

UNIVERZITA PARDUBICE  
Fakulta chemicko-technologická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Sára Příkazská

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Cytochrom P450

Příkazská Sára

Bakalářská práce

2021

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Cytochrome P450

Příkazská Sára

Bachelor thesis

2021

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Sára Příkazská**  
Osobní číslo: **C18272**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Cytochrom P450**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracovat teoretickou rešerši týkající se cytochromu P450.
2. V úvodu krátce charakterizovat cytochrom P450.
3. V dalších kapitolách popsat strukturu, názvosloví, vlastnosti a hlavní funkce cytochromu P450.
4. Dále uvést izoformy cytochromu P450.
5. V závěru zmínit metabolismus xenobiotik.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Cytochrom P450 jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Příkazská Sára

## **Poděkování**

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala vedoucí práce Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivý přístup a věnovaný čas při vypracování této bakalářské práce. Poděkování patří také mým rodičům a přátelům za jejich podporu v průběhu celého mého studia.

## **Titul**

Cytochrom P450

## **Anotace**

Tato práce poskytuje základní informace o cytochromech P450, jejich struktuře, biotransformaci, metabolismu a vlastnostech jednotlivých izoform. Dále přibližuje obecné informace o metabolismu xenobiotik.

## **Klíčová slova**

Cytochrom P450, CYP1A, CYP2E, CYP3A, CYP4, xenobiotika, metabolismus xenobiotik

## **Title**

Cytochrome P450

## **Annotation**

This work provides basic information about cytochromes P450, their structure, biotransformations, metabolism and properties of individual isoforms. It also provides general information on the metabolism of xenobiotics.

## **Keywords**

Cytochrom P450, CYP1A, CYP2E, CYP3A, CYP4, xenobiotics, metabolism of xenobiotics



## Seznam ilustrací

<b>Obrázek 1</b> - Struktura cytochromu P450 .....	13
<b>Obrázek 2</b> - Názvosloví cytochromů P450 .....	15
<b>Obrázek 3</b> - Reakční schéma CYP450.....	18
<b>Obrázek 4</b> - Oxidace terfenadinu CYP3A4 .....	20
<b>Obrázek 5</b> - Metabolismus imipraminu .....	24
<b>Obrázek 6</b> - Indukce CYP2E1 ethanollem.....	26
<b>Obrázek 7</b> - Struktura CYP3A4 bez ligandů .....	30
<b>Obrázek 8</b> - Molekulární struktura kvercetinu.....	33
<b>Obrázek 9</b> - Strukturní organizace P-glykoproteinu .....	36
<b>Obrázek 10</b> - Transport přes biologickou membránu .....	39

## Seznam zkratek

ALDH	aldehyddehydrogenáza
AMK	aminokyselina
CNS	centrální nervový systém
CYP450	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
ER	endoplazmatické retikulum
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
MK	mastné kyseliny
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
NAD(P)H	redukovaný nikotinaminadenindinukleotid(fosfát)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PGP	P-glykoprotein
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SRS	substrátové rozpoznávací místo (substrate recognition sites)

## **Obsah**

<b>Úvod .....</b>	<b>11</b>
<b>1 Cytochromy P450.....</b>	<b>12</b>
1.1 Charakteristika .....	12
1.2 Struktura.....	12
1.3 Názvosloví .....	15
1.4 Vlastnosti .....	16
1.5 Mechanismus monooxygenázové reakce.....	17
1.6 Funkce.....	19
<b>2 Izoformy CYP450 .....</b>	<b>21</b>
2.1 CYP1A.....	21
2.2 CYP2E .....	25
2.3 CYP3A.....	29
2.4 CYP4.....	33
<b>3 Xenobiotika.....</b>	<b>35</b>
3.1 Metabolismus.....	35
3.2 Prostup organismem .....	38
3.3 Adaptace a eliminace .....	39
3.4 Počítačový systém pro predikci metabolismu .....	41
<b>Závěr .....</b>	<b>43</b>
<b>Použitá literatura .....</b>	<b>44</b>

## Úvod

Za posledních několik desítek let došlo k intenzivní expanzi studií zabývajících se právě cytochromy P450, přestože existence těchto látek sahá až do samých počátků evoluce, informace o nich byly donedávna velmi omezené. V šedesátých letech minulého století, byl poprvé zmíněn dosud neznámý mikrozomální pigment vázající oxid uhelnatý, bez jasných fyziologických funkcí. Teprve o několik let později byla u tohoto neznámého pigmentu prokázána jeho hemoproteinová povaha, a byl nazván jako cytochrom P450. Tento název získal na základě absorpčního píku při vlnové délce 450 nm v komplexu s oxidem uhelnatým.

Unikátní chemické a fyzikální vlastnosti cytochromů P450 působí přímo jako magnet pro vědce, a to nejen z jednoho, ale hned z několika oborů. V rámci zdraví člověka se jejich výzkumem zabývá řada toxikologů a farmakologů, kovová centra a spektrální vlastnosti zase velice zajímají biofyziky a biochemiky. Na výzkum genomové revoluce spolu se složitými procesy regulace transkripce a translace se také soustředí značný počet molekulárních biologů.

# 1 Cytochromy P450

## 1.1 Charakteristika

Historicky je cytochrom P450 považován za velmi starý hemoprotein, který byl objeven dříve než hemoglobin, s jehož existencí je obeznámena i široká veřejnost. Jedná se o enzym, který se vyvíjel cestou divergentní evoluce, a v dnešní době patří mezi klíčové enzymy metabolismu xenobiotik (cizorodých látek). Z jednoho původního genu cytochromu P450 se do dnešní doby vyvinula řada jeho různých forem a izoform, vyznačující se rozmanitými funkcemi. Dle předpokladů byl v počátcích jeho evoluce využíván mikroorganismy k hydroxylaci organických látek, které následně sloužily jako zdroj energie. V průběhu vývoje získával v organismu mnoho dalších funkcí. Cytochromy P450 se staly nejznámějšími díky své účasti při hydroxylaci neaktivních alkenů, protože jako jedny z mála oxygenáz mají požadovaný stav „aktivního kyslíku“. Mimo jejich účast v metabolismu xenobiotik, se podílejí na biosyntéze mastných kyselin (MK), steroidních hormonů, a jako enzymy katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce metabolické transformace léčiv. [1, 2]

Cytochromy P450 byly nalezeny ve všech organismech od rostlin, až po člověka, jedinou výjimku představuje *Escherichia coli*, kde jejich přítomnost prokázána nebyla. Rozmanitost sekvence a aktivity CYP450 naznačuje obrovský rezervoár nových aktivit pro potenciální aplikace. V lidském organismu bylo identifikováno 57 genů a více než 59 pseudogenů, které tvoří tzv. „nadrodinu“. Všechny tyto geny jsou na základě primární struktury, tedy sekvence aminokyselin, rozděleny do 18 rodin a 43 podrodin. Zástupci jednotlivých rodin spolu sdílí více jak 40 % společných znaků (homologie) a více jak 55 % v případě podrodin. Do roku 2015 bylo popsáno více jak 21 000 jednotlivých proteinů CYP450. Co se týče lidského těla tak největší výskyt cytochromů P450 je nalézán v játrech, dále je však jejich zastoupení významné v plicní tkáni, ledvinách, tenkém střevě, mozku, nadledvinách a kůži. Lokalizace uvnitř buněk jednotlivých tkání je převážně v membránách hladkého endoplazmatického retikula (ER) a mitochondrií. [3, 4]

## 1.2 Struktura

Enzymy P450 sdílí společné celkové sbalení a topologii. Struktura cytochromu P450 je znázorněna na obr. 1. Strukturní jádro je tvořeno čtyřmi šroubovicemi

spojenými do svazku, obsahuje tři paralelní šroubovice označené L, D, I a jednu antiparalelní šroubovici E. Prostetická hemová skupina je situována mezi distální I helix a proximální L helix. Je navázána na přiléhající cystein obsahující charakteristickou sekvenci aminokyselin (AMK). Zcela konzervovaný cystein je proximální, nebo také pátý ligand pro hemové železo, tento ligand se řadí mezi thioláty, a je původcem pro charakteristické pojmenování CYP450, díky vysoké absorpci záření při vlnové délce 450 nm. Proximální cystein obvykle tvoří dvě vodíkové vazby se sousedními amidy. Další interakce s postranními řetězci je možné pozorovat u některých druhů CYP450. Dlouhý I helix tvoří stěnu kapsy hemu a obsahuje charakteristickou sekvenci AMK. [2]

Přestože je CYP450 vysoce konzervovaný, existuje dostatečně velká strukturální rozmanitost umožňující vazbu substrátů výrazně rozdílných velikostí k různým cytochromům. Na nejjednodušší strukturální úrovni substrátu je rozpoznávání a vazba zajištěna za pomoci šesti substrátových rozpoznávacích míst (SRS). Mezi ně patří (SRS1) oblast B helix, (SRS2 a SRS3) tedy část F helix a G helix, (SRS4) úsek I helix, (SRS5)  $\beta 4$  vlásenka lemující aktivní místo CYP450 a jako poslední (SRS6) spojovací oblast K helix  $\beta 2$ . SRS jsou považována za flexibilní proteinové oblasti, upřednostňující vazbu substrátu a následnou katalytickou reakci. SRS předurčuje zejména substrátovou specifitu, která je v případě bodové mutace ovlivněna. [2]



**Obrázek 1** - Struktura cytochromu P450 [5]

CYP450 tvoří nadrodinu hem-thiolátových enzymů katalyzující oxygenaci řady hydrofobních substrátů. V roce 1982 byla pomocí chemického sekvenování stanovena úplná aminokyselinová sekvence v molekule CYP450 a pouze o pár let později pomocí rentgenové krystalografické analýzy byla objasněna terciální molekulární struktura. Celkový tvar molekuly je asymetrický trojúhelníkový hranol složený z 12  $\alpha$ -helixů a 5 antiparalelních  $\beta$ -listů. Mezi dva dlouhé  $\alpha$ -helixy je vložen hem, který je uložen na dně velké vnitřní kapsy. Na rozdíl od hemoglobinu nebo myoglobinu se hemové železo v molekule CYP450 nachází v oxidované formě  $\text{Fe}^{3+}$ . Kolem hemu se nachází katalytické centrum, komplexně uzavřené v různých aminokyselinových sekvencích. Tyto sekvence umožňují vazbu celé řady substrátů tím, že mění topografii aktivního místa. K přenosu elektronů z pyridinových nukleotidů na P450 vyžadují monooxygenační reakce přítomnost redoxního partnera, který umožní vazbu a aktivaci. Dle povahy redoxního partnera lze cytochromy rozdělit do 4 různých skupin. Enzymy první skupiny se nacházejí u většiny bakterií, ale jsou přítomny i v eukaryotních buňkách uvnitř mitochondriální membrány a vyžadují přítomnost flavinadenindinukleotidu (FAD). Druhá skupina enzymů zahrnuje membránově vázané eukaryotické mikrozomální enzymy interagující přímo s FAD a flavinmononukleotidem (FMN). Enzymy řadící se do třetí skupiny přímo využívají substráty obsahující kyslík, proto tedy nepotřebují oxýgenní zdroj elektronů. Čtvrtá skupina bez zásahu elektronového nosiče přijímá elektrony přímo z pyridinových nukleotidů. [6, 7]

Potřeba pojmout velké množství substrátů rozmanitých velikostí a tvarů a zároveň schopnost interagovat s různými redoxními partnery, dává molekule CYP450 významnou hodnotu sekvenčnosti a strukturální variability. V posledních letech bylo stanoveno značné množství krystalových struktur P450. Tato skutečnost vedla k zahájení srovnávacích analýz mezi jednotlivými strukturami, které vedly k závěru, že i přes poměrně malou sekvenční identitu, mají tyto enzymy stejnou terciální strukturu a jádro vázající hem. Popsání značného množství struktur enzymů cytochromu P450 napomohlo k řešení problémů v oblasti farmaceutického průmyslu pro vývoj léčiv. Komparativní analýzy struktur jsou velmi užitečné, protože napomáhají zmapovat výskyt jednotlivých struktur v rámci jedné rodiny. Klíčem ke srovnávací analýze proteinových struktur je metoda využívající překrytí struktur a kvantifikaci podobnosti mezi jednotlivými strukturami. K vyhodnocení celkové strukturální podobnosti za použití navrstvení proteinových struktur existuje celá řada metod, i když řada těchto metod byla navržena pouze pro identifikaci místních strukturálních podobností. [6, 7]

Všechny mikrozosomální CYP450 mají vysoce hydrofobní vlastnosti sekvence skládající se z 20–25 aminokyselinových zbytků, které slouží k ukotvení na molekulu. Mitochondriální CYP450 jsou na druhou stranu syntetizovány v cytoplazmě jako prekurzory rozpustné ve vodě obsahující sekvenci 20–40 AMK, která se po transportu do mitochondrie proteolyticky odštěpí. Při srovnání primárních struktur mitochondriálních a mikrozosomálních P450 bylo zjištěno, že obě obsahují přibližně 500 aminokyselinových zbytků. Tato informace naznačuje, že presekvence mitochondriálních P450 odpovídá sekvenci signálních kotev mikrozosomálních CYP450, proto jsou zralé, na membránu vázané mitochondriální formy CYP450 ekvivalentní signálu zkrácení mikrozosomální formy P450. [7]

### 1.3 Názvosloví

Cytochromy P450, jakožto nadrodina hemových enzymů nalezených jak u bakterií, tak u lidí, jsou od roku 1991 souhrnně označovány zkratkou CYP. První arabská číslice za touto zkratkou vyjadřuje náležitost k rodině a může být spojena s funkcí příslušného enzymu, např. číslice 21 u CYP21 vyjadřuje enzym působící jako steroid 21-hydroxyláza. Dle zákonitostí se zástupci jednotlivých rodin shodují v aminokyselinových sekvencích ve více jak 40 %. V případě, je-li nutné rodinu dále rozdělit, vytvoří se podrodina na základě vyšší podobnosti sekvence a ve zkratce za číslem rodiny je označena písmenem. Jak je vidět na obr. 2 jsou následně jednotliví zástupci rodin a podrodin zaznamenáni vlastní číslicí, a měli by se vyznačovat alespoň 3% odlišností v aminokyselinové sekvenci. Od roku 1995 existuje webová stránka, která je univerzálním zdrojem názvosloví a poskytuje informace o jednotlivých sekvencích genů CYP450. [8, 9]

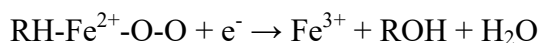
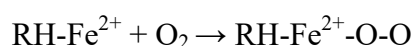
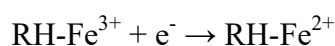
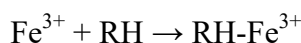


**Obrázek 2** - Názvosloví cytochromů P450. Převzato z [1] a upraveno.



## 1.4 Vlastnosti

Hlavní vlastností, kterou zastávají cytochromy P450, je monooxygenace rozdílných substrátů, která pro průběh reakce vyžaduje dostatek molekulárního kyslíku a přísun redukčních ekvivalentů, jako jsou NADPH nebo NADH. Reakce probíhá v jednotlivých po sobě následných krocích.



Cytochromy P450 eukaryotických buněk, jak mikrozomální, tak mitochondriální, využívají NADPH jako donor elektronů pro průběh monooxygenačních reakcí. Rozdíl je u bakteriálních CYP450, kdy většina z nich má zajištěn přísun elektronů z NADH. Elektronový přenos z NADPH a CYP450 byl poprvé analyzován v roce 1966, se systémem mitochondriálních steroidů a hydroxylací P450. Dvě rozpustné složky, protein adrenodoxin a flavoprotein vázaný na NADPH, katalyzují přenos elektronů z NADPH do mitochondriálního CYP450. Mikrozomální systém P450 se skládá ze dvou komponent vázaných na membránu, cytochrom P450 a NADPH-cytochrom P450 reduktáza, jejíž původní název byl trochu jiný, a to NADPH-cytochrom c reduktáza. Do skupiny velice zajímavých cytochromů P450 patří CYP450 z *Fusarium oxysporum*, který katalyzuje redukci oxidu dusnatého pomocí NADH, bez účasti jakékoliv NADH vázané P450 reduktázy. Zdá se, že tento cytochrom je schopen přijmout elektrony přímo z NADH. [7]

Vazba substrátu na cytochrom P450 v malé míře mění jeho optické absorpční spektrum, což je nejsnadněji zjištělné pomocí červeného nebo modrého posunu Soretova vrcholu oxidované formy. Tato substrátem indukovaná spektrální změna byla objevena v roce 1965 studiem mikrozomálního CYP450 kůry nadledvin. Okysličená forma redukovaného P450 byla poprvé předvedena v roce 1971. Na základě těchto poznatků a dalšího pozorování byl poté navržen cyklický reakční mechanismus pro oxidační reakce katalyzované cytochromem P450. S malými úpravami je tento mechanismus stále adekvátní, požaduje do CYP450 přísun dvou elektronů, jeden

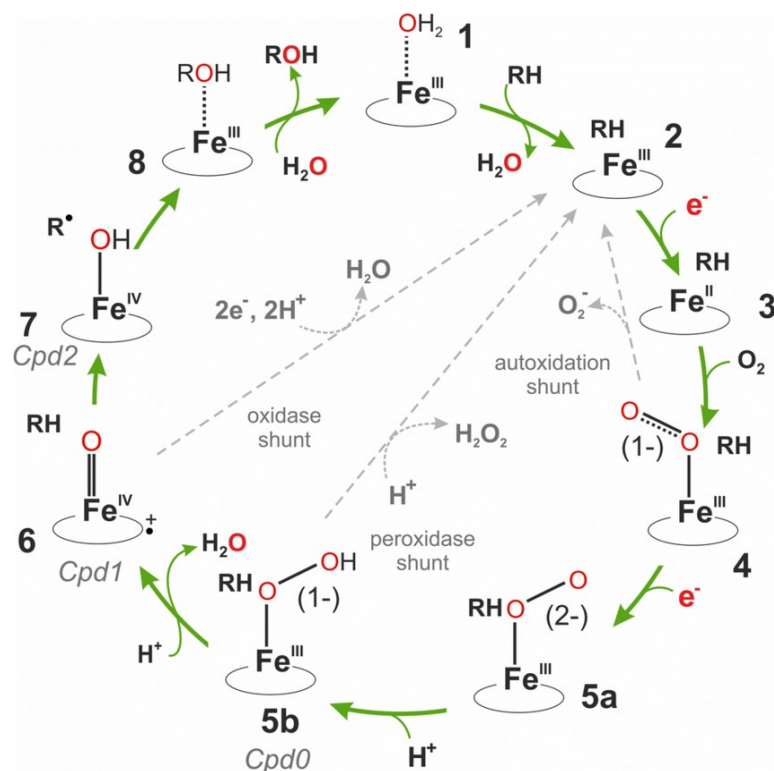
po druhém, ve dvou různých krocích cyklu oxidační reakce. První elektron je dodán do substrátem vázaného oxidovaného P450 k redukci hemového železa. Funkce druhého elektronu je aktivovat molekulu  $O_2$  vázanou na hem, pomocí štěpení vazby O-O. Jeden atom kyslíku je redukován na  $H_2O$  a druhý je zaveden do molekuly substrátu. Určitá část oxidovaného P450 uvolňuje vázanou molekulu kyslíku, ve formě superoxidového aniontu, jako vedlejší produkt oxidační reakce. [7]

Substráty pro reakce katalyzované CYP450 jsou ve většině případů hydrofobní sloučeniny. Některé cytochromy, jako je CYP2E1, mohou však také oxidovat hydrofilní substráty. Velká vnitřní kapsa molekuly CYP450, je obklopena hydrofobními aminokyselinovými zbytky a může pojmout různě velké hydrofobní molekuly, které se vážou do vazebného místa substrátu. Topologii vázané molekuly substrátu, vzhledem k aktivovanému atomu kyslíku na hemu, určuje místo oxidace. Struktura vazebného místa substrátu je analyzována pomocí rentgenové krystalografie. Tato analýza objasňuje jemné struktury vazebného místa pro substrát, a je využívána pro navrhování nových CYP450 s požadovanými specifitami substrátu. [7]

## 1.5 Mechanismus monooxygenázové reakce

Cytochromy P450 jsou díky své neobvyklé schopnosti umožňovat vysoce regio- a stereo-selektivní oxidační reakce nejvíce univerzálními přírodními katalyzátory. Katalyzují oxidační reakce rozsáhle komplexních, někdy i relativně inertních molekul, jako jsou alkany, MK, steroidy a léčiva. Tyto působivé chemické reakce provádějí s využitím sofistikovaného katalyzačního mechanismu, jehož schéma je znázorněno v obr. 3. Stručně řečeno, substrát se naváže na hexakoordinovaný železitý stav s nízkou rotací, zvaný jako klidový stav. Tato vazba vytěsňuje molekulu vody nacházející se na šestém vazebném místě a změní rotaci do pentakoordinovaného stavu s vysokou rotací. Železitá vázaná forma vykazuje pozitivnější redukční potenciál, což má za následek mnohem snazší redukci na železnatý stav. Vazba  $O_2$  na železnatý stav vede k tvorbě relativně stabilního železitého superoxo meziproduktu. Následná jednoelektronová redukce komplexu CYP450 vytváří nukleofilní železitý peroxo meziprodukt ( $Fe-O-O^{\cdot}$ ). Elektrony jsou do P450 dodány reduktázou, která katalyzuje oxidaci buď NADPH nebo NADH s následným dodáním elektronů z reduktázy obsahující flavin. Tento meziprodukt je typický brzkým rozpadem, z důvodu rychlého přidání protonu k distálnímu atomu kyslíku, k výrobě dalšího meziproduktu

hydroperoxidu železitého (Fe-O-O-H). Přidání druhého protonu ke koncovému atomu kyslíku zahájí štěpení heterolytických O-O vazeb, a vede k tvorbě vysoce reaktivního ferrylového radikálu  $\pi$ -kationtu hemu a  $\text{H}_2\text{O}$ . Atom kyslíku je přenášen na substrát prostřednictvím mechanismu odskoku kyslíku. Dochází k tvorbě monooxygenovaného produktu a obnovy železitého klidového stavu. [10, 11]



Obrázek 3 - Reakční schéma CYP450 [12]

Po celá desetiletí bylo jedním z hlavních cílů výzkumu CYP450 právě pochopení základního reakčního mechanismu každého enzymatického kroku reakce. Snaha byla identifikovat a charakterizovat silné oxidační meziproducty tohoto katalytického cyklu. Také je třeba poznamenat, že existuje celá řada neproduktivních stránek reakce, označovaných jako odpojení. Toto odpojení vede ke snížení obrátu substrátu, včetně autooxidace kyslíkového komplexu, dále k disociaci peroxidového nebo hydroperoxidového aniontu, nazývané „peroxidový zkrat“ a redukci ferrylového meziproductu na vodu. Tyto vedlejší reakce jsou velmi často využívány k testování funkčnosti vlastnosti daného cytochromu. Mohou být však využity i ke generování, zachycení a studii nestabilních meziproductů, s využitím alternativních oxidovadel např. umělých oxidačních činidel. Spektroskopické metody mohou poskytnout mnohostranné a podrobné informace o každém enzymatickém kroku pro různé

CYP450. Vazba substrátu obvykle vede ke změně ligačního stavu hemového železa a následně jeho spinového stavu, který může být monitorován UV-VIS absorpční spektroskopií a elektronovou spinální resonancí. Totéž platí pro vazbu inhibitoru, pokud jsou pozorovány změny v těchto spektrech. Redukce hemového železa ze železitého na železnatý stav, vede k charakteristickým změnám spekter, stejně tak i vazba na kyslík. Při daných podmínkách experimentu nebyla však pozorována tvorba peroxo- a hydroperoxo-železitých meziproductů, a je zde vyžadováno speciální metody kryopasce. Tato fakta ilustrují velkou hodnotu spektroskopických metod pro poskytování podrobných informací o jednotlivých základních krocích cyklu CYP450. [11, 13]

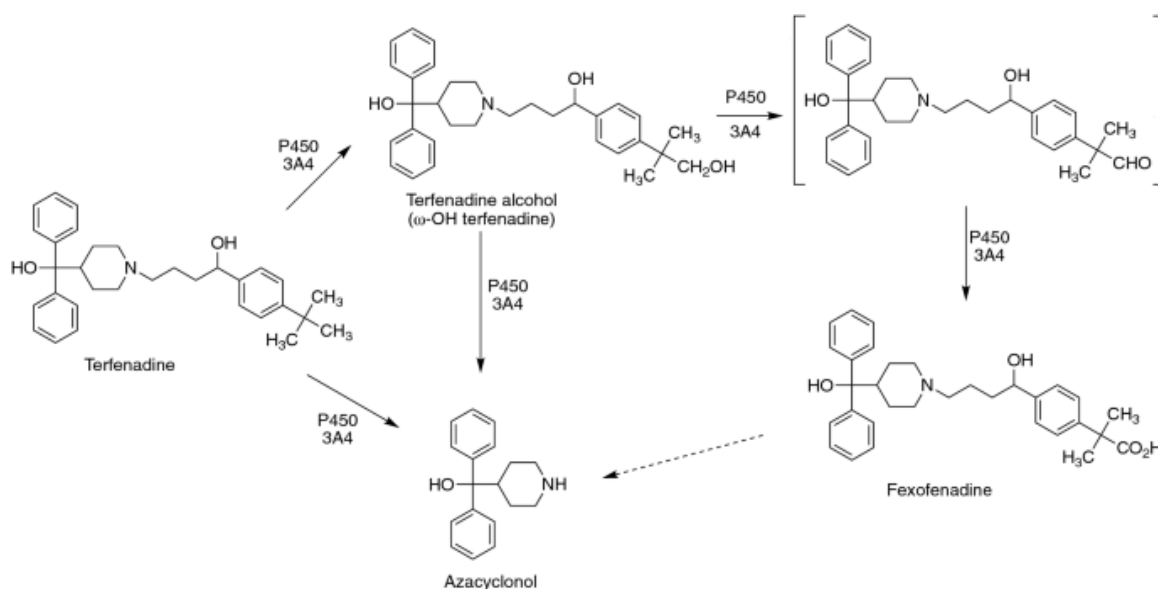
## 1.6 Funkce

V nejširším slova smyslu existují dvě hlavní funkce těchto enzymů. Jednu z těchto funkcí představuje metabolismus xenobiotik, jako ochranná úloha degradace a podpora solubilizace při přípravě na vylučování. Druhá role má uplatnění při biosyntéze kritických signálních molekul, jakožto nepostradatelných součástí pro kontrolu vývoje a homeostázy. Tyto funkce jsou v lidském organismu zabezpečeny prostřednictvím syntézy steroidních hormonů, vitamínů rozpustných v tucích, a v neposlední řadě přeměnou nenasycených mastných kyselin na biologicky aktivní molekuly. Srovnatelné funkce plní CYP450 i u rostlin a hmyzu. Rostliny se vyznačují neobvykle vysokým počtem genů P450, kdy důvodem je jejich sesilná povaha. Rostliny se brání rozpadu herbicidů prostřednictvím katalýzy syntézy velkého množství sekundárních metabolitů a obranných molekul, např. hydroxamových kyselin. [3]

Cytochromy P450 jsou hlavní enzymy podílející se na metabolismu léčiv. Jedním z hlavních problémů při vývoji léčiv je jejich biologická dostupnost a běžně se tedy počáteční studie mikrozomální stability zabývají prvotní předpovědí, zda bude většina léčiva rapidně eliminována při prvním průchodu organismem. Dalším řešeným problémem jsou vedlejší účinky léků, proto jsou jednotlivé dávky přesně definovány. Pokud má však jedinec inherentní, např. genetický nedostatek určitého CYP450 nebo je konkrétní enzym inhibován jiným léčivem, dochází pak ve většině případů k vzniku toxicity, způsobené hromaděním příslušného léčiva v organismu. Za hlavní příčinu nežádoucích účinků léků jsou považovány lékové interakce. Tyto jevy jsou často popisovány a chápány v kontextu s lidskými enzymy CYP450. Dobrým příkladem pro

tuto problematiku je metabolismus terfenadinu, který je zobrazen na obr. 4. Za normálních okolností je terfenadin velmi rychle oxidován CYP3A4 a hlavní metabolit fexofenadin je zodpovědný za farmakologickou aktivitu. V případě jednotlivců užívajících léky inhibující CYP3A4, jako jsou erytromyciny, dochází k nahromadění terfenadinu v plazmatické a srdeční tkáni. V menší míře může být inhibice způsobena i některými složkami potravy. [14]

Dalším příkladem toxicity léčiva je antikoagulační warfarin, který má relativně úzké terapeutické okno. Nízká dávka warfarinu vede ke srážení a příliš vysoká naopak může způsobovat vznik krvácení. Pro léčbu potřebnou účinnou dávkou lze pro každého jednotlivce individuálně upravit. Bylo prokázáno, že účinná dávka léčiva je ovlivněna polymorfismy, které působí na katalytickou aktivitu CYP2C9 v kódující oblasti. [14]



**Obrázek 4** - Oxidace terfenadinu CYP3A4 [15]

## 2 Izoformy CYP450

Každý člověk je jiný a dnes již víme, jak velkou roli v odpovědi organismu na lék hraje dědičnost a polymorfismus. Polymorfismus genu kódující metabolické pochody enzymů má významnou úlohu. Obecně jsou definovány jako genetické rozdíly vyskytující se mezi jednotlivci v incidenci do 1 %. Pro genetický polymorfismus jsou velmi podstatné genové mutace. Mezi jednotlivými přirozenými variacemi v populaci je třeba rozlišovat mezi vzácnými mutacemi způsobujícími onemocnění a polymorfismy, které se nachází u více jak 1 % populace. V případě CYP450 je známo mnoho mutací, které způsobují onemocnění, např. CYP1B1, CYP17, CYP19, CYP21 a CYP27B1. Tito zástupci se liší od polymorfismů, které mohou ovlivňovat metabolismus léčiv a náchylnost k nemocem, aniž by přímo způsobovali nemoc. Rozdíl se nachází v četnosti, kdy mutace vyvolávající onemocnění jsou velmi vzácné. Některé vzácné polymorfismy je velmi těžké popsat, dokud nebudou vyšetřeny stovky různých chromozomů. Podkladem polymorfismů může být záměna, chybění nebo vsunutí jednoho či více nukleotidů, duplikace a amplifikace genomu. [16, 17]

Konečný účinek v metabolismu léku závisí na množství enzymů, které se na přeměně léku podílí. Cytochromy P450 mají obecně širokou substrátovou specifitu, což znamená, že na metabolismu jednoho jediného léku se může podílet hned několik izoform CYP450. V případě, kdy je metabolismus léku závislý pouze na jediné izoformě, může vést genetický polymorfismus k významné změně účinku tohoto léku. Naopak tam, kde se na metabolismu léku podílí celá řada izoform CYP450, může v případě chybění jedné izoformy převzít její úlohu izoforma druhá. Není však pravidlem, že alternativní metabolická dráha nahradí původní v plném rozsahu. [16, 17]

### 2.1 CYP1A

Zástupci podrodiny CYP1A, cytochromy 1A1 a 1A2, se významně podílí na biotransformaci xenobiotik. Jsou to zejména xenobiotika běžně se vyskytující v potravinách a látkách škodlivých pro prostředí. Tyto izoenzymy se účastní aktivace několika zástupců prekarinogenů, mezi které se řadí např. aromatické či heterocyklické aminy, polyaromatické hydrouhlovodíky a mykotoxiny. Sdílí spolu 75 % identických AMK a velmi podobnou genovou organizaci. Jedna z odlišností mezi těmito zástupci je jejich výskyt, CYP1A1 se vyskytuje převážně extrahepatálně, naopak CYP1A2 přímo v játrech. I když mají mnoho společných induktorů, jsou zaznamenávány výrazné

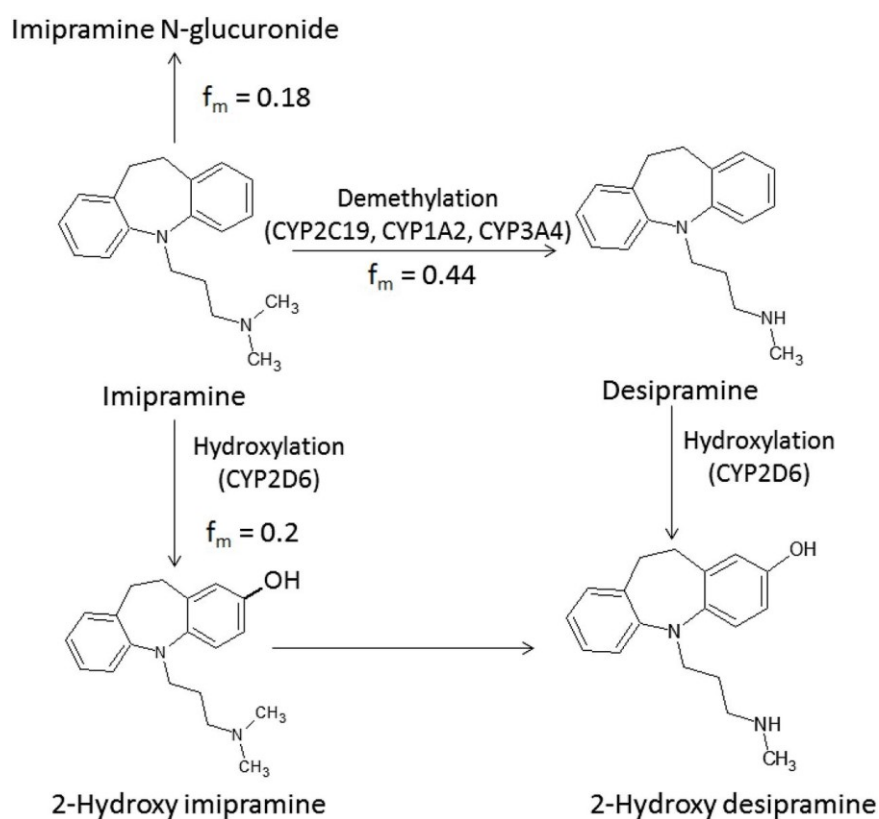
rozdíly mezi jejich transkripčními regulátory. Ačkoli byly studie regulačního mechanismu genu CYP1A2 zpomaleny z důvodu nedostatku kultivačních buněčných linií vhodných pro expresi, bylo zjištěno, že buněčné linie vyjadřují katalytickou aktivitu z transfektovaného chimérického genu CYP1A2. Tento expresní systém otevřel cestu k přístupu k molekulárnímu mechanismu transkripční regulaci CYP1A2 a mechanismů společných s CYP1A1. Zdálo se, že způsob indukce katalytické aktivity v transfektovaných buňkách věrně napodobuje způsob endogenní v CYP1A1. V přechodném expresním systému byla analyzována regulační aktivita sekvence genu CYP1A1, zavedením různých vnějších a vnitřních delecí. Bylo zjištěno, že nejméně dvě regulační sekvence deoxyribonukleové kyseliny (DNA) jsou odpovědné za vysokou úroveň indukovatelné exprese genu v reakci na induktory. Jedna z nich dostala název xenobiotický responzivní prvek a funguje jako indukovatelný zesilovač v reakci na induktor, avšak nejeví žádnou reakci na glukokortikoidový hormon. Druhá je zapojena do konstitutivního vyjádření genu a pojmenována jako bazální transkripční prvek. Tento prvek je nezbytný pro transkripci genu ve zkumavce. [18]

Obecně se cytochromy P450 nacházejí v endoplazmatickém retikulu a vyžadují přítomnost koenzymu NADPH reductázy, který katalyzuje reakci dvou elektronů pro jejich enzymatickou aktivitu. Brzké výzkumy však prokázaly, že kromě výskytu v ER je jejich lokalizace i v mitochondriích jaterní tkáně, jako je to v případě CYP1A1. Následné studie však odhalily, že se tento izoenzym nachází v ER a mitochondriích v závislosti na stavu tkáně, věku živočicha a induktorové předúpravě. Postupem času bylo nalezeno několik mutací CYP1A1, které odpovídají patnácti různým alelickým variantám, kdy jsou jednotlivé varianty značeny např. CYP1A1\*2B, CYP1A1\*2C. Konvenční teorie týkající se účinků polymorfismů naznačují, že jednotlivé varianty ovlivňují funkce enzymu prostřednictvím změny hladiny exprese genu nebo mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA). [19]

Několik výzkumů naznačilo, že CYP1A2 byla hlavní izoforma exprimovaná v játrech dospělých, zatímco CYP1A1 byl exprimován na velmi nízkých úrovních nebo chyběl úplně. CYP1A2 podporoval metabolismus široké škály léčiv a chemikálií, včetně fenacetinu a kofeinu. CYP1A1 se podílel zejména na biotransformaci látek znečišťujících životní prostředí a karcinogenů, jejichž příkladem je např. benzopyren. Data ze shromážděných vzorků dospělých jedinců potvrdila fakt, že se CYP1A1 nevyskytuje v jaterních mikrozomech. Enzymatické aktivity podporované proteiny CYP1A byly také zkoumány. Tyto výzkumy naznačily, že CYP1A2 exprimovaný

v játrech účinně dealkyluje methoxyresorufin. Naopak ethoxyresorufin byl vhodným substrátem pro CYP1A1, který byl při dealkylaci etherů aktivnější než CYP1A2. Studie ontogeneze proteinů CYP1A v perinatálním období v lidských játrech potvrdily, že CYP1A2 chyběl ve fetálních jaterních mikrozomech. Dále byl sotva detekovatelný v časných novorozeneckých mikrozomech a snadno viditelný u kojenců ve věku 1 až 3 měsíců. Ontogenní profil aktivit demethylázy a deethylázy v jaterních mikrozomech je paralelní s vývojem proteinu a potvrdil, že CYP1A2 se vyvinul později během novorozeneckého období. Za použití stejných vzorků bylo prokázáno, že většina cytochromů P450 chyběla ve fetálních játrech a prudce vzrostla během několika hodin nebo dnů po narození, bez ohledu na gestační věk po porodu. Z těchto zástupců se CYP1A2 vyvinul jako poslední a mohl být tedy pod kontrolou zatím neznámého specifického prvku. Jeden z důsledků pro opoždění ontogeneze CYP1A2 během novorozeneckého období může být posun z jedné biotransformační dráhy do druhé. V případě, že se jedná o metabolismus imipraminu, exprese lidských cytochromů P450 umožnila dospět k závěru, že hydroxylace imipraminu byla katalyzována polymorfním CYP2D6, zatímco jeho demethylace byla podporována jak CYP1A2, tak CYP3A4, jak můžeme vidět na obr. 5. CYP1A2 byl však podle příslušných afinit a rychlostí účinnějším katalyzátorem než CYP3A4, a to až 10x. Postupné zvyšování proteinů během prvního měsíce, respektive prvního trimestru, vedlo ke zvýšení demethylace, což mělo za následek rovnováhu mezi biotransformačními cestami v dospělosti. [20]





**Obrázek 5** - Metabolismus imipraminu [21]

Izoforma CYP1A1 byla a stále je studována zejména v souvislosti s rakovinou. V dnešní době je již akceptováno, že velké procento rakovin je vyvoláno přírodními chemickými sloučeninami z našeho prostředí. Karcinogenní rizika od expozice exogenními chemickými karcinogeny závisí nejen na jejich přirozené povaze, množství dávky, ale také na vnitřní individuální citlivosti na karcinogeny. Mezi tyto citlivosti se řadí zejména metabolická aktivace, která může být dána geneticky. Většina chemických karcinogenů vyžaduje metabolickou aktivaci enzymy, mezi něž se řadí právě CYP1A1. Ačkoliv může být bráno v úvahu mnoho faktorů náchylnosti k rakovině, genetická variabilita metabolické aktivace karcinogenu je spojována hned s několika predispozicemi rakoviny. Četné studie však spojují kolorektální karcinom s kouřením cigaret a rakovinu tlustého střeva s konzumací potravin, které potenciálně obsahují polycyklické aromatické uhlovodíky. Právě u těchto látek byla pozorována zvýšená metabolická aktivita pro mutace CYP1A1. Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), byla hodnocena frekvence polymorfismu CYP1A1. Případové studie byly zaměřeny na zkoumání, zda polymorfismy opravdu souvisí se zvýšeným rizikem kolorektálního karcinomu. [22, 23]

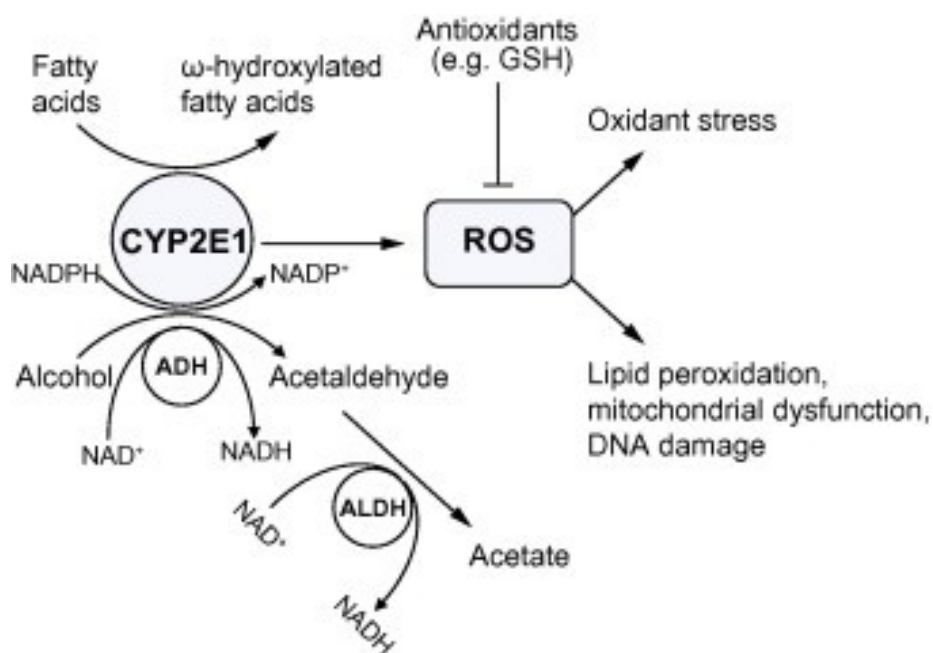
Je zřejmé, že pokud by byla bezprostředně dokázána spojitost mezi genetickými polymorfismy a výskytem rakoviny způsobené cigaretami, byly by tyto informace velmi užitečné při předpovídání individuálního rizika rakoviny. Avšak obecně jsou důkazy týkající se asociace genetických polymorfismů CYP1A1 s výskytem rakoviny protichůdné. Některé výzkumy dospěly k závěru, že přítomnost polymorfních variant CYP1A1 vede ke zvýšené náchylnosti na rakovinu, zatímco jiné neuvěly žádný vztah mezi těmito stavy. Přestože vyšší procento experimentálních výsledků ukazuje na pozitivní asociaci je za potřebí dalších výzkumů, aby byly tyto nálezy úspěšně extrapolovány na lidskou populaci. [24]

## 2.2 CYP2E

Cytochromy P450 jsou zodpovědné za metabolismus většiny xenobiotik a jsou nezbytné pro účinné vyloučení cizích chemikálií z těla. Paradoxně tyto enzymy také metabolicky aktivují biologicky inertní sloučeniny na elektrofilní deriváty, které mohou způsobit toxicitu, buněčnou smrt a někdy i buněčnou transformaci vedoucí k rakovině. K nejznámějším z podrodiny CYP2E se řadí izoforma CYP2E1, která je považována za hlavní jaterní cytochrom P450. CYP2E1 je lokalizován zejména v endoplazmatickém retikulu, nicméně byl registrován i v mitochondriích. Tato izoforma je známa především pro svoji účast na metabolismu ethanolu, prostřednictvím vícestupňových oxidačních reakcí. Bylo charakterizováno mnoho reakcí katalyzovaných CYP2E1 a stanoveny konstanty Michaelise-Mentenové. Některé reakce byly dále studovány za použití izotopové substituce substrátu. Jednou z těchto reakcí je CYP2E1 katalyzovaná oxidace ethanolu na acetaldehyd. Laboratoře naznačily, že kinetický účinek izotopu vodíku může být vysvětlen uvolňováním produktu omezující rychlost a podstatně nevratným krokem rozbití C-H vazby. Jak bylo již dříve analyzováno, acetaldehyd generovaný oxidací ethanolu slouží jako substrát pro CYP2E1 a je oxidován na kyselinu octovou. Acetaldehyd je oxidován s hodnotou  $k_{cat}/K_M$  alespoň o 1 řád vyšší než ethanol. Je zde však mnoho kinetických podobností a časový průběh reakce byl charakterizován zpožděním při tvorbě kyseliny octové. Na druhou stranu však bylo zjištěno, že ani ethanol, acetaldehyd ani kyselina octová nemají vysokou afinitu k CYP2E1, a proto musí být krok určující rychlost reakce stanoven jinak než pomocí samotného uvolněného produktu. Celková reakce tedy není řízena afinitou ke kterémukoliv z ligandů, ale rychlostí jednotlivých enzymatických kroků. Skutečná chemická rychlost

reakce je tlumena rychlostí kroků katalyzačního mechanismu. Aktivitu CYP2E1 lze účinně regulovat na několika úrovních. Zásadní změny v aktivitě CYP2E1 způsobuje dieta a hladovění, což naznačuje jeho důležitou roli při oxidaci endogenních substrátů. [25, 26]

Indukce CYP2E1 ethanolem, která je zobrazena na obr. 6 je jednou z centrálních cest, kterými ethanol generuje stav oxidačního stresu v hepatocytech. Je důležité si uvědomit, že aktivace kyslíku CYP450, nezbytná pro katalytickou funkci enzymu, může vést k nadprodukci reaktivních forem kyslíku (ROS). Oxidační stres je výsledkem nárůstu intracelulárních prooxidantů, jakou jsou  $H_2O_2$ , hydroxidový radikál nebo radikál superoxidového aniontu. Vysoké intracelulární hladiny ROS mohou vést k poškození mitochondrií, modifikacím DNA, zvýšené produkci cytokinů a dokonce i k buněčné smrti. U člověka mohou vyvolávat závažné patologické stavy, mezi něž se řadí Alzheimerova choroba, ateroskleróza, rakovina, cukrovka, revmatoidní artritida nebo různé neurologické poruchy. Mimo jiné je oxidační stres také považován za jednu z příčin stárnutí. Oxidační stres nebo toxicita vyvolaná ROS odráží rovnováhu mezi rychlostí produkce ROS a rychlostí odstranění ROS. Zatímco přebytek ROS může způsobit toxicitu, makrofágy a neutrofilů obsahující NADPH oxidázu produkují ROS ke zničení cizích organismů. Kromě toho jsou ROS v nízkých koncentracích, zejména  $H_2O_2$ , důležité v mechanismu přenosu signálu v buňkách, a proto se účastní buněčné fyziologie a metabolismu. [27]



**Obrázek 6** - Indukce CYP2E1 ethanolem [28]

Chronická konzumace alkoholu může vést k cirhóze a smrti jaterních buněk. Předpokládá se, že poškození jater vyvolané alkoholem je ve skutečnosti způsobeno oxidačním stresem, který je důsledkem konzumace alkoholu. Oxidační stres vyvolaný ethanolom může být experimentálně omezen podáváním antioxidantů, včetně prekurzorů glutathionu. Naopak přítomnost alkoholdehydrogenázy oxidační stres značně zvyšuje. CYP2E1 metabolizuje kromě ethanolu také celou řadu chemických látek s nízkou relativní molekulovou hmotností na meziprodukty, které se mohou samy vázat na buněčné makromolekuly jako je DNA a způsobovat poškození buněk, hepatitidu a cirhózu. Již je známo, že metabolismus CYP2E1 a jeho substrátů vede ke zvýšení ROS, zajímavé však je, že exprese CYP2E1 může generovat ROS i přes absenci substrátu. Tento jev je způsoben aktivitou NADPH oxidázy, která je nezávislá na exogenních xenobiotických substrátech. [29]

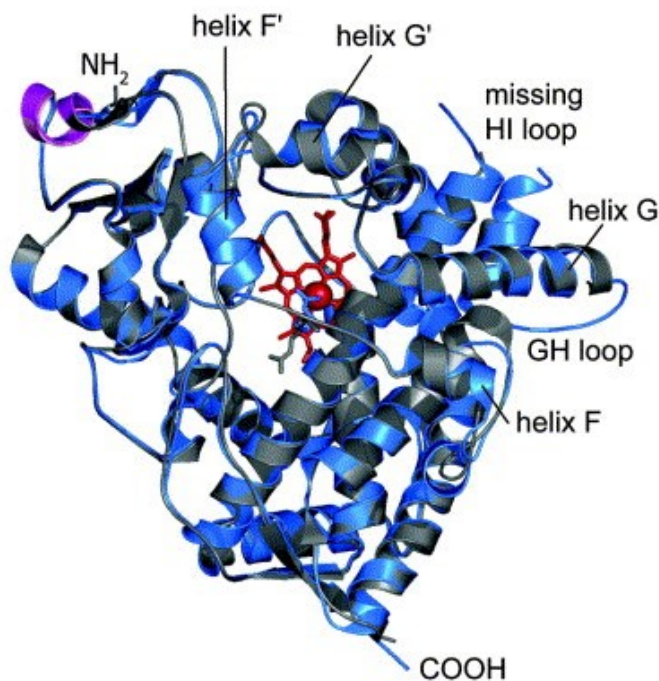
Přestože bylo v minulosti provedeno několik studií, které potvrzují účast CYP2E1 na poškození jater vyvolané alkoholem, najdou se i takové, jejichž data potvrzují myšlenku, že CYP2E1 hraje v tomto případě jen opravdu malou roli. Aby byl tento spor vyřešen, byly prováděny další testy na myších. U myší, kterým byl podáván enterální ethanol, se vyvinula stejná míra steatózy, mírný zánět a nekróza. Kromě těchto nálezů nebyly nalezeny žádné další rozdíly v tvorbě volných radikálů mezi CYP2E1 jednotlivých myší. Tyto údaje jsou tedy v souladu s hypotézou, že oxidační stres z CYP2E1 nehraje žádnou nebo jen malou roli v mechanismech časného poškození jater vyvolaného alkoholem. Faktorem k zahájení časného poškození jater vyvolaného alkoholem tedy může být indukce dalších izoform CYP450. [30]

Je známo, že železo podněcuje toxicitu ethanolu a je katalyzátorem produkce silných oxidantů, které interagují s makromolekulami buněk a způsobují buněčnou toxicitu. Byly provedeny experimenty, které se pokusily spojit CYP2E1, železo a oxidační stres jako potenciální mechanismus, kterým železo zvýšilo toxicitu ethanolu. Přidáním železitého nitrilotriacetátu k buňkám exprimujícím CYP2E1 se snížila jejich životaschopnost, zatímco u použitých kontrolních buněk, které CYP2E1 neexprimují byl pozorován jen malý účinek. Toxicita v buňkách byla výrazně snížena po vyčerpání glutathionu, a bylo jí zcela zabráněno pomocí vitamínu E. Tyto výsledky naznačují, že zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku v buňkách exprimujících CYP2E1 v přítomnosti železa vede ke zvýšené peroxidaci lipidů. Tento stav má za následek ztrátu životaschopnosti buněk a poškození mitochondrií. [31]

Cytochrom P450 vykonává svoji funkci třemi katalytickými enzymatickými reakcemi. První aktivita enzymu je aktivita jakožto monooxygenáza, kdy dochází k aktivaci molekulárního kyslíku elektrony z NADPH pomocí NADPH reductázy a vložení jednoho atomu molekulárního kyslíku do substrátu. Následuje druhá katalytická aktivita, běžně označovaná jako aktivita oxidázy, ta zahrnuje přenos elektronů z CYP450 na molekulární kyslík za vzniku radikálového superoxidového aniontu a peroxidu vodíku. Třetí katalytická aktivita CYP450, známá jako aktivita reductázy zahrnuje přímý přenos elektronů na redukovatelné substráty za anaerobních podmínek. Tyto děje probíhají nejen v játrech a ledvinách, ale v menší míře i v mozku. V mozku jsou cytochromy P450 přítomny v mnoha kompartmentech subcelulárních membrán, včetně plazmatické membrány, endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu, lysozomů, peroxizomů a mitochondrií. Oblasti mozku se liší hustotou, složením a buněčným typem, a jak se tedy dalo očekávat lokalizace CYP450 v mozku je heterogenní a jeho hladiny se liší dle jednotlivých oblastí. Mezi nejvýznamnější enzymy zde patří mimo CYP1B1, CYP2D6, CYP2J2, CYP46A1 také CYP2E1. CYP450 se účastní v mozku metabolismu různých sloučenin, jako jsou antidepresiva, antipsychotika, ethanol, nikotin, pesticidy, MK, steroidy a neurotransmitery. Xenobiotické transformace v mozku se účastní podrodiny CYP 1A, 2B nebo také 3A. Vysoká exprese CYP2E1 byla zaznamenána zejména v mitochondriích mozku potkana, kde nejvyšší katalytickou aktivitu proteinu CYP2E1 vykazují čichové laloky. Studie mozku potkanů popisují konstitutivní expresi CYP2E1 v pyramidových neuronech frontální kůry, kortikálních astrocytech a polymorfni buněčné vrstvě v hipokampu. Expresce CYP2E1 v lidském mozku byla detekována ve všech zkoumaných oblastech mozku, zejména v neuronech kůry, mozečku a hipokampu. V mozku opic se exprese významně podobá distribuci CYP2E1 u nekuřáků a nealkoholiků, což naznačuje významné rozdíly v expresi mezi mozky hlodavců a primátů. Ve všech případech je přítomnost CYP2E1 v různých oblastech specificky závislá na buňkách. Tato zjištění podporují skutečnost, že různé potřeby mozku závisí na buňce a oblasti, a poukazují na zranitelnost nebo účinnost metabolismu v různých oblastech vůči CYP2E1. Schopnost exprese, katalytické aktivity CYP2E1, dále schopnost metabolizovat a být indukovan chemickými látkami mezi které se řadí ethanol a aceton tedy dokazuje, že CYP2E1 hraje velmi důležitou roli v metabolismu savců. [32, 33]

## 2.3 CYP3A

Stejně jako všechny savčí enzymy P450, je i CYP3A4 membránový protein, jehož strukturu můžeme vidět na obr. 7. První výzkumy vedly ke stanovení struktury membrány zkrácením jediné N-koncové transmembránové šroubovice a manipulací s rozpustností druhé povrchové oblasti vázající membránu. Teprve nedávno vědci uvedli první struktury enzymu CYP3A4 metabolizujícího léky. CYP3A4 si zachovává obecnou terciální strukturu složenou z několika prvků  $\beta$ -listu a mnoha šroubovic, které jsou označeny písmeny A – L. V porovnání se strukturami rodiny CYP2 je struktura CYP3A4 rozšířena o další šroubovici umístěnou na N-konci. Význam této nové šroubovice není zatím zcela znám. Kromě toho se enzymy CYP3A4 liší od rodiny CYP2 i v dalších oblastech zahrnující helixy B – C a helixy F – G. Tyto helixy jsou pojmenovány podle abecedy, pomocí konvence počínaje od N-konce. Rozdíly v těchto oblastech naznačují jejich strukturální rozmanitost a flexibilitu. Mezi nejzajímavější rysy struktur CYP3A4 se řadí celková velikost a tvar dutiny aktivního místa, která sousedí s hemovým železem. Tvar aktivního místa je mimo jiné také zásadní pro interpretaci funkce CYP3A4. Objem aktivního místa je důležitý, protože je známo, že CYP3A4 metabolizuje hned několik velkých substrátů včetně bromokryptinu, erytromycinu a cyklosporinu. Ačkoli byly uváděny velmi rozdílné objemy pro dutinu aktivního místa, nové analýzy naznačují, že se jedná spíše o projev různých výpočtových strategií a mezních hodnot, než o významné rozdíly mezi strukturami. Studie prokazují, že objem aktivního místa je schopen sekvestrovat molekuly, které jsou aspoň tak velké jako erytromycin. Pokud je aktivní místo významně větší než substrát, může být jediná molekula substrátu schopna předpokládat buď produktivní, nebo neproduktivní orientaci. Vazba další molekuly substrátu může podporovat metabolismus stabilizací první molekuly substrátu v produktivní orientaci. Kromě toho CYP3A4 také vykazuje heterotropní kooperativu, což naznačuje, že se v aktivním místě může vázat víc než jeden druh ligandu. Údaje o homotropní a heterotropní kooperativě společně naznačují, že aktivní místo CYP3A4 by tedy mohlo být schopné vázat až tři molekuly substrátu současně. [34]



**Obrázek 7** - Struktura CYP3A4 bez ligandů [34]

CYP3A je nejhojněji exprimovanou podrodinou cytochromů v lidských játrech. O této podrodině je obecně známo, že se skládá ze dvou hlavních forem, CYP3A4 a CYP3A5. V játrech plodu se pak jedná navíc i o CYP3A7. Typ CYP3A5 je přítomen v játrech pouze u asi 20 % dospělých jedinců. Provedení nového neinvazivního testu lidského jaterního glukokortikoidu indukovaného CYP3A naznačuje hned několik možností. Za prvé, heterogenita související s pohlavím ve funkci indukovaného lidského CYP3A přetrvává během normálního stárnutí. Za druhé, aktivita CYP3A může klesat u jedinců s obezitou, a za třetí, celková aktivita CYP3A je stabilní během fyziologického stárnutí. Jaterní CYP3A katalyzují oxidaci klinicky důležitých léků včetně erytromycinu, nifedipinu, cyklosporinu, chinidinu a klotrimazolu. Bylo prokázáno, že dechový test erytromycinu neinvazivně profiluje aktivitu hlavního zástupce rodiny jaterních CYP3A. U žen byla tato aktivita výrazně vyšší než u mužů. Kromě možného ovlivnění aktivity související s věkem a pohlavím, nedávné studie prováděné na potkanech odhalily změny aktivity specifických izoform cytochromu P450 se změnami stravy a hmotnosti. Strava s vysokým obsahem cholesterolu u testovacích subjektů zvýšila množství a aktivitu CYP3A. V nedávné studii u hypertoniků bylo zjištěno, že aktivita lidského jaterního CYP3A, získaná pomocí erytromycinového dechového testu, klesá se zvyšujícím se % ideální tělesné hmotnosti.

Vzhledem k tomu, že celkový tělesný tuk s věkem u lidí roste, budou jistě další studie zkoumat interakci ideální tělesné hmotnosti s aktivitou jaterního CYP3A. [35, 36]

Zástupci rodiny CYP3A se řadí mezi enzymy, které metabolizují epipodofilotoxiny. Tyto látky se vyskytují u leukémií. Výzkumy naznačují, že jedinci s genotypem CYP3A4-W jsou vystaveni zvýšenému riziku leukémie související s léčbou. Dále pak metabolismus epipodofilotoxinu prostřednictvím CYP3A4 může přispívat k sekundárnímu riziku rakoviny. Genotyp CYP3A4-W v jisté míře zvyšuje produkci reaktivních meziproduktů potenciálně poškozujících DNA. Další důležitou vlastnost má CYP3A4 přítomný v enterocytech tenkého střeva, ten může katalyzovat podstatnou část metabolismu některých orálně podávaných léků. Nedávná data odhalují, že PGP (P-glykoprotein) přítomný v enterocytech omezuje biologickou dostupnost mnoha stejných léků, které interagují s enzymy CYP3A. Nově existuje několik potenciálních mechanismů, díky nimž by funkce PGP a CYP3A4 mohly být pouze doplňkové. Za prvé, PGP může omezit absorpci léku v proximálním tenkém střevě a posunout ji do distálnějších, méně katalyticky účinnějších segmentů, které obsahují nižší množství CYP3A4. Za druhé PGP může prodloužit dobu absorpce. To by prodloužilo dobu expozice léčiva, a tím i rozsah metabolismu CYP3A4. Nakonec může PGP přednostně odstranit z enterocytů primární metabolity léčiv, které jsou samy o sobě substráty pro CYP3A4. Tento děj by měl za následek omezení inhibice produktu a vedl by k usnadnění primárního metabolismu katalyzovaného CYP3A4. [37, 38]

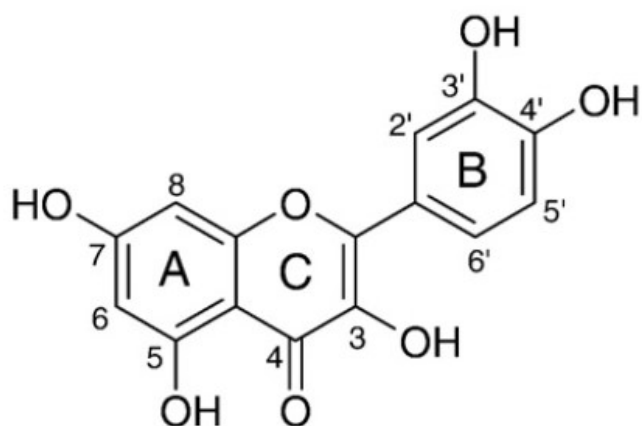
Rodina enzymů CYP3A představuje nejvýznamnější enzymy metabolizující léčiva. Odhaduje se, že CYP3A metabolizuje mezi 50 % a 70 % všech aktuálně podávaných léčiv. Vzhledem k tomu, že se CYP3A4 účastní metabolismu většiny léčiv, je třeba upozornit, na lékové interakce, které mohou vést k velmi nežádoucím účinkům. Mezi léčiva, která se vyznačují velkým potenciálem k lékovým interakcím, patří např. erytromycin, itraconazol, ketokonazol nebo také nifedipin. V dnešní době je již prokázáno, že přirozeně se vyskytující doplňky stravy mohou modulovat jaterní a enterocytární aktivitu CYP. Snad nejlépe doložená a klinicky relevantní léková interakce je pozorována u grapefruitového džusu. Současná konzumace grapefruitové šťávy spolu s řadou léčebných látek, které podléhají prvnímu průchodu intestinálním metabolismem, vedla k vyšším plazmatickým hladinám s následnými nepříznivými účinky. Grapefruitový džus účinkuje prostřednictvím inhibice intestinálního CYP3A4, který reguluje presystémový metabolismus. Ačkoli může jaterní biotransformace



významně přispět k systémové eliminaci léčiva, kombinace jaterního a střevního metabolismu léčiv může způsobit významnou presystémovou ztrátu léčiva. [39, 40]

Podle nedávných epidemiologických zpráv značné procento populace užívá během svého života bezplatnou a alternativní medicínu. Pacienti s HIV nebo rakovinou často konzumují rostlinné produkty jako je třezalka tečkovaná pro antidepresivní účinky v kombinaci s léky na předpis. Takovéto samostatně podávané rostlinné produkty spolu s předepsanými léky zvyšují obavy z terapeutické aktivity kvůli možným lékovým interakcím. PGP a CYP3A4 spolu tvoří vysoce účinnou bariéru pro mnoho perorálně podávaných léčiv. Klinické zprávy a studie naznačují, že mnoho léčivých látek a rostlinných účinných látek se řadí mezi substráty právě pro PGP nebo CYP3A4. Předběžné studie, které přímo zkoumaly interakce mezi třezalkou tečkovanou a CYP, naznačují, že může modulovat zejména izoformu CYP3A4. Několik výzkumů dokonce prokázalo, že surový extrakt této rostliny inhibuje účinky CYP3A4. Mezi složky primárně zodpovědné za tyto inhibiční interakce patří hyperfotin, hypericin a kvercetin. Protože makrolidová antibiotika a azolová antimykotika spolu s mnoha rostlinnými látkami patří mezi substráty stejného CYP3A4, mohou tyto sloučeniny ovlivňovat orální biologickou dostupnost terapeutických látek indikovaných při léčbě imunosuprese, HIV, rakoviny a dalších oportunních infekcí. V závislosti na mechanismech bylinných interakcí s terapeutickými látkami by tyto látky mohly snižovat hladinu léku proti HIV v krvi, což by mohlo vést k vzniku rezistence. Jako důležité faktory rezistence na léky byly přijaty farmakokinetické mechanismy. [40, 41]

Přestože mnoho klinických studií uvádí indukční účinky třezalky na CYP3A4, najdou se i takové, které tyto závěry nepotvrzují. Tyto zprávy jsou v souladu s další nedávnou studií, popisující metabolické interakce CYP3A4. Studie uvádí, že čtyřdenní léčba extraktem třezalky a jejích složek, hypericinu, a hyperforinu, u myši nevedla k žádné indukci CYP3A4. Naproti tomu, byl inhibiční účinek třezalky hlášen v buňkách transfektovaných CYP. V souladu s tímto pozorováním se uvádí, že kvercetin, jehož molekulární struktura je znázorněna na obr. 8, který je jednou z tří hlavních složek třezalky tečkované, má hlavní inhibiční účinek na CYP3A4. I přes značné množství výzkumů, tento rozpor zatím není vyřešen. [40]



**Obrázek 8** - Molekulární struktura kvercetinů [42]

## 2.4 CYP4

CYP4 je jednou z nejstarších rodin cytochromů P450, která se vyvinula asi před 1,25 miliardami let, těsně po vzniku genů pro biosyntézu steroidů. Tato rodina úzce souvisí s enzymy metabolizujícími cholesterol a společně se mohli podílet na udržování integrity membrány u časných eukaryot. Rodina enzymů CYP4 obsahuje více jak 11 podrodin, kdy jednotlivé izoenzymy vykazují jak konstitutivní, tak indukovatelnou expresi. Mezi podrodiny nacházející se u lidí se řadí pouze 6 podrodin, a to CYP4A, B, F, V, X a Z. Rodina CYP4 byla identifikována v roce 1987, kdy byl poprvé izolován, klonován a sekvenován CYP4A1. Aminokyselinová sekvence byla ve srovnání s ostatními zástupci CYP450 homologní méně jak 36 %, proto byla označena jako první člen nové rodiny. Přesný počet členů v této rodině není znám, protože se stále identifikují noví členové. Enzym CYP4A1, nejrozsáhleji studovaný člen rodiny CYP4, je konstitutivně exprimován v játrech a ledvinách. Podrodina CYP4B má doposud pouze jediného zástupce nacházejícího se v lidských tkáních. CYP4B1 je exprimován tkáňově a druhově specifickým způsobem. U králíka je exprimován v plicích a játrech a je v játrech indukován fenobarbitonem. U křečka je konstitutivně exprimován také v plicích a játrech, ale není indukován. U lidí byl enzym CYP4B1 identifikován klonováním DNA plic, ale nebyl detekován v játrech. [43, 44]

Rodina CYP4 hraje hlavní roli v metabolismu MK, ve většině případů prostřednictvím oxidace MK a následné katalýzy v mitochondriích za vzniku buněčné energie. Protože CYP4 katalyzuje metabolismus na kyslíku závislých organických

molekul, vyžadují tyto procesy dodání dvou elektronů k hemoproteinu. CYP4B metabolizuje MK s krátkými řetězci, zatímco CYP4A a CYP4V metabolizují MK se středně dlouhými řetězci a CYP4F katalyzuje MK s dlouhými řetězci. Snížení hladiny exprese rodiny CYP4 bylo spojeno s akumulací tuků v tkáních, jako jsou játra. Snížené hladiny proteinů CYP4 proto snižují kapacitu pro odstraňování tuků z tkání. Několik studií uvádí, že u kardiovaskulárních onemocnění jsou nadměrně exprimovány CYP4A a CYP4F. V metabolismu léčiv se důležitost role CYP4 zdá oproti rodinám CYP1, 2 a 3 menší, avšak enzymy CYP4 se i přesto nepřímo podílejí na metabolismu léků a na lékových interakcích. Například CYP4F2 a CYP4F11 se podílejí na metabolismu vitamínu K, což usnadňuje jeho detekci a eliminaci. Množství aktivního vitamínu K je důležité pro udržování dávkování warfarinu, protože je silně metabolizován CYP2C9, to vede k závěru, že na udržování dávky warfarinu se nepřímo podílejí enzymy CYP4. Izoformy CYP4 vykazují katalytickou aktivitu vůči různým MK a jejich metabolity mají potenciál působit jako ligandy nebo aktivátory jaderných receptorů. Prostřednictvím metabolismu zánětlivých molekul se enzymy CYP4 účastní zánětu. Metabolizují zánětlivé mediátory, jako jsou leukotrieny. V makrofázích zánětlivých buněk byl poprvé identifikován CYP4V2 a jeho genová exprese byla snížena po selektivní léčbě. V závislosti na klinické situaci lze aktivitu  $\omega$ -hydrolázy spojenou s CYP4 považovat za potenciální lékový cíl pro snížení zánětlivé odpovědi, což poskytuje nový mechanismus pro budoucí protizánětlivé léky. [45–47]

### 3 Xenobiotika

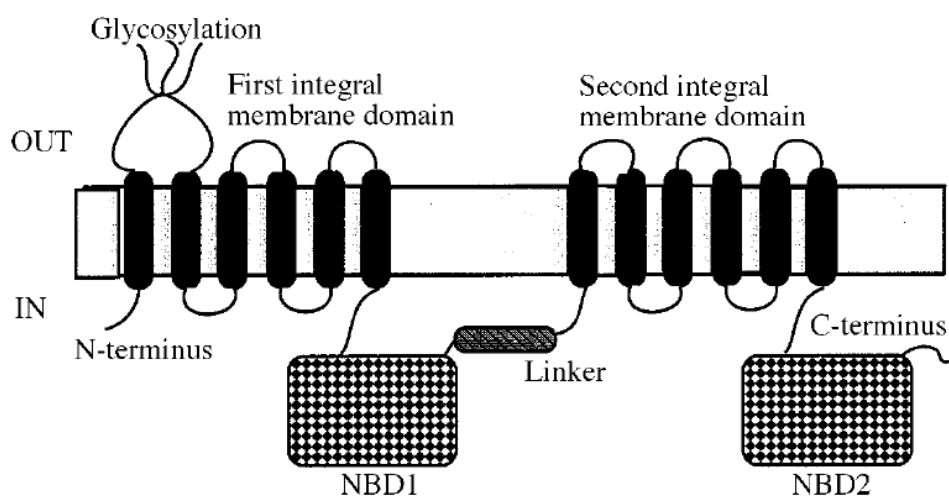
Xenobiotika neboli organismu cizorodé sloučeniny, jsou definována jako chemikálie, jimž je organismus vystaven, a která se v organismu běžně nevyskytují. Případně se v těle vyskytují jen ve velmi malých koncentracích a běžně jsou z těla vylučována ven. Bez metabolismu by mnoho xenobiotik dosáhlo pro organismus toxických koncentrací. Ve většině případů se jedná o lipofilní látky, které jsou biotransformací přeměněny na látky hydrofilní povahy. Metabolická aktivita vyžaduje k tomuto ději energii, kofaktory a enzymy. Enzymy metabolizující xenobiotika lze rozdělit na enzymy fáze I, fáze II a transportní enzymy. Metabolismem xenobiotik a jejich osudem v organismu se zabývá xenobiochemie a toxikologie. [48]

#### 3.1 Metabolismus

Podnět ke studiu metabolismu xenobiotik začal, když se zjistilo, že mnoho organických sloučenin syntetizovaných člověkem je v prostředí perzistentních. Z počátku byla tato myšlenka neočekávaná, protože se mělo za to, že mikroorganismy jsou neomylné, tedy schopné oxidovat jakoukoliv látku, která je teoreticky schopná oxidace za předpokladu, že jsou příznivé podmínky prostředí. V první řadě se začal zkoumat vztah mezi metabolismem xenobiotik, jejich toxicitou a rolí CYP450 v této problematice. Metabolismus xenobiotik může být ovlivňován celou řadou faktorů, včetně stravy. Nutriční nedostatky obecně způsobují snížení rychlosti xenobiotického metabolismu. V určitých případech, jako je nedostatek thiaminů a mírný nedostatek riboflavinu, však byly pozorovány zvýšené rychlosti metabolismu. Je známo, že specifické živiny mohou mít různé účinky na různé formy CYP450, a tak mohou ovlivňovat i metabolismus xenobiotik. [49, 50]

Ačkoliv se fáze I metabolismu xenobiotik účastní několik enzymových systémů, nejpozoruhodnější cesta v tomto schématu je monooxygenace katalyzovaná CYP450. CYP detoxikují nebo bioaktivují obrovské množství xenobiotických chemikálií. Příklady toxických látek metabolizovaných tímto systémem zahrnují nikotin, acetaminofen, benzen a polyaromatické uhlovodíky. Biotransformace fáze II je často katalyzována enzymy transferáz, které provádějí konjugační reakce. Mezi tato reakční schémata patří glukuronidace, sulfatace, methylace, acetylace, konjugace s glutathionem a konjugace s AMK. Produkty konjugační fáze II jsou typicky hydrofilnější než mateřské sloučeniny, a proto se obvykle snadněji vylučují. Mezi tyto

specifické rodiny enzymů metabolizující xenobiotika fáze II patří např. sulfotransferázy, acetyltransferázy a glukuronosyltransferázy. Zvláště důležité je, že glukuronosyltransferázy provádějí glukuronidační reakce hlavně s elektronově bohatými nukleofilními heteroatomy, jako jsou O, N nebo S, přítomnými v alifatických alkoholech a fenolech. Tento mikrozomální systém je hlavním hráčem v metabolismu fáze II, a je známý svou vysokou metabolickou kapacitou, ale relativně nízkou afinitou ke xenobiotickým substrátům. Biotransformace fáze III je nově vytvořeným deskriptorem, který označuje aktivní membránové transportéry. Ty fungují převážně pro dopravu léků a jiných xenobiotik přes buněčné membrány. PGP, jehož strukturu můžeme vidět na obr. 9, byl počátkem toho, co se v dnešní době označuje jako rodina transportérů léků. Tato oblast výzkumu si rychle získala pozornost, protože bylo zjištěno, že PGP a následně i další membránové transportéry fungují v rezistenci rakovinných buněk na chemoterapeutika, což je fenotyp označovaný jako fenotyp rezistence na více léků. Důsledky tohoto fenotypu mohou být závažné, protože se může postupem času u buněk vyvinout rezistence nejen vůči selektivnímu činidlu, ale také zkřížená rezistence vůči širokému spektru strukturně a funkčně odlišných antibiotik a alkaloidů. Další toxikologické výzkumy určitě povedou k zajímavým a důležitým závěrům s ohledem na další charakterizaci biotransformační funkce fáze III a definování role v xenobiotické toxicitě. Zejména výzkumy týkající se transkripční regulační kontroly těchto důležitých systémů v cílových orgánech, jako jsou játra, ledviny a centrální nervový systém, jsou teprve v počátečních stádiích a budou pravděpodobně představovat zaměření intenzivního výzkumu do budoucna. [51, 52]



**Obrázek 9** - Strukturní organizace P-glykoproteinu [53]

Obecně se uznává, že primární biotransformační reakce metabolismu fáze I a fáze II chemicky modifikují různé endogenní a exogenní substráty na ve vodě více rozpustné meziproducty nebo producty, které pak mohou být snadněji odstraněny. Tyto dráhy mění specifické substráty přidáním kyslíku nebo odstraněním elektronu, což vede k meziproductům a productům, které jsou v podstatě více oxidovány než mateřská sloučenina. Například přidání hydroxylové skupiny cytochromem P450 je běžným počátečním krokem v metabolismu různých sloučenin, což vede k hydroxylovým meziproductům. Tyto meziproducty jsou následně substráty pro následnou oxidaci různými oxidoreduktázami, jako je alkoholdehydrogenáza a aldehyddehydrogenáza (ALDH). Nadrodina ALDH je velmi velká a zahrnuje spoustu izoforem objevených teprve nedávno. Přítomnost izoforem ALDH v různých tkáních a subcelulárních frakcích naznačuje, že hrají velmi důležitou roli v metabolismu endogenních a exogenních aldehydových substrátů. Endogenní aldehydy se tvoří během metabolismu AMK, sacharidů, lipidů, biogenních amidů, vitamínů a steroidů. Biotransformace velkého počtu léčiv generuje aldehydy. Aldehydy jsou vysoce reaktivní elektrofilní sloučeniny, které interagují s thiolovými skupinami a aminoskupinami. Účinky zprostředkované aldehydem se liší od fyziologicky logických a terapeutických po cytotoxické, genotoxické a mutagenní nebo karcinogenní. V tomto pohledu ALDH účinně oxidují a ve většině případů také detoxikují významné množství chemicky rozmanitých aldehydů. Význam ALDH v detoxikačních cestách je zřejmý z polymorfismů lidských ALDH, které jsou ve většině případů spojeny se změněným metabolismem léčiva. [54, 55]

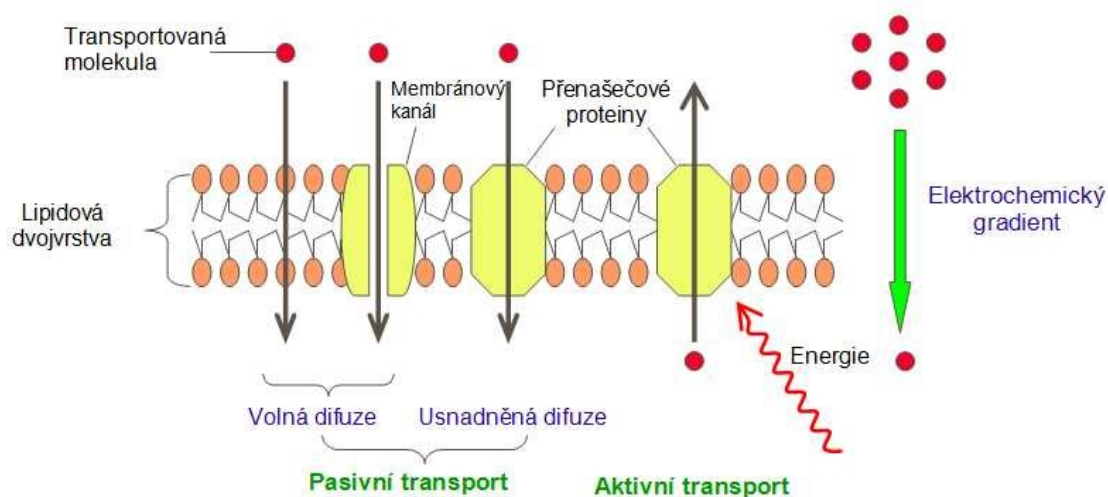
Mozek, zejména lidský, je jedním z nejsložitějších orgánů, funkčně i anatomicky. Vykazuje velké množství rozmanitosti, a to jak s ohledem na jeho anatomické oblasti, tak i na jeho buněčné prvky. Mozek je vysoce citlivý na poškození toxickými sloučeninami, kvůli omezené regenerační schopnosti neuronů, hlavního buněčného typu podílejícího se na neurotransmisí a dalších specializovaných funkcích mozku. Charakteristické rysy kapilárních endoteliálních buněk obklopujících mozkové cévy zajišťují ochranu mozku tím, že brání vstupu cirkulujících molekul. Avšak xenobiotika, která mají lihový charakter, mohou difundovat endotelovými buňkami mozkových kapilár a vstupovat do neuronálních buněk. Metabolismus xenobiotik v mozku může vést k místní farmakologické modulaci v místě působení a může vést k proměnlivé odpovědi na léčiva. Je známo, že rychlost metabolismu léčiv v populaci se liší od jedince k jedinci, proto by mohl metabolismus vyskytující se v místě působení

vést k obrovským rozdílům v lékové odpovědi, jak je často pozorováno u psychiatrických pacientů. Pokud je tedy léčivo samo o sobě aktivní složkou, mohl by rychlejší metabolismus léčiva v mozku vést k rychlejší ztrátě farmakologického účinku. Vzhledem k tomu, že vedlejší účinky léčiv obvykle souvisí s rychlostí metabolismu, lze rozsah vedlejších účinků pozorovaných u pacientů potenciálně připsat k rozdílům v jejich schopnosti metabolizovat léčiva v místě působení. Potenciální role mozkových CYP450 ve farmakologické modulaci léčiv působících na centrální nervový systém (CNS) a bioaktivaci xenobiotik v CNS jsou zřejmé. Znalosti mozkových CYP450, zejména lidských mozkových enzymů, jejich regulace a lokalizace, jsou však stále poněkud skromné. Heterogenita a komplexita CNS představují výzvu, protože více forem CYP450 je distribuováno a regulováno odlišně, v odlišných oblastech mozku. Porozumění metabolismu léků v mozku je proto zásadní pro vývoj jak nových léků, tak lepších terapeutických strategií pro již existující léky. K hodnocení lékových interakcí, vývoji nových léků a lepšímu pochopení metabolických cest xenobiotik tak i nadále zůstává nejpodstatnější výzkum CYP450. [56, 57]

### **3.2 Prostup organismem**

Do organismu se léčivo může dostat několika způsoby podání v závislosti na rozsahu a rychlosti absorpce. V ojedinělých případech může způsob podání vyvolat odlišnou farmakodynamickou odezvu a změnit charakter účinku kvantitativně, ale i kvalitativně. Jednotlivé aplikační cesty dělíme na systémové a lokální. Mezi základní systémové způsoby podání se řadí perorální, perrektální, orální, injekční aplikace do nebo mimo vaskulární systém, inhalační podání, transdermální, intranazální, intravaginální a intrauterinní. Při lokálním podání např. na kůži nebo mukózní membrány, je absorpce nežádoucí a neočekává se systémový účinek. Prostup biologickými membránami je ovlivněn jejich hydrofobními vlastnostmi, které zapříčiňují, že většina ve vodě rozpustných látek membránami neproniká. Ostatní látky mají přes biologické membrány dva způsoby prostupu zobrazené na obr. 10. První je pasivní difuze, která probíhá ve směru koncentračního gradientu bez spotřeby energie. Hnací silou je koncentrační rozdíl volné neionizované formy léčiva na obou stranách membrány. Léčivo se do buňky může dostat jedním ze dvou způsobů, buď prostou (volnou) difuzí nebo facilitovanou (usnadněnou) difuzí. Difuzí pronikají přes membránu léčiva lipofilní povahy nebo léčiva s malou molekulovou hmotností. Druhým způsobem je transport aktivní a jedná se o transport zprostředkovaný nosičem. Léčivo

je přes biologickou membránu transportováno proti směru koncentračního gradientu za současné spotřeby energie. Podmínkou pro zajištění aktivního transportu jsou integrální membránové proteiny. Mezi tyto proteiny patří např. peptidové transportéry, transportéry organických aniontů a transportéry organických kationtů. Energie potřebná pro zajištění aktivního transportu se získává zejména štěpením adenosintrifosfátu na adenosindifosfát a fosfát. Další způsoby získání energie pro aktivní transport jsou energeticky výhodné oxidačně-redukční reakce, přímá konverze světelné energie, kdy světelné kvantum je absorbováno integrální bílkovinou, a nakonec umožnění pasivního transportu jedné částice, přičemž se využije část získané energie pro transport aktivní. [58, 59]



Obrázek 10 - Transport přes biologickou membránu [60]

### 3.3 Adaptace a eliminace

Žijící mikroorganismy se mohou přizpůsobit přítomnosti xenobiotik hned několika způsoby. První možnost je působení náhodné mutace, která může zvýšit odolnost vůči jinak toxickému xenobiotiku. Druhá možnost je, že mutace mohou také mimo jiné zvýšit mikrobiální schopnost degradovat xenobiotika. A konečně třetí možnost zahrnuje schopnost organismu získávat geny kódující katabolické enzymy od ostatních členů v prostředí. Byla studována řada mechanismů, které vysvětlují, jak probíhá získání cizích genů. Tento děj obvykle zahrnuje plazmidy, transpozony, integrony nebo fágy jako prostředek pro cizí genetický materiál. Jedním z prvních pozorování adaptace na antropogenní sloučeniny byl objev šíření genů rezistence na antibiotika, nyní však existují nepřímé důkazy o adaptaci mnoha sloučenin. Právě



léčiva, jako antibiotika, jsou jedním z hlavních důvodů vyšetřování metabolismu xenobiotik. Při podávání terapeutických léků se často dává přednost orálnímu podání před jinými možnostmi, zejména kvůli pohodlí a minimální invazivnosti. Sloučeniny podané orálně čelí řadě překážek, když postupují do místa těla, pro které jsou určeny, a kde je jejich požadovaný účinek. Některé z faktorů, které přispívají k určení optimální cesty podání, zahrnují chemickou stabilitu, rozpustnost, absorpci, toxicitu a potenciál metabolismu před dosažením požadované lokace v těle. I když se k charakterizaci rozmanitosti a funkci střevní mikroflóry začala pozornost věnovat teprve nedávno, jejich zapojení do metabolismu léčiv je známo již po celá desetiletí. Je třeba poznamenat, že studie, kde se používají antimikrobiální látky, často nezohledňuje přímý dopad těchto látek na hostitele, jako je tomu v případě inhibice PGP zprostředkovaného odtokem digoxinu a jeho metabolitů. U léčiv, která jsou schopná dosáhnout distálního tenkého střeva nebo tlustého střeva, má bohatá biochemická rozmanitost střevního mikrobiomu potenciál přímo ovlivnit trajektorii sloučeniny. K nejčastějším reakcím probíhajícím v játrech při metabolismu léčiv patří oxidační a konjugační reakce. Ve střevech jsou to pak převážně reakce redukční a hydrolyzní. [61]

Metabolismus xenobiotik v těle na polární, hydrofilní metabolity je důležitým předpokladem pro detoxikaci a eliminaci xenobiotik z těla. Mezi eliminační orgány sehrávající hlavní roli při exkreci xenobiotik se řadí ledviny, játra a střevo. Vylučování na úrovni ledvin se dělí na tři hlavní fáze. První renální clearance určená glomerulární filtrací, druhá v proximálním tubulu aktivní sekrecí prostřednictvím transportního systému, a nakonec třetí pasivní resorpcí v tubulech. Játra využívají pro exkreci léčiv aktivní transport nebo prostou difuzi na základě koncentračního gradientu. Eliminace játry je ovlivněna řadou faktorů, mezi které patří např. průtok krve játry nebo množství a funkce hepatocytů. Na jaterní exkreci navazuje exkrece střevní pomocí žlučových kyselin. [62]

Přirozená společenství mikroorganismů mají úžasnou fyziologickou všestrannost a katabolický potenciál pro rozklad enormního počtu organických molekul. Téměř každý přírodní produkt, bez ohledu na jeho molekulovou hmotnost nebo strukturní složitost, je snadno degradován jedním nebo jiným mikrobiálním druhem v určitém prostředí. Tato všemocnost mikroorganismů se vztahuje i na většinu syntetických sloučenin, které jsou přiváděny do přirozených metabolických cyklů. Některé substituenty a zejména jejich akumulace, jako jsou halogenové, sulfo-, azo- nebo nitroskupiny, propůjčují sloučenině xenobiotický charakter. Navíc charakter těchto

substituentů přitahující elektrony generuje nedostatek elektronů, a tím činí sloučeniny méně náchylné k oxidačnímu katabolismu. V důsledku toho má mnoho z těchto chemikálií tendenci přetrvávat i za anaerobních podmínek. Biologického rozkladu xenobiotických látek lze dosáhnout, když se katabolické aktivity přítomné ve smíšených mikrobiálních komunitách vzájemně doplňují. Syntrofické interakce tedy mohou vést k úplné mineralizaci i komplexních xenobiotických sloučenin. Mineralizace xenobiotik jediným organismem lze dosáhnout využitím přirozeného nebo indukovaného přenosu genů ke konstrukci hybridních degradačních cest. Protože katabolické enzymy jsou víceméně specifické, mohou působit na více než na jejich přirozený substrát. To vysvětluje, proč většina xenobiotik podléhá náhodnému metabolismu (kometabolismu). Za normálních okolností počáteční katabolický enzym nebo sekvence enzymů přemění chemickou látku na organický produkt, který se dále metabolizuje. Pro kometabolicky aktivní organismus je tedy proces neproduktivní, protože není spojen s úsporou energie. Protože počáteční oxidace mono- nebo dioxygenázami vyžaduje redukční ekvivalenty nebo ztrátu aktivního proteinu inaktivací sebevraždou, může být kometabolismus dokonce kontraproduktivní. Kometabolická transformace xenobiotické sloučeniny často generuje reaktivní metabolity, jako jsou epoxidy, dihydrodioly, aromatické dioly, aromatické aminy nebo produkty, které jsou snadněji oxidovány než původní sloučenina. [63, 64]

### **3.4 Počítačový systém pro predikci metabolismu**

Predikce metabolického osudu xenobiotik je fascinující a komplexní problém a stávající doména znalostí je obrovská. Při hodnocení je důležité zohlednit mnoho faktorů. Je nutné posoudit, zda se látka může dostat do enzymatických systémů odpovědných za její biotransformaci. Například v případě orálně podávaných léčiv je třeba vzít v úvahu intestinální absorpci, transport do jater, rozpustnost ve vodě a renální clearance. Existuje mnoho výpočetních přístupů k hodnocení těchto farmakokinetických parametrů. Mimo jiné existují i výpočetní přístupy, které se zaměří na ty systémy, které hodnotí biotransformační potenciál xenobiotických látek. Zásadní význam zde pochopitelně má porozumění interakce enzym-substrát. Stále větší význam v našem chápání xenobiotické transformace však mají takové faktory, jako je indukce a inhibice enzymů, mechanismy lékových interakcí a aktivita PGP. Rychlá biotransformace hlavního substrátu vede k vysoké vnitřní clearance této látky,

což má za následek, že biologická dostupnost bude nízká a účinné klinické dávky budou muset být vyšší. Závažnější však je, že biotransformace látek může vést k tvorbě reaktivních meziproduktů, které mohou potenciálně vést k expresi toxických účinků, obvykle reakcí s buněčnými nebo plazmatickými makromolekulami. Včasný screening potenciálu biotransformace může pomoci při vývoji metabolicky stabilních, netoxických hlavních substrátů. [65]

Bylo provedeno mnoho recenzí o použití analýzy kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou (QSAR) v xenobiotickém metabolismu. Velká část výzkumu v této oblasti byla zaměřena na studium potenciálních substrátů, inhibitorů a induktorů různých izoenzymů CYP450, které korelují takové faktory jako hydrofobní a sterické parametry ve třídách substrátů. Vlastní metabolická stabilita byla modelována pomocí analýzy hlavních komponent na velkých podnikových databázích. Byly vytvořeny modely homologie savčích CYP zahrnující znalosti struktur CYP prokaryot. Vztah nálezů experimentů s dokováním substrátů v těchto modelech pomohl rozšířit znalosti klasického QSAR ve výzkumu xenobiotického metabolismu. Techniky, jako je komparativní analýza molekulárního pole a modelování farmakoforů substrátu, umožnily interpretaci a porozumění aktivním místům enzymu, i když není k dispozici krystalová struktura nebo model homologie. Důležité je, že tyto výpočetní techniky jsou pouze doplňkovými metodami k tradičnímu testování. Počítačové systémy pro predikci metabolismu xenobiotik obecně spadají do dvou kategorií. Zaprvé systémy modelování enzymů založené na teoretických a mechanistických úvahách. Zadruhé empiricky založené expertní systémy, které se spoléhají na expertní pravidla jako základ svých předpovědí. Ačkoli nejde o přísně expertní systémy, je k dispozici i třetí kategorie a to klasická databáze reakcí. [65, 66]

## **Závěr**

Pro mnoho vědců z řad biochemiků a toxikologů je nejzajímavější vyhlídkou ve výzkumu CYP450 pochopení vztahu mezi strukturou a funkcí tak univerzálního katalyzátoru, jako je CYP450. Vezmeme-li v úvahu současnou intenzitu provádění výzkumů v oblasti CYP450, můžeme bezpečně předpokládat, že pokroky v této oblasti povedou k vyřešení doposud neobjasněných zákoutí problematiky CYP450 a toxicitě vyvolané xenobiotickými látkami.

Již je prokázáno, že v této toxicitě hrají významnou roli enzymy metabolizující xenobiotika, mezi které se řadí právě CYP450. CYP450 představují nezbytnou součást obranných mechanismů organismu, a bez jejich přítomnosti by organismus nebyl schopen odolat toxicitě xenobiotik. Důležitým podnětem, kterým se jistě budou zabývat budoucí výzkumy tedy i nadále zůstává metabolismu léčiv a jejich interakce.

## Použitá literatura

- [1] MITTAL, Balraj, et al. Chapter Four - Cytochrome P450 in Cancer Susceptibility and Treatment. In: Gregory S. MAKOWSKI, ed. *Advances in Clinical Chemistry* [online]. B.m.: Elsevier, 2015 [vid. 2021-04-06], s. 77–139. Dostupné z: doi:10.1016/bs.acc.2015.06.003.
- [2] DENISOV, Ilia G., et al. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chemical Reviews* [online]. 2005, **105**(6), 2253–2278. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr0307143.
- [3] STIBOROVÁ, Marie, et al. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. listy*, 1999, 93.4: 229-237. Dostupné z: [http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/1999\\_04\\_229-237.pdf](http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_04_229-237.pdf).
- [4] GROGAN, Gideon. Cytochromes P450: exploiting diversity and enabling application as biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2011, **15**(2), Biocatalysis and Biotransformation/Bioinorganic Chemistry, 241–248. ISSN 1367-5931. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2010.11.014.
- [5] *Cytochrom P450* [online]. 2021 [vid. 2021-04-06]. Dostupné z: [https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Cytochrom\\_P450&oldid=20718822](https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Cytochrom_P450&oldid=20718822).
- [6] MESTRES, Jordi. Structure conservation in cytochromes P450. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* [online]. 2005, **58**(3), 596–609. ISSN 1097-0134. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/prot.20354>.
- [7] OMURA, Tsuneo. Forty Years of Cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1999, **266**(3), 690–698. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.1999.1887.
- [8] ANZENBACHER, Pavel a ANZENBACHEROVÁ, Eva. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* [online]. 2001, **58**(5), 737–747. ISSN 1420-9071. Dostupné z: doi:10.1007/PL00000897.
- [9] NELSON, David R. The Cytochrome P450 Homepage. *Human Genomics* [online]. 2009, **4**(1), 59. ISSN 1479-7364. Dostupné z: doi:10.1186/1479-7364-4-1-59.
- [10] POULOS, Thomas L. Cytochrome P450. *Current Opinion in Structural Biology* [online]. 1995, **5**(6), 767–774. ISSN 0959-440X. Dostupné z: doi:10.1016/0959-440X(95)80009-3.
- [11] MAK, Piotr J. a DENISOV, Ilia G. Spectroscopic studies of the cytochrome P450 reaction mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* [online]. 2018, **1866**(1), Cytochrome P450 biodiversity and biotechnology, 178–204. ISSN 1570-9639. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2017.06.021.
- [12] Reaction scheme of cytochrome P450. The numbers (1–7) represent the... *ResearchGate* [online]. [vid. 2021-04-06]. Dostupné

z: [https://www.researchgate.net/figure/Reaction-scheme-of-cytochrome-P450-The-numbers-1-7-represent-the-actual-state-of-the\\_fig2\\_326542094](https://www.researchgate.net/figure/Reaction-scheme-of-cytochrome-P450-The-numbers-1-7-represent-the-actual-state-of-the_fig2_326542094).

- [13] COON, Minor J., et al. Cytochrome P450: progress and predictions. *The FASEB Journal* [online]. 1992, **6**(2), 669–673. ISSN 1530-6860. Dostupné z: doi:10.1096/fasebj.6.2.1537454.
- [14] GUENGERICH, Peter F. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chemical research in toxicology*, 2008, 21.1: 70-83.
- [15] GUENGERICH, Peter F. A history of the roles of cytochrome P450 enzymes in the toxicity of drugs. *Toxicological Research* [online]. 2021, **37**(1), 1–23. ISSN 2234-2753. Dostupné z: doi:10.1007/s43188-020-00056-z.
- [16] NELSON, David R. Cytochrome P450 and the Individuality of Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 1999, **369**(1), 1–10. ISSN 0003-9861. Dostupné z: doi:10.1006/abbi.1999.1352.
- [17] DURICOVÁ, Jana a GRUNDMANN, Milan. Clinical significance of cytochrome P450 genetic polymorphism - Part I. Enzymatic system of cytochrome P450 and cytochrome P450 1A2. *Ceská a Slovenská farmacie : casopis České farmaceutické společnosti a Slovenské farmaceutické společnosti*. 2011, **60**, 110–5.
- [18] FUJII-KURIYAMA, Yoshiaki, et al. Regulation of CYP1A1 expression. *The FASEB Journal* [online]. 1992, **6**(2), 706–710. ISSN 1530-6860. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1096/fasebj.6.2.1537460>.
- [19] ANDROUTSOPOULOS, Vasilis P., et al. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer* [online]. 2009, **9**(1), 187. ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2407-9-187.
- [20] SONNIER, Michelle a CRESTEIL, Thierry. Delayed ontogenesis of CYP1A2 in the human liver. *European Journal of Biochemistry* [online]. 1998, **251**(3), 893–898. ISSN 1432-1033. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2510893.x>.
- [21] NGUYEN, Hoa Q., et al. The Use of In Vitro Data and Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling to Predict Drug Metabolite Exposure: Desipramine Exposure in Cytochrome P4502D6 Extensive and Poor Metabolizers Following Administration of Imipramine. *Drug Metabolism and Disposition* [online]. 2016, **44**(10), 1569–1578. ISSN 0090-9556, 1521-009X. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.116.071639.
- [22] SIVARAMAN, Lakshmi, et al. CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer research*, 1994, 54.14: 3692-3695. Dostupné z: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/54/14/3692.short>.
- [23] KAWAJIRI, Kaname. Cyp1a1. *IARC scientific publications*, 1999, 159-172. Dostupné z: <http://www.columbia.edu/itc/hs/pubhealth/santella/readings/kawajiri.pdf>

- [24] KAWAJIRI, Kaname, et al. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [online]. 1993, **14**(1), 77–87. ISSN 1040-8428. Dostupné z: doi:10.1016/1040-8428(93)90007-Q
- [25] BELL-PARIKH, Chastine L. a GUENGERICH, Peter F. Kinetics of Cytochrome P450 2E1-Catalyzed Oxidation of Ethanol to Acetic Acid via Acetaldehyde\*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1999, **274**(34), 23833–23840. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.34.23833
- [26] ROBERTS, Ben J., et al. Ethanol Induces CYP2E1 by Protein Stabilization: ROLE OF UBIQUITIN CONJUGATION IN THE RAPID DEGRADATION OF CYP2E1(\*). *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1995, **270**(50), 29632–29635. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.270.50.29632
- [27] LU, Yongke a CEDERBAUM, Arthur I. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2008, **44**(5), 723–738. ISSN 0891-5849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.004
- [28] LEUNG, Tung-Ming a NIETO, Natalia. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* [online]. 2013, **58**(2), 395–398. ISSN 0168-8278. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhep.2012.08.018
- [29] GONZALEZ, Frank J. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. 2005, **569**(1), Stress Responses, 101–110. ISSN 0027-5107. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.04.021
- [30] KONO, Hiroshi, et al. CYP2E1 is not involved in early alcohol-induced liver injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* [online]. 1999, **277**(6), G1259–G1267. ISSN 0193-1857. Dostupné z: doi:10.1152/ajpgi.1999.277.6.G1259
- [31] CEDERBAUM, Arthur I., et al. CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells1, 2 1Guest Editor: Arthur Cederbaum 2This article is part of a series on “Alcohol, Oxidative Stress and Cell Injury.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2001, **31**(12), 1539–1543. ISSN 0891-5849. Dostupné z: doi:10.1016/S0891-5849(01)00743-2
- [32] GARCÍA-SUÁSTEGUI, W. A., et al. The Role of CYP2E1 in the Drug Metabolism or Bioactivation in the Brain. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2017, **2017**, 4680732. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2017/4680732
- [33] LEE, Susanna S. T., et al. Role of CYP2E1 in the Hepatotoxicity of Acetaminophen (\*). *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1996, **271**(20), 12063–12067. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.271.20.12063
- [34] SCOTT, Emily E. a HALPERT, James R. Structures of cytochrome P450 3A4. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2005, **30**(1), 5–7. ISSN 0968-0004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2004.11.004

- [35] LI, Albert P., et al. Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology* [online]. 1995, **104**(1), 1–8. ISSN 0300-483X. Dostupné z: doi:10.1016/0300-483X(95)03155-9.
- [36] HUNT, Christine M., et al. Hepatic cytochrome P-4503A (CYP3A) activity in the elderly. *Mechanisms of Ageing and Development* [online]. 1992, **64**(1), 189–199. ISSN 0047-6374. Dostupné z: doi:10.1016/0047-6374(92)90106-N.
- [37] FELIX, Carolyn A., et al. Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1998, **95**(22), 13176–13181. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.95.22.13176.
- [38] WATKINS, Paul B. The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 1997, **27**(2), First-pass Metabolism and Its Impact on Oral Drug Delivery, 161–170. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(97)00041-0.
- [39] KOUSALOVÁ, Lucie, et al. Lékové interakce na úrovni cytochrom\uu P450–Část I. Interakce na úrovni CYP3A4. *Klin. Farmakol. Farm.* 2003, **17**, 151–157.
- [40] PAL, Dhananjay a MITRA, Ashim K. MDR- and CYP3A4-mediated drug–herbal interactions. *Life Sciences* [online]. 2006, **78**(18), NATURECEUTICALS (NATURAL PRODUCTS), NUTRACEUTICALS, HERBAL BOTANICALS, AND PSYCHOACTIVES: DRUG DISCOVERY AND DRUG-DRUG INTERACTIONS, 2131–2145. ISSN 0024-3205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2005.12.010.
- [41] HOFMAN, Jakub, et al. Roles of CYP3A4, CYP3A5 and CYP2C8 drug-metabolizing enzymes in cellular cytostatic resistance. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2021, **340**, 109448. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2021.109448.
- [42] BOOTS, Agnes W., et al . Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2008, **585**(2), 100 Years of Pharmacology in The Netherlands, 325–337. ISSN 0014-2999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2008.03.008.
- [43] SIMPSON, Annemarie E. C. M. The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *General Pharmacology: The Vascular System* [online]. 1997, **28**(3), 351–359. ISSN 0306-3623. Dostupné z: doi:10.1016/S0306-3623(96)00246-7.
- [44] MAKOWSKA, Janet M., et al. Species differences in ciprofibrate induction of hepatic cytochrome p450 4A1 and peroxisome proliferation. *Journal of Biochemical Toxicology* [online]. 1992, **7**(3), 183–191. ISSN 1522-7146. Dostupné z: doi:10.1002/jbt.2570070308.
- [45] JARRAR, Yazun Bashir a LEE, Su-Jun. Molecular Functionality of Cytochrome P450 4 (CYP4) Genetic Polymorphisms and Their Clinical Implications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(17), 4274. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20174274.



- [46] FAULKNER, K. M., et al. Electrocatalytically driven omega-hydroxylation of fatty acids using cytochrome P450 4A1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1995, **92**(17), 7705–7709. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.92.17.7705.
- [47] BAMBAL, Ramesh B. a HANZLIK, Robert P. Effects of Steric Bulk and Conformational Rigidity on Fatty Acid Omega Hydroxylation by a Cytochrome P450 4A1 Fusion Protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 1996, **334**(1), 59–66. ISSN 0003-9861. Dostupné z: doi:10.1006/abbi.1996.0429.
- [48] CROOM, Edward. Chapter Three - Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. In: Ernest HODGSON, ed. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [online]. B.m.: Academic Press, 2012 [vid. 2021-06-08], Toxicology and Human Environments, s. 31–88. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-415813-9.00003-9.
- [49] SINGLETON, Ian. Microbial metabolism of xenobiotics: Fundamental and applied research. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 1994, **59**(1), 9–23. ISSN 1097-4660. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.280590104.
- [50] YANG, Chung S., et al. Dietary effects on cytochromes P450, xenobiotic metabolism, and toxicity. *The FASEB journal*, 1992, 6.2: 737-744. Dostupné z: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fasebj.6.2.1537464>.
- [51] OMIECINSKI, Curtis J., et al. Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities. *Toxicological Sciences* [online]. 2011, **120**(Supplement 1), S49–S75. ISSN 1096-6080, 1096-0929. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfq338.
- [52] TIMBRELL, John A. a MARRS, Timothy C. Biotransformation of Xenobiotics. In: *General, Applied and Systems Toxicology* [online]. B.m.: American Cancer Society, 2011 [vid. 2021-06-15]. ISBN 978-0-470-74430-7. Dostupné z: doi:10.1002/9780470744307.gat004.
- [53] HIGGINS, Christopher F., et al. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 1997, **8**(3), 135–142. ISSN 1044-579X. Dostupné z: doi:10.1006/scbi.1997.0067.
- [54] VASILIOU, Vasilis, et al. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2000, **129**(1), 1–19. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/S0009-2797(00)00211-8.
- [55] BENEDETTI, Margherita Strolin. Biotransformation of xenobiotics by amine oxidases. *Fundamental & Clinical Pharmacology* [online]. 2001, **15**(2), 75–84. ISSN 1472-8206. Dostupné z: doi:10.1046/j.1472-8206.2001.00011.x.
- [56] RAVINDRANATH, Vijayalakshmi. Metabolism of xenobiotics in the central nervous system: Implications and challenges. *Biochemical Pharmacology* [online]. 1998, **56**(5), 547–551. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-2952(97)00671-0.

- [57] ZUBER, R., et al. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 2002, **6**(2), 189–198. ISSN 1582-4934. Dostupné z: doi:10.1111/j.1582-4934.2002.tb00186.x.
- [58] DOSTÁLEK, Miroslav. *Farmakokinetika*. B.m.: Grada Publishing a.s., 2006. ISBN 978-80-247-1464-6.
- [59] KRAJÍČEK, Milan. Lékové formy s třífázovým uvolňováním účinných látek. *k2pharm technologi*, 10–11.
- [60] *Biochemie - vzdělávací portál, Buňka* [online]. [vid. 2021-06-12]. Dostupné z: <http://www.studiumbiochemie.cz/bunka4.html>.
- [61] HAISER, Henry J. a TURNBAUGH, Peter J. Developing a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Pharmacological Research* [online]. 2013, **69**(1), SI:Human microbiome and health, 21–31. ISSN 1043-6618. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2012.07.009.
- [62] SKÁLA, Bohumil a KOTLÁŘOVÁ, Marie. Cílená detoxikace jako podpůrná součást farmakoterapie.
- [63] KNACKMUSS, Hans-Joachim. Basic knowledge and perspectives of bioelimination of xenobiotic compounds. *Journal of Biotechnology* [online]. 1996, **51**(3), Environmental Biotechnology, 287–295. ISSN 0168-1656. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-1656(96)01608-2.
- [64] REIF, Raymond, et al. In vivo imaging of systemic transport and elimination of xenobiotics and endogenous molecules in mice. *Archives of Toxicology* [online]. 2017, **91**(3), 1335–1352. ISSN 0340-5761, 1432-0738. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-016-1906-5.
- [65] LANGOWSKI, Jan a LONG, Anthony. Computer systems for the prediction of xenobiotic metabolism. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2002, **54**(3), Computational Methods for the Prediction of ADME and Toxicity, 407–415. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(02)00011-X.
- [66] BEZHENTSEV, Vladislav M., et al. Computer-aided prediction of xenobiotic metabolism in the human body. *Russian Chemical Reviews* [online]. 2016, **85**(8), 854–879. ISSN 0036-021X, 1468-4837. Dostupné z: doi:10.1070/RCR4614.