enzymes in Primary and Secondary Tumors of. *Cancer Res.* 1987;47:460-466.
  103. Murray GI, Paterson PJ, Weaver RJ, Ewen SW, Melvin WT, Burke MD. The expression of cytochrome P-450, epoxide hydrolase, and glutathione S-transferase in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 1993;71(1):36-43.
  104. Patterson LH, Murray GI. Tumour cytochrome P450 and drug activation. *Curr Pharm Des.* 2002;8(15):1335-1347. doi:10.2174/1381612023394502.

105. Doehmer J, Goeptar AR, Vermeulen NPE. Cytochromes P450 and drug resistance. *Cytotechnology*. 1993;12(1-3):357-366. doi:10.1007/BF00744673.
106. Rochat B, Morsman JM, Murray GI, Figg WD, McLeod HL. Human CYP1B1 and anticancer agent metabolism: mechanism for tumor-specific drug inactivation? *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;296(2):537-541.
107. McFadyen MC, McLeod HL, Jackson FC, Melvin WT, Doehmer J, Murray GI. Cytochrome P450 CYP1B1 protein expression: a novel mechanism of anticancer drug resistance. *Biochem Pharmacol*. 2001;62(2):207-212. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00643-8.
108. Bournique B, Lemarié A. Docetaxel (Taxotere) is not metabolized by recombinant human CYP1B1 in vitro, but acts as an effector of this isozyme. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(11):1149-1152. doi:10.1124/dmd.30.11.1149.
109. Miyoshi Y, Ando A, Takamura Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Prediction of response to docetaxel by CYP3A4 mRNA expression in breast cancer tissues. *Int J Cancer*. 2002;97(1):129-132. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11774254.