

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A**  
**BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**ROLE CYTOCHROMU P450**  
**V METABOLISMU LÉČIV V NÁDOROVÉ**  
**TKÁNI**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**AUTOR PRÁCE:** Martina Růžičková

**VEDOUCÍ PRÁCE:** Mgr. Michal Šiller, Ph.D.

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**FACULTY OF CHEMICAL-TECHNOLOGY**  
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND  
BIOCHEMICAL SCIENCES

**ROLE OF CYTOCHROMES P450 IN  
DRUG METABOLISM IN TUMOR  
TISSUES**

BACHELOR THESIS

**AUTHOR:** Martina Růžičková

**SUPERVISOR:** Mgr. Michal Šiller, Ph.D.

## Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma **Role cytochromu P450 v metabolismu léčiv v nádorové tkáni** vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou v práci citovány a uvedeny v seznamu použité literatury.

V Pardubicích dne .....

.....

(podpis)

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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice

V Pardubicích dne .....

.....

(podpis)

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu **Mgr. Michalu Šillerovi, Ph.D.**, vedoucímu bakalářské práce, za cenné rady, podněty a také čas, který mi věnoval v průběhu práce.

# **ANOTACE**

Práce se zabývá obecnými informacemi o cytochromech P450, jejich struktuře, metabolismu a biotransformací. Dále pak samotnými interakcemi léčiv a indukce na úrovni Cytochromů P450 a konjugačních enzymů. V poslední řadě obsahuje experimentální poznatky týkající se metabolismu léčiv v nádorové tkáni za současného působení CYP.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Cytochrom P450, Xenobiotika, Konjugační enzymy, Metabolismus léčiv, Interakce, Indukce, Metabolismus v nádorové tkáni

## **ANNOTATION**

The work deals with general information on the cytochromes P450, their structure, metabolism and biotransformation. Furthermore, drug interactions and inductions at the level of Cytochrome P450 and conjugation enzymes alone. Finally, it contains experimental findings on the metabolism of drugs in tumor tissue with CYP.

### **KEY WORDS**

Cytochrome P450, Xenobiotics, Conjugation enzymes, Drug metabolism, Interaction, Induction, Metabolism in tumor tissue

## Obsah

|   |    |
|---|----|
| 1. Úvod .....   | 9  |
| 2. Cytochrom P450 .....   | 10 |
| 2.1 Struktura .....   | 19 |
| 2.2 Názvosloví .....  | 21 |
| 3. Metabolismus .....   | 21 |
| 3.1 Významnost CYP v metabolismu léčiv v klinické medicíně..... | 22 |
| 4. Konjugační enzymy .....                                      | 23 |
| 4.1 UDP-glukoronosyltransferasy .....                           | 24 |
| 4.2 Sulfotransferasy .....                                      | 26 |
| 5. Lékové interakce .....                                       | 27 |
| 5.1 Interakce na úrovni CYP .....                               | 28 |
| 5.1.1 Interakce CYP3A4 .....                                    | 31 |
| 5.1.2 Interakce na úrovni konjugačních enzymů.....              | 32 |
| 5.2 Regulace CYP .....  | 32 |
| 5.3 Indukce CYP .....   | 33 |
| 6. Metabolismu léčiv v nádorové tkáni.....                      | 37 |
| 6.1 CYP a rakovina .....  | 37 |
| 6.2 Funkce CYP v nádorové tkáni .....                           | 38 |
| 6.2.1 CYP1A.....  | 38 |
| 6.2.2 CYP2E.....  | 39 |
| 6.3 Experimentální průkazy funkce CYP v nádorové tkáni .....    | 42 |
| 6.3.1 Rakovina tlustého střeva .....                            | 42 |
| 6.3.2 Rabdomyosarkomen u dětí.....                              | 43 |
| 6.3.3 Rakovina prsu.....  | 43 |
| 6.3.4 Karcinomy epiteliálních buněk .....                       | 44 |
| 6.3.5 Hepatocelulární karcinom .....                            | 44 |
| 7. Závěr .....  | 46 |
| 8. Seznam obrázků a tabulek .....                               | 47 |
| 9. Literatura .....   | 49 |

# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|       |                                  |
|-------|----------------------------------|
| AhR   | aryl hydrocarbon receptor        |
| CAR   | constitutive androstane receptor |
| CYP   | cytochrom P450                   |
| DMBS  | dimethylbenzanthracen            |
| DEDTC | diethyldithiokarbamát            |
| HCC   | hepatocelulární karcinom         |
| RMS   | rabdomyosarkom                   |
| SULT  | sulfát                           |
| PXR   | pregnance receptor               |
| UGT   | glukuronová kyselina             |



# 1. Úvod

Vývoj léčiv dosáhl v posledních desetiletích obrovského rozkvětu. Desítky až stovky nových látek, které by mohly v budoucnu dostat uplatnění v terapii řady onemocnění, produkuje mnoho laboratoří organických syntéz. Nádorová onemocnění zauímají přední příčky ve výskytu civilizačních chorob, které často končí smrtí. Proto je trendem vynalézat nové účinné látky protinádorových léčiv. Nádorové buňky se vymykají běžným regulačním mechanismům řídícím buněčný cyklus a udržujícím rovnováhu buněk v tkáních. Při porušení regulačních mechanismů cyklu buněk v nádorové tkáni dochází dělení buněk, které je nekontrolovatelné. Také dochází k progresivnímu růstu nádorů.

Protinádorovou aktivitu vykazují látky odvozené od rostlinných hormonů, cytokininů. Patří sem purinové ribosidy a N<sub>6</sub>-substitované deriváty adeninu (CDK inhibitory, inhibitory cyklin dependentních kinas). Zamezují proliferaci nádorové tkáně různým mechanismem. Inhibicí aktivity cyklin dependentních kinas hrajících důležitou roli v řízení buněčného cyklu buňky blokuje buněčný cyklus CDK inhibitory. Následně zamezují DNA replikaci a dělení buňky (Krystof a spol., 2002). Buněčnou apoptózu vazbou na specifické extracelulární adeninové receptory mají pravděpodobně schopnost navodit cytokinové ribosidy (Kohno a spol., 1996). Zároveň mohou působit i cytotoxicky po vystavení se intracelulární fosforylaci (Cottam a spol., 1993). Pro léčbu zánětlivých procesů by mohla najít v budoucnu uplatnění látka ribosidové struktury NGF1568, která byla nedávno syntetizována. U této látky byl zjištěn překvapivý účinek na neutrofile, kdy stimuluje růst a funkci neutrofilů, čímž moduluje zánětlivé procesy.

Důležitým pochodem určujícím osud léčiva v organismu je metabolismus léčiv. Léčiva ze skupiny cytokinových derivátů podléhají určitým farmakokinetickým procesům stejně jako látky cizorodé. V rámci metabolismu jsou v organismu látky přeměňovány pomocí biotransformačních enzymů na metabolity. Tyto enzymy můžeme najít zejména v játrech, střevech a dalších tkáních. Nejvíce vznikají polární metabolity. Na rozdíl od patentních látek jsou snadno vylučovány z těla močí nebo stolicí díky jejich rozpustnosti ve vodě.

Mohou však vykazovat i stejnou farmakologickou aktivitu s parentní látkou. Vzhledem k tomu, že některá léčiva vystupují jako inhibitory biotransformačních enzymů, nemusí být interakce léčiva s těmito enzymy vždy organismu prospěšná. K manifestaci nežádoucích toxických účinků léčiva v důsledku jeho zvýšené koncentrace v organismu může být způsobena při podání léčiva s úzkým terapeutickým rozmezím současně s inhibitorem enzymu metabolizujícího dané léčivo. Existují však i léčiva indukující syntézu daného enzymu, čímž urychluje vlastní eliminaci či eliminaci jiného podávaného léčiva metabolizujícího indukovaný enzym. Vládní agentura Spojených států amerických - Ústav pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration) doporučuje testovat interakce všech potenciálních léčiv s cytochromy P450 ještě před uvedením do klinické praxe, protože byly popsány závažné lékové interakce u běžně předepisovaných léčiv. Ústav farmakologie se dlouhodobě zabývá interakcemi potenciálních léčiv s lidskými biotransformačními enzymy a hodnotí rizika vzniku lékových interakcí. Jelikož cytokinové deriváty patří do skupiny potenciálních léčiv, je vhodné sledovat dráhu jejich metabolické přeměny v organismu a zhodnotit míru rizika vzniku lékových interakcí (Nekvindová a spol., 2007; Veinlichová a spol., 2009).

## 2. Cytochrom P450

Cytochromy P450, dále jen CYP, jsou klíčovými enzymy při tvorbě rakoviny a léčbě rakoviny. Zprostředkovávají metabolickou aktivaci mnoha prekarcinogenů a podílejí se na inaktivaci a aktivaci protirakovinových léčiv. Vzhledem k tomu, že CYP, které metabolizují xenobiotika, jsou polymorfní, byl velký důraz kladem na zkoumání vztahu mezi distribucí specifických variant CYP alel a rizikem pro různé typy rakovin. Jednotný názor neexistuje. Z velké části je to vysvětleno tím, CYP se podílejí se na aktivaci prekarcinogenů, nejsou funkčně polymorfní. To je v rozporu s CYP, které jsou aktivní v biotransformaci léků, kde jsou pozorovány velké vzájemné individuální rozdíly v kapacitě metabolizovat terapeutické léky jako důsledek polymorfních alel se změněnou funkcí. To také zahrnuje některé protinádorové léky, jako je tomoxifen a cyklofosfamid, metabolizované CYP2D6, CYP2C19 a CYP2B6. Některé formy CYP jsou také selektivně exprimovány v nádorech a to by mohlo

poskytnout mechanismus rezistence vůči lékům, ale také mohou být představeny budoucí terapie používající tyto enzymy jako lékové cíle (Rodriguez-Antona a Ingelman-Sundberg, 2006).

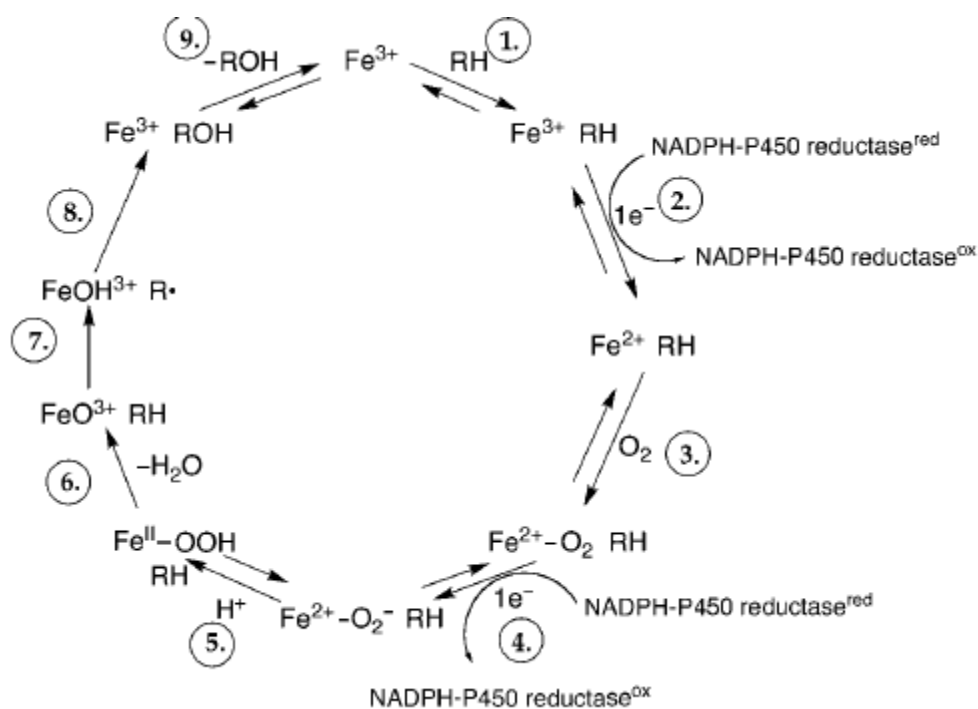
CYP je z evolučního hlediska považován jako velmi starý hemoprotein. Vznikl mnohem dříve než hemoglobin (Stiborova a spol., 1999). Tento hemoprotein je přítomný téměř ve všech živých organismech – savci, rostliny, bakterie, plísně. Byl objeven teprve nedávno a to před zhruba padesáti lety (Krejzlík a spol., 2000). Tento enzym se vyvíjel cestou divergentní evoluce, kdy se z jediného genu CYP archebakterií (z doby před více než 1,5 miliardy let do současnosti) vyvinulo velké množství odlišných genů, které kódují cytochromy prokaryotních i eukaryotních organismů. I přes velké rozdíly v substrátové specifitě a struktuře obsahují tyto geny konzervované sekvence v oblasti vazného místa pro hem.

U sloučenin, které jsou substráty těchto enzymů, dochází k biotransformaci na polárnější produkty. Ty pak mohou být vyloučeny z organismu, a díky tomu nedojde k akumulaci cizorodých látek. Kromě detoxikace může dojít k přeměně na biologicky aktivnější deriváty. Některé mohou být aktivnější z pozitivního hlediska (aktivní formy léčiv), jiné však toxické, mutagenní nebo karcinogenní.

Funkce CYP je velmi různorodá. Prehistorické mikroorganismy využívali CYP hlavně k hydroxylaci organických látek. Při vnesení hydroxylové skupiny do sloučeniny, došlo k aktivaci, a tyto látky mohly být použity jako zdroj energie. I dnes existují mikroorganismy, které mají právě tuto funkci CYP (Stiborová a spol., 1999). Prvním CYP, který se podařilo získat v dostatečném množství v čisté formě z kafrového mnooxygenasového systému bakterie *Pseudomonas putida*, byl P450cam (z anglického camphor – kafr, nebo také označován CYP101). Jeho krystalografická struktura byla představena v roce 1987 (Vodrážka, 2002). Právě tento CYP zavedením hydroxylové skupiny do skeletu kafru zahajuje jeho metabolismus. Schopností CYP katalyzovat metabolismus různých cizorodých látek se nechala inspirovat řada světových laboratoří a snaží se vytvořit pomocí molekulárně biologických technik vhodné kmeny mikroorganismů exprimující takové CYP použitelné pro degradaci obtížně odstranitelných kontaminantů životního prostředí a lidskou činností produkovaných odpadů.

Vzhledem k vývoji mnohobuněčných organismů začínaly CYP plnit v organismu i jiné funkce (Stiborova a spol., 1999). Dnes je známo, že fyziologickou funkcí CYP u lidí je schopnost metabolizovat xenobiotika a mnoho endogenních látek jako je cholesterol, steroidní hormony, vitaminy, žlučové kyseliny, prostaglandiny (Hasler a spol., 1999; Vodrážka, 2002). Další využití CYP je např. biosyntéza barviv květů, mastných kyselin, kyseliny skořicové, S vývojem CYP souvisí vznik složitějších systémů, kdy CYP spolupůsobí s jinými vývojově vyššími typy enzymů, buď s mikrosomální NADPH:CYP reduktázou, která je lokalizována v endoplazmatickém retikulu (Stiborová a spol., 1999) nebo s dalšími enzymy lokalizovanými v mitochondriích (Stiborová a spol., 1999; Stiborová a spol., 2004).

Katalytický cyklus CYP je poměrně složitý a zahrnuje několik kroků. Pro reakci je nutná přítomnost složek kooperujících se samotným enzymem. V případě CYP podílejících se na metabolismu léčiv se jedná právě o NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktázu, FAD, FMN, cytochrom b5 a fosfolipidy (Guengerich a Johnson, 1997).



Obrázek 1. Katalytický cyklus CYP (Anzenbacher a Zanger, 2012).

| <b>Enzym</b>              | <b>CYP1A2</b>   | <b>CYP2D6</b>  | <b>CYP2C9</b>  |
|---------------------------|---|--|--|
| <b>Tkáňová lokalizace</b> | Játra   | Játra, mozek, srdce  | Játra  |
| <b>Substrát</b>           | Amitriptylin<br>Kofein<br>Olanzapin<br>Ondansetron<br>Fenacetin<br>Paracetamol<br>Propranolol<br>Teofylin<br>Klomipramin<br>Klozapin<br>Estradiol<br>Fluvoxmin<br>Haloperidol<br>Imipramin<br>Naproxen<br>Varapamil<br>R-warfarin | Karvediol<br>S-metoprolol<br>Profenon<br>Timolol<br>Amitriptylin<br>Fenacetin<br>Prometazin<br>Propranolol<br>Sparteín<br>Klomipramin<br>Risperidon<br>Thioridazin<br>Bufuralol<br>Chlorproma-zin<br>Kodein<br>Dibrisochin<br>Fluoksetin<br>Fluvoxamin<br>Lidokain<br>Desipramin<br>Imipramin<br>Paroxetin<br>Haloperidol<br>Perfenazin<br>Metoklopra-mid<br>Nortriptylin<br>Ondasetron<br>Oxykodon<br>Tomaxifen<br>Tramadol | Diklofenak<br>Ibuprofen<br>Losartan<br>Irbesarton<br>Glyburid<br>Glibenklamid<br>Glipizid<br>Glimepirid<br>Amitriptylin<br>Celecoxid<br>Fluoxetin<br>Fluvastatin<br>Glyburid<br>Nateglinid<br>Lornoxicam<br>Meloxicam<br>Naproxen<br>Piroxicam<br>Suprofen<br>Tolbutamid<br>Glipizid<br>Fenyltoin<br>Rosiglitazon<br>Tamoxifen<br>Torsemid<br>S-warfarin |

|                           |   |  |   |
|---------------------------|---|--|---|
|                           |   | Ventafaxin   |   |
| <b>Enzym</b>              | <b>CYP2C8</b>   | <b>CYP2A6</b>  | <b>CYP2E1</b>   |
| <b>Tkáňová lokalizace</b> | Játra, plíce, mozek, srdce, kostní dřeň   | Játra  | Játra, plíce, mozek, srdce, kostní dřeň   |
| <b>Substrát</b>           | Enfluran<br>Halothan<br>Benzen<br>Chlorzoxa-zon<br>Ethanol<br>Isofluran<br>Methoxy-fluran<br>Sevofluran | Nikotin<br>Kumarin<br>steroidy   | Enfluran<br>Halothan<br>Benzen<br>Chlorzoxazon<br>Ethanol<br>Isofluran<br>Methoxyfluran<br>Sevofluran<br>Acetaminofen   |
| <b>Enzym</b>              | <b>CYP2B6</b>   | <b>CYP2C19</b>   | <b>CYP3A4</b>   |
| <b>Tkáňová lokalizace</b> | Játra, srdce  | Játra, srdce   | Játra, střevo, ledviny, plíce, mozek, lymfocyty, placenta   |
| <b>Substrát</b>           | Bupropion<br>Efavirenz<br>Ifosfamid<br>Cyklofosfamid<br>Methadon  | Lansoprazol<br>Omeprazol<br>Pantoprazol<br>Chloramphenicol<br>Clomipramin<br>Cyklofosfamid<br>Hexobarbital<br>Imipramin<br>Indomethacin<br>Moklobemid<br>Rabeprazol<br>Diazepam<br>Phenytoin<br>Mephenytoin<br>Phenobarbiton | Klarithromycin<br>Erythromycin<br>Telithromycin<br>Antiarytmika<br>Alprazolam<br>Diltiazem<br>Felodipin<br>Nifedipin<br>Nitrendipin<br>Verapamil<br>Atorvastatin<br>Cerivastatin<br>Lovastatin<br>Diazepam<br>Midazolam |

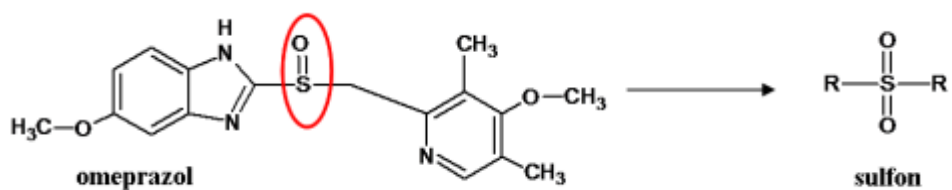
|  |  |   |  |
|--|--|---|--|
|  |  | Amitriptylin<br>Carisoprodol<br>Citalopram<br>Primidon<br>Progesteron<br>Propranolol<br>Teniposid<br>R-warfarin | Triazolam<br>Cyklosporin<br>Tacrolimus<br>Indinavir<br>Nelfinavir<br>Ritonavir<br>Saquinavir<br>Cisaprid<br>Astemizol<br>Terfenadin<br>Amlodipin<br>Estradiol<br>Hydrokortison<br>Progesteron<br>Alfentanyl<br>Aripiprazol<br>Buspiron<br>Cilostazol<br>Kodein<br>Dapson<br>Dexamethason<br>Dextromethorphan<br>Docetaxel<br>Domperidon<br>Fentanyl<br>Finasterid<br>Gleevec<br>Haloperidol<br>Quetiapin<br>Quinin<br>Risperidon<br>Salmeterol<br>Sildenafil |
|--|--|---|--|

|  |  |  |   |
|--|--|--|---|
|  |  |  | Irinotekan<br>Lidokain<br>Methadon<br>Ondansetron<br>Propranolol<br>Sirolimus<br>Tomaxifen<br>Taxol<br>Terfenadin<br>Trazodon<br>Vinkristin<br>Zaleplon<br>Zolpiden |
|--|--|--|---|

Tabulka č. 1 Nejdůležitější CYP v metabolismu léčiv, jejich tkáňová lokalizace, příklady substrátů jednotlivých CYP (dle Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001)

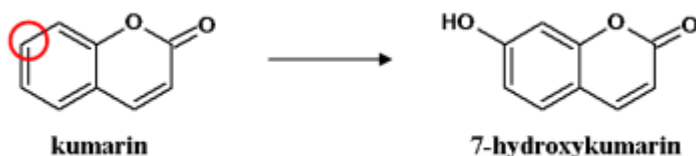
Kromě hydroxylací jsou dalšími oxidačními reakcemi CYP O-dealkylace, N-dealkylace, sulfoxidace, deaminace (Guengerich a Macdonald, 1990). Nekatalyzují však pouze hydroxylační reakce na atomu uhlíku. Mezi další biotransformační reakce patří epoxidace na dvojnou vazbu; oxygenace heteroatomu síry, dusíku, jódu; redukční dehalogenace; štěpení esterové vazby; oxidativní deaminace a dehydrogenace. Příklady některých reakcí na obrázku č. 2.

a) S-oxygenace omeprazolu

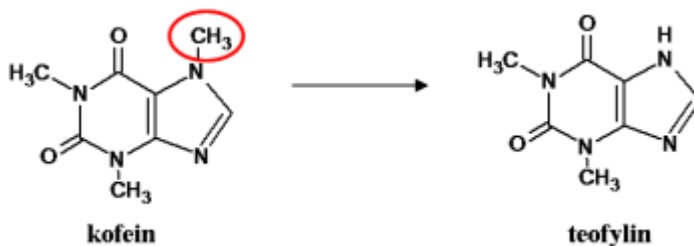




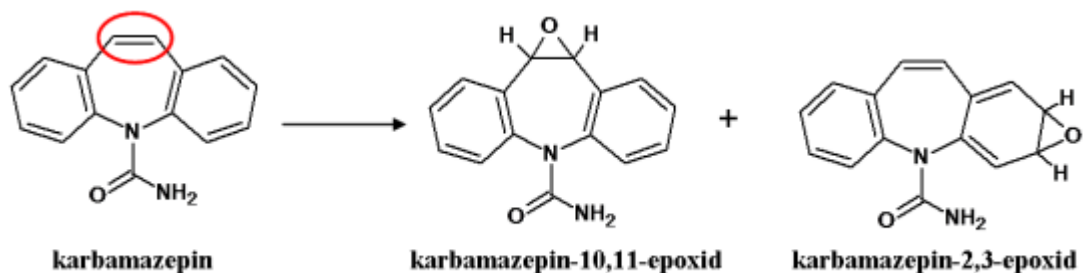
b) Hydroxylace kumarinu



c) N-dealkylace kofeinu



d) Epoxidace karbamazepinu



Obrázek 2. Příklady biotransformačních reakcí a) S-oxygenace omeprazolu, b) hydroxylace kumarinu, c) N-dealkylace kofeinu, d) epoxidace karbamazepinu (Parkinson, 2005).

Výskyt CYP je téměř ve všech živých organismech. Výjimku tvoří enterobakterie, kam patří např. *Escherichia coli*. Jejich počet v organismu se druh od druhu liší. *Caenorhabditis elegans* obsahuje 70 CYP, *Drosophila* 90 a *Arabidopsis thaliana* 330 (Berg a spol., 2002). V lidském organismu bylo dosud objeveno 57 forem CYP (Guengerich, 1995). U třech z nich je možný alternativní sestřih. Dále bylo identifikováno 58 pseudogenů CYP (nefunkčních kopií) (Omura a spol., 1962)

CYP jsou u savců téměř ve všech tkáních kromě svalových buněk a erytrocytů (Krejzlík a spol., 2000). V lidském těle má největší zastoupení v játrech, ale i v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku, nadledvinách (Stiborová a spol., 1999). Geny pro CYP jsou roztroušeny na všech lidských

chromozomech kromě chromozomu Y.(Omura a spol., 1962) Množství mikrosomálního CYP se může lišit u jednotlivých populací bez zjevných problémů. Typ CYP2D6 chybí u 7% kavkazské populace (Berg a spol., 2002). V buňkách je lokalizován v membránách hladkého endoplazmatického retikula nebo v membránách mitochondrií (Stiborová a spol., 1999). Bakteriální CYP jsou spíše rozpustné hemoproteiny. Přibližná molekulová hmotnost se pohybuje kolem hodnoty 50 000. (Stiborová a spol., 2004)



Obrázek 3. Dva pohledy krystalové struktury lidského CYP1A2 (Anzenbacher a Zanger, 2012)

Hladina CYP nelze brát v jednotlivých tkáních jako stálou. Tento obsah je závislý na mnoha faktorech, mezi které patří např. věk, výživa, konzumace alkoholu, kouření, působení léčiv a genetický polymorfismus, což je geneticky podmíněná odlišnost postihující cca 2% z uvažované populace. Jedná se o absenci CYP, nemožnost indukce (zvýšit tvorbu) CYP, nebo tvorba CYP se změněnou katalytickou aktivitou, v důsledku vrozené změny DNA. Genetický polymorfismus se liší u různých lidských ras a populací. Dnes je pozorován na úrovni genu PCR (polymerázové řetězcové reakce) s následným štěpením produktů restrikčními (štěpícími DNA) enzymy (Stiborová a spol., 1999).

CYP jsou membránově vázané enzymy. V buňkách je můžeme najít na dvou místech. Prvním z nich jsou mitochondrie, dále pak mikrosomální buněčná frakce, což je endoplazmatické retikulum. Biosyntézy endogenních látek se zúčastní převážně mitochondriální CYP. Pro metabolismus léčiv jsou pro nás

podstatné mikrosomální CYP, které se nachází převážně v játrech. Částečně jsou tyto enzymy exprimovány i v ostatních částech gastrointestinálního traktu, jako jsou střeva, ale mohou být i v mozku, ledvinách nebo plicích (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

Nejdůležitější CYP podílející se na 70-80% reakcí v metabolismu léčiv jsou z rodin CYP1, CYP2 a CYP3. Těmto reakcím podléhají v I. fázi metabolismu (Evans a Relling, 1999). Majoritní množství CYP je v jaterní tkáni viz. Tabulka č. 2.

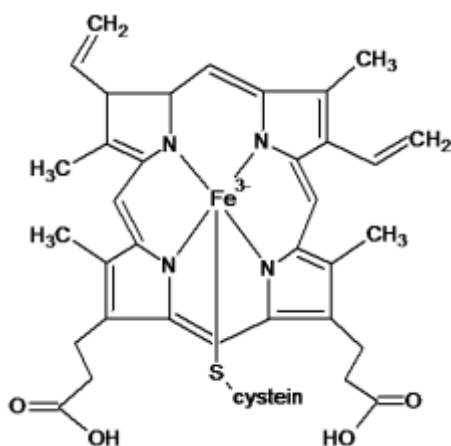
| Tkáň         | Obsah CYP<br>(nmol CYP/mg tkáně) |
|--------------|----------------------------------|
| Játra        | 0,30-0,60                        |
| Nadledviny   | 0,23-0,54                        |
| Tenké střevo | 0,03-0,21                        |
| Mozek        | 0,10                             |
| Ledviny      | 0,03                             |
| Plíce        | 0,01                             |
| Varlata      | 0,01                             |

Tabulka č. 2 Množství CYP ve vybraných lidských tkáních (Hrysay a Bandiera, 2008).

## 2.1 Struktura

Cytochrom P450 (CYP) byl dříve nazývaný „buněčný chromofor“. Objevil ho M. Klingenberg v roce 1958 (Klingenberg, 1958). Protein byl pojmenován v roce 1961 jako cytochrom P450. Název vznikl podle toho, že popisoval přítomnost pigmentu P v jaterních mikrosomech, číslo 450 je vlnová délka absorpčního maxima po redukci s oxidem uhelnatým (Omura a spol., 1962). Tato vlnová délka je pro hemoproteiny neobvyklá, protože běžné hemoproteiny absorbují okolo 420 nm. CYP je hemoprotein typu b, který je určen jeho strukturou (Stern a Peisach, 1974). Tato vlastnost je způsobena vazbou specifického ligandu na hemové železo. Tímto ligandem je anion síry S<sup>-</sup>

procházející z aminokyseliny cysteinu v aktivním místě enzymu (pátý ligand) (Nelson, 1999). Další čtyři ligandy vázající se na hemové železo, představují atomy dusíku porfyrinového jádra hemu, Posledním ligandem vázajícím se na hemové železo je atom kyslíku (Guengerich a Johnson, 1997). Toto uspořádání umožňuje jejich výjimečné chování a vzhledem k odlišným katalytickým a spektrálním vlastnostem rozlišení od ostatních hemoproteinů (Stiborová a spol., 2004).



Obrázek 4. Struktura hemu v CYP; S<sup>-</sup> tvořící pátý ligand vázající se na hemové železo pocházející z cysteinu (Guengerich a Johnson, 1997).

Celkový tvar apoproteinů CYP je evolučně zachovalý a značně konzervativní. Daná struktura je jedinečně přizpůsobena hem-thiolátovému chemismu, nezbytnému pro kyslíkovou aktivaci, vazbě redoxních partnerů a stereochemickému (prostorovému uspořádání v molekulách) rozpoznání substrátu (Williams a spol., 2003). Skládá se z různých strukturních elementů, které se mohou u jednotlivých typů enzymů lišit. Kompozice obsahuje helixy A-L, u kterých obecně platí, že čím blíže hemu se daná oblast nachází, tím více je konzervována, tedy nejvíce jsou konzervovány helixy I a L, které jsou v přímém kontaktu s hemem. Helix B je odpovědný za rozpoznání substrátu. Další konzervativní částí struktury je β-klemba chránící cysteinový zbytek vázající hem. Ve struktuře helixu I se v místě bočního řetězce threoninu nacházejí 2 molekuly vody. Toto uspořádání je důležité pro správný přenos protonů na kyslíkovou molekulu (Poulos a Johnson, 2005).

## 2.2 Názvosloví

V živých systémech se CYP vyskytují v různých formách. Tyto formy jsou označovány jako izoenzymy či izoformy. Izoenzymy můžeme řadit dle míry homologie jejich primární struktury proteinových molekul do genetických skupin a podskupin. Bylo popsáno více než 500 izoenzymů CYP, které náleží do 74 skupin. Mezi savčí CYP patří 14 z nich, které se dále dělí na 26 podskupin. V lidském genomu se nachází 20 podskupin. Skupiny jsou označovány prvním číslem nacházejícím se za zkratkou P450, dále písmeno označuje podskupinu, a jako poslední je číslo izoenzymu. V novém systematickém názvosloví se cytochromy P450 označují zkratkou CYP, vzniklá z **CY**tochrome **P**450, kterou navrhl D. W. Nebert (Stiborová, M., 1999).

| <b>Substráty</b> | <b>Cytochromy P450</b>   |
|------------------|--|
| Mastné kyseliny  | 4A11, 4B1, 4F12, 2J2   |
| Eikosanoidy      | 4F2, 4F3, 4F8, 5A1, 8A1  |
| Vitaminy         | 24A1, 26A1, 26B1, 27B1   |
| Steroidy         | 7A1, 7B1, 8B1, 11A1, 11B2, 17A1, 19A1, 21A2, 27A1, 39A1, 46A1, 51A1                    |
| Xenobiotika      | 1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2A6, 2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2F1, 3A4, 3A5, 3A7 |

Tabulka č. 3 Rozdělení nedůležitějších lidských CYP dle typu jejich substrátu (Guengerich, 1995).

## 3. Metabolismus

Léčivo je distribuováno krví do cílových tkání a cestou vena portae do jater po intravenózní aplikaci či absorpci z gastrointestinálního traktu. Hlavním biotransformačním orgánem jsou právě játra, která představují majoritní expresi řady biotransformačních enzymů (Slaughter a spol., 1995). V biotransformaci léčiv hrají však roli i jiné enzymy, které se nacházejí ve střevě (Thelen a Dressman, 2009). Tyto enzymy jsou zodpovědné za zvýšenou clearanci léků podávaných perorálně, které se absorbují ve střevě. V tenkém střevě odchází ke značné konjugaci s endogenním sulfátem a ke snížení biodostupnosti třeba u léčiva salbutamol, patřícího do skupiny  $\beta$ -sympatomimetik a používaný k léčbě astma bronchiale (Morgan a spol., 1986).

Lipofilní léčiva (rozpuštěná v tucích) jsou na rozdíl od parentních léčiv snadněji vylučována močí nebo stolicí. Důvodem je, že metabolity lipofilních léčiv jsou více polární, tedy rozpustné ve vodě. Některá léčiva však jsou v těle vpravována v neúčinné formě, které říkáme prodrugs. K aktivaci dochází až po biotransformaci určitými enzymy. Jedná se o různé cytostatika. Příkladem může být cyklofosfamid, který je aktivován pomocí enzymů na 4-hydroxymetabolit, spontánně se rozloží na urotoxický akrolein a účinnou látku fosfamid. Ten obsahuje ve své struktuře hořčičný dusík, kterým dojde pomocí alkylujícího mechanismu k poškození DNA (Kwon, 1999).

### 3.1 Významnost CYP v metabolismu léčiv v klinické medicíně

Při studiu léčiv dvou farmaceutických společností bylo zjištěno, že CYP se podílí přibližně na 75% enzymatických reakcí v krvi metabolismu léků. Z těchto CYP reakcí je většina oxidace a zhruba 90% může být zaslouženo skupině CYP – 1A2, 2C0, 2C19, 2D6 a 3A4. Přiřazení jednotlivých CYP aktivit lze provést pomocí inhibitorů a diagnostiky markerových aktivit pro korelační analýzy. Mezi hlavní klinické problémy CYP patří to, že je nedostatek CYP podílejících na metabolismu endogenních sloučenin, zejména steroidů a vitamínů rozpustných v tucích a problémy s metabolismem léčiv včetně lékových interakcí. Proto došlo k jiným studiím zabývajícím se metabolismem

endogenních sloučenin. Byly spojeny endokrinní poruchy s nefunkčními CYP do steroidního metabolismu (CYP 19A1). Deficity CYP podílejících se na metabolismu vitamínu D jsou spojeny s rachitidou (CYP 27B1). Kromě genetických abnormalit může dojít k poruchám steroidních metabolismů při nedostatku NADPH reduktázy. Užitečnost CYP 19A1 je třeba při rakovině, kdy CYP produkuje estrogény, a v kombinaci s léky dochází k inhibici enzymu v rakovině vůči estrogením receptorům. Dále je zvažována terapie i s CYP 1B1, 2A6, 5A1, 11A1, 11B1, 11B2, 17A1 a 24A1.

Obecnými problémy jsou, že pokud je aktivita CYP k léku velmi vysoká, normální dávka léku může být u takového jedince neúčinná. Pokud je metabolismus léku pomalejší, než by se očekávalo, dochází k akumulaci léku. Může dojít k vedlejším účinkům často v důsledku zhoršené farmakologické odpovědi. Dále může dojít k problému při interakcemi mezi dvěma léky, které mají ve Spojených státech na svědomí asi 10 úmrtí ročně.

## 4. Konjugační enzymy

Konjugační enzymy patří mezi transferázy, což jsou enzymy se schopností přenášet určité chemické struktury na molekuly cílové látky. V tomto případě nás jako cílové látky zajímají molekuly léčiva. Mezi nejvýznamnější enzymy II. fáze metabolismu léčiv řadíme UGT a SULT. Jejich endogenní substráty vstupující do konjugovaných reakcí jsou vysoce polární látky. U UGT tvoří endogenní substrát kyselina glukuronová, v případě SULT je to sulfát. Sloučení substrátu s léčivem vede ve většině případů k tvorbě vysoce polárního metabolitu. Dále dochází k jeho eliminaci a vyloučení močí či stolicí. Konjugační enzymy jsou v buňkách lokalizovány především v cytosolu, pouze UGT jsou vázány v membránách endoplazmatického retikula (Evans a Relling, 1999).

Cílem těchto reakcí, které jsou katalyzovány těmito enzymy, je hlavně eliminace cizorodých látek z organismu prostřednictvím tvorby vysoce polárních molekul. Interakce léčiva však mohou být i nežádoucí (Michalets a Williams, 2000).

## 4.1 UDP-glukoronosyltransferasy

UDP patří mezi membránově vázané enzymy, které jsou lokalizovány v endoplazmatickém retikulu mnoha tkání, hlavně v játrech, ledvinách, mozku, slezině, kůži a nosní sliznici. Glukuronidace u léčiv probíhá na nukleofiních heteroatomech kyslíku, síry nebo dusíku. Nejčastěji podléhají glukuronidaci alifatické alkoholy, karboxylové kyseliny, látky obsahující aminoskupinu nebo třeba látky fenolické povahy. Endogenní látku tvoří UDP-glukuronová kyselina. Glukuronidy léčiv, které vzniknou, jsou snadno vyloučeny močí nebo stolicí díky vysoké polaritě vnášené právě kyselinou. Mezi substráty patří i jiné látky. Patří mezi ně žlučové kyseliny, bilirubin nebo steroidní hormony, či prokarcinogeny z vnějšího prostředí (Ritter, 2000; Turkey a Strassburg, 2000).

Mezi nejdůležitější UGT podílející se na metabolismu léčiv patří do podrodin UGT1A a UGT2B. Na glukuronidaci jednoho léčiva se podílí více jednotlivých UGT díky jejich nízké substrátové specifitě. Pokud dojde k vyřazení jedné UGT z metabolismu daného léčiva, nemusí dojít ke snížení glukuronidace a pomalé eliminaci dané látky z organismu. Platí však stejně jak u CYP, že jejich aktivita může být inhibována některými látkami, některé jsou indukovatelné.

| Enzym         | Lokalizace | Substrát   |
|---------------|------------|--|
| <b>UGT1A1</b> | Játra      | Paracetamol, buprenorfin,<br>karvedilol,<br>ethinylestradiol,<br>etoposid, morfin,<br>kys. mykofenolová,<br>naltrexon            |
| <b>UGT1A3</b> | Játra      | Amitriptylin, buprenorfin,<br>klofibrát, klozapin,<br>diklofenak, ibuprofen,<br>ketoprofen, imipramin,<br>morfin, kys. valproová |



|                |                          |   |
|----------------|--------------------------|---|
| <b>UGT1A4</b>  | Játra                    | Amitriptylin,<br>chlorpromazin, klozapin,<br>imipramin, olanzapin,<br>tomaxifen,<br>trifluoperazin  |
| <b>UGT1A6</b>  | Játra                    | Paracetamol, morfin,<br>kys.valproová   |
| <b>UGT1A7</b>  | Jícen, žaludek, plíce    | Kys.mykofenolová  |
| <b>UGT1A8</b>  | Gastrointestinální trakt | Morfin,<br>kys.mykofenolová,<br>naloxon, naltrexon,<br>propofol, raloxifer  |
| <b>UGT1A9</b>  | Játra                    | Paracetamol, diklofenak,<br>flurbiprofen, ibuprofen,<br>ketoprofen, morfin,<br>kys.mykofenolová,<br>oxazepan,<br>kys.valproová, propofol  |
| <b>UGT1A10</b> | Gastrointestinální trakt | Warfarin, morfin,<br>raloxifen,<br>kys.mykofenolová   |
| <b>UGT2B4</b>  | Játra                    | Karvedilol  |
| <b>UGT2B7</b>  | Játra                    | Buprenorfin, karvedilol,<br>karbamazepin, kodein,<br>cyklosporin A,<br>diklofenak, flurbiprofen,<br>ubiprofen, ketoprofen,<br>morfin, naproxen,<br>nalorfin, oxazepam,<br>takrolimus, zidovudin,<br>kys.valproová |
| <b>UGt2B15</b> | Játra                    | Entacapon, tolcapon,<br>oxazepam  |

|                |       |           |
|----------------|-------|-----------|
| <b>UGT2B17</b> | Játra | Ibuprofen |
|----------------|-------|-----------|

Tabulka č. 4 UDT podílející se na biotransformaci léčiv – jejich lokalizace v tkáni a nejvýznamnější substráty (Cheng a spol., 1998; Tukey a Strassburg 2000; Fisher a spol., 2001; Kiang a spol., 2005).

## 4.2 Sulfotransferasy

Hlavní funkcí těchto enzymů je tvorba sulfátů, které jsou vysoce hydrofilní a rychle eliminovány z těla močí (Lindsay a spol., 2008). Bylo popsáno a identifikováno celkem 13 lidských SULT (Riches a spol., 2009).

SULT přenáší polární sulfátovou skupinu z endogenní látky na příslušné endo- i exogenní substráty. Tuto endogenní látku tvoří 5'-fosfoadenosin-3'-fosfát (PAPS) (Zhang a spol., 1998).

Hlavní role SULT spočívá v detoxifikaci léčiv, ale existují i případy, kdy přispívají k aktivaci promutagenů, teratogenů a prokarcinogenů (Glatt, 1997; Gilatt, 2001). Vzniklý sulfát však může i vykazovat větší farmakologickou účinnost než parentní léčivo (Falady a Kerl, 1990).

Významné sulfotransferázy podílející se u člověka na metabolismu léčiv jsou SULT1A1, SULT1A3, SULT1B1, SULT1E1 a SULT2A1. Nejvýznamnějším jaterním SULT je SULT1A1, který tvoří v játrech 50% celkového proteinu. Nicméně v tenkém střevě je exprese tohoto enzymu snižená, převládá zde SULT1A3 a SULT1B1. Tyto dva enzymy jsou ve střevní tkáni exprimovány ve zvýšené míře. V játrech lze SULT1A3 detekovat pouze v prenatalním období, po narození klesá exprese na 0. Jeho funkcí je sulfatace biogenních aminů – dopamin, adrenalin, noradrenalin (Blanchard a spol. 2004; Eisenhofer a spol., 1999). SULT1A3 je hlavní extrahepatickou formou SULT se zvýšenou expresí v tenkém střevě, proto je považován za výrazně ovlivňující biodostupnost některých léčiv či biogenních aminů obsažených v potravě, proto by měl být jejich význam posouzen u všech nově testovaných terapeutik s perorálním podáním (Tuebner a spol., 2007).

| Enzym          | Substrát/Xenobiotikum  |
|----------------|--|
| <b>SULT1A1</b> | Apomorfin, minoxidil, orální kontraceptiva, paracetamol, sloučeniny cigaretového kouře |
| <b>SULT1A3</b> | Apomorfin, paracetamol, salbutmaol, sloučeniny cigaretového kouře                      |
| <b>SULT1B1</b> | Prokarcinogeny   |
| <b>SULT1E1</b> | Paracetamol  |
| <b>SULT2A1</b> | Desipramin, chinolony, metaklopramid   |

Tabulka č. 5 Nejvýznamnější SULT podílející se na biotransformaci xenobiotik (Adjei a spol., 2008; Yasuda a spol., 2005; Yasuda a spol., 2007, Hempel a spol., 2007; Thomas a Coughtrie, 2003; Morgan a spol, 1986; Riches a spol., 2009; Senggunprai a spol., 2009).

## 5. Lékové interakce

Nežádoucí interakce léčiv můžeme dělit na základě farmaceutických interakcí, tedy lékové inkopatibility, farmakodynamického účinku (např. sedativa a alkohol), a na základě ovlivnění farmakologických léčiv.

| Typ ovlivnění léčiv        | Příklad   |
|----------------------------|---|
| Snížení absorpce léčiva    | Změna pH  |
| Ovlivnění distribuce       | Kompetice o vazbu na plazmatické bílkoviny                                |
| Vliv metabolismu           | Snížení hladiny léčiva v důsledku extenzivního metabolismu                |
| Ovlivnění eliminace léčiva | Interference na úrovni vylučování léčiv a jejich metabolitů (v ledvinách) |

Tabulka č. 6 Nežádoucí interakce léčiv na základě interakce farmakologických léčiv (Michalets a Williams, 2000).

## 5.1 Interakce na úrovni CYP

Podstatou metabolismu léčiv je reakce léčiva s aktivovaným atomem kyslíku. Aktivace molekuly kyslíkem je děj, který odlišuje CYP od ostatních hemoproteinů, např. hemoglobinu, kde je molekula vázána stejným způsobem na hemové železo. Schopnost aktivovat kyslík se nazývá interakce. Ta je dána způsobem vazby navázané molekuly kyslíku s bílkovinnou částí CYP.

Interakce léčiv z ovlivnění aktivit biotransformačních enzymů je právě v systému CYP. Jedná se o interakce léčiv vznikající v důsledku inhibice enzymové aktivity CYP. Poté byly popsány látky vyvolávající indukci exprese CYP (Michalets a Williams, 2000).

Nejrozšířenějším CYP v lidském organismu je CYP3A4. V játrech tvoří 30% všech CYP. Podílí se na 52% známých přeměn léčiv za účasti CYP. Původní role tohoto CYP byla zprostředkování metabolismu a přeměn endogenních steroidů v játrech a dalších orgánech (Kousalová a spol., 2003)

Inhibice CYP s léčivy je známá řadu let. Cimetidin inhibuje nespecificky aktivitu CYP v mikrosomální trakci lidských a prasečích jater (Rendic a spol., 1983). Od roku 1983 bylo identifikováno desítky více či méně selektivních inhibitorů jednotlivých CYP. Nejčastější a nejzávažnější interakce léčiv jsou právě způsobeny CYP, což způsobilo stažení léků z trhu. Jedná se o látky jako cisaprid, mibefradil nebo terfenadin.

Při gastrointestinálních poruchách, jako je gastroezofageální reflex u dětí a dospělých, byl předepisován v USA jako prokinetikum právě cisaprid. Tento lék zapříčinil přes tři sta případů ventrikulární arytmie, které v mnoha případech končily smrtí. Při bližším zkoumání bylo zjištěno, že cisaprid obsahuje CYP3A4 a při současném podání s některým z inhibitorů CYP3A4, jako jsou marolidová antibiotika nebo některá antitykotika, vzroste jeho koncentrace v organismu a překročí rozsah hladin a může dojít k toxickým účinkům tohoto léčiva (Michalets a Williams, 2000).

CYP lze rozdělit dle zvyklostí z enzymologie na kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšené inhibitory, jejichž přehled najdete v tabulce č. 7. Kompetitivní inhibitory, tvoří nejznámější typ, kompetují s dalším substrátem o vazbu do aktivního místa enzymu. Jedná se o látky, které bývají zároveň substrátem enzymu nebo látky, které jsou daným enzymem

metabolizované. Jeho účinek se dá zvrátit pomocí zvýšení koncentrace substrátu a vytěsněním inhibitoru z vazebného místa enzymu. Záleží však také na afinitě substrátu a inhibitoru k danému enzymu. Inhibitor působí velmi rychle a nevede k destrukci enzymu (Lin a Lu, 1998). Nekompetitivní inhibitor se váže na jiné místo než je aktivní vazebné místo enzymu. Akompetitivní se váže na komplex enzym-substrát, ne na samotný enzym. V reálné praxi se nejvíce vyskytují smíšené inhibitory a to konkrétně kombinace kompetitivních a nekompetitivních (Hollenberg, 2002), nazývané ireverzibilní inhibice. Tento proces je nevratný a lze zvrátit pouze syntézou enzymu de novo, proto se někdy nazývá sebevražedné substráty. Inhibitor ireverzibilní je přeměňován enzymem na metabolit, který sám způsobí nevratnou enzymovou inhibici. Sebevražedný inhibitor je CYP1A2 (furafyllin) (Sesardic a spol., 1990, Kunze a Trager, 1993) a CYP3A4 (gestoden) (Guengerich, 1990; Back a spol., 1991).

| <b>CYP</b>     | <b>Inhibitor</b>         | <b>Typ inhibice</b> | <b>Citace</b>           |
|----------------|--------------------------|---------------------|-------------------------|
| <b>CYP1A2</b>  | Ciprofloxacin            | Kompetitivní        | McLella a spol., 1996   |
|                | Furafyllin               | Ireverzibilní       | Sesardic a spol., 1990  |
|                | Fluvoxamin               | Kompetitivní        | Rasmussen a spol., 1995 |
| <b>CYP2A6</b>  | Tranlylcypromin          | Kompetitivní        | Zhang a spol., 2001     |
|                | 8-methoxypsoralen        | Ireverzibilní       | Draper a spol., 1997    |
| <b>CYP2B6</b>  | Tiklopidin               | Ireverzibilní       | Richter a spol., 2004   |
|                | Klopidogrel              | Ireverzibilní       | Richter a spol., 2004   |
|                | 17-alfa-ethinylestradiol | Ireverzibilní       | Kent a spol., 2002      |
| <b>CYP2C8</b>  | Montelukast              | Kompetitivní        | Walsky a spol., 2005    |
|                | Trimetropin              | Kompetitivní        | Wen a spol., 2002       |
|                | Amiodaron                | Kompetitivní        | Li a spol., 2002        |
| <b>CYP2C9</b>  | Sulfafenazol             | Kompetitivní        | Baldwin a spol., 1995   |
|                | Flukonazol               | Smíšená             | Kunze a spol., 1996     |
|                | Amiodaron                | Nekompetitivní      | Heinmark a spol., 2000  |
| <b>CYP2C19</b> | Omeprazol                | Kompetitivní        | Ko a spol., 1997        |
|                | Tiklopidin               | Ireverzibilní       | Turpeinen a spol., 2006 |
| <b>CYP2D6</b>  | Quinidin                 | Kompetitivní        | Broly a spol., 1989     |
|                | Terbinafin               | Kompetitivní        | Vickers a spol., 1999   |
|                | Paroxetin                | Kompetitivní        | Schmider a spol., 1997  |

|               |   |  |  |
|---------------|---|--|--|
|               | Fluoxetin<br>Sertralin  | Kompetitivní<br>Kompetitivní   | Schmider a spol., 1997<br>Schmider a spol., 1997   |
| <b>CYP2E1</b> | Diethyldithiokarbamát<br>Klometiazol<br>Disulfiran                      | Ireverzibilní<br>Nekompetitivní<br>Ireverzibilní                               | Chang a spol., 1994<br>Hu a spol., 1994<br>Guengerich a spol., 1991  |
| <b>CYP3A4</b> | Ketokonazol<br>Itrakonazol<br>Troleandomycin<br>Ritonavir<br>Nelfinavir | Kompetitivní<br>Kompetitivní<br>Ireverzibilní<br>Ireverzibilní<br>Kompetitivní | Baldwin a spol., 1995<br>Niwa a spol., 2005<br>Newton a spol., 1995<br>Eagling a spol., 1997<br>Ernest a spol., 2005 |

Tabulka č. 7 Příklady inhibitorů jednotlivých CYP

V následující tabulce č. 8 jsou uvedeny významné lékové interakce založených na inhibici CYP.

| <b>Enzym</b>                    | <b>Substrát</b> | <b>Inhibitor</b>                                  | <b>Klinický projev</b>                                   | <b>Alternativní lék místo inhibitoru</b> |
|---------------------------------|-----------------|---|--|--|
| <b>CYP3A4</b>                   | Alprazolam      | Fluoxetin<br>Fluvoxamin                           | Ospalost, závrať,<br>ataxie                              | Lorazepam<br>Oxazepam<br>Temazepam       |
| <b>CYP3A4</b>                   | Karbamazepin    | Klaritromycin<br>Erytromycin                      | Manifestace NÚ   | Azitromycin                              |
| <b>CYP3A4</b><br><b>CYP2C19</b> | Citalopram      | Inhibitory<br>monoaminoxidasy                     | Serotoninový<br>syndrom                                  | -----                                    |
| <b>CYP3A4</b>                   | Cyklosporin     | Amiodaron   | Toxický syndrom  | -----                                    |
| <b>CYP2D6</b>                   | Desipramin      | Cimetidin   | Toxicita   | Fomatidin<br>Ranitidin                   |
| <b>CYP1A2</b><br><b>CYP2D6</b>  | Imipramin       | Fluvoxamin<br>Fluoxetin<br>Paroxetin<br>Sertralin | Zmatení, třes,<br>prohloubení<br>anticholinergních<br>NÚ | Bupropion<br>Venlafaxin                  |
| <b>CYP3A4</b>                   | Lovastatin      | Erythromycin                                      | Myopatie   | Azithromycin                             |

|                                |            |  |                            |                                  |
|--------------------------------|------------|--|----------------------------|----------------------------------|
| <b>CYP2C9</b>                  | Fenytoin   | Fluoxetin  | Závažné NÚ                 | Sertralin<br>Paroxetin           |
| <b>CYP3A4</b>                  | Verapamil  | Grapefruitová<br>šťáva                                 | Manifestace NÚ             | Jablečný,<br>pomerančový<br>džus |
| <b>CYP1A2</b><br><b>CYP3A4</b> | R-warfarin | Ciprofloxacin<br>Norfloxacin<br>Cimetidin<br>Amiodaron | Zvýšení INR,<br>krvácivost | Levofloxacin<br>Lomefloxacin     |
| <b>CYP2C9</b>                  | S-warfarin | Amiodaron<br>Peronální<br>antidiabetika<br>NSAIDs      | krvácení                   |                                  |

Tabulka č. 8 Klinicky významné interakce založené na inhibici CYP (Michalets, 1998; Kousalová a spol., 2003).

### 5.1.1 Interakce CYP3A4

Hladina tohoto CYP se může zvyšovat při podání různých látek, kdy následkem interakce s CYP3A4 může dojít ke snížení hladiny metabolizované látky a vzrůst metabolitu. Těmito látkami jsou např. některé steroidy, barbituráty, rifampicin a extrakt z třezalky tečkované. V dalším případě může dojít k soutěži dvou léčiv, vázajících se na stejný CYP, o vazebné místo. Dojde ke zvýšení hladiny znevýhodněného léčiva.

Mnoho lékových interakcí je společných pro CYP3A4 a P-glykoprotein, vzhledem k podobnostem inhibitorů a induktorů. P-glykoprotein je proteinový přenašeč, který je zodpovědný za mnohočetnou lékovou rezistenci. Některé významné interakce v důsledku CYP3A4 jsou popsány v tabulce č. 8 (Kousalová a spol., 2003).

## 5.1.2 Interakce na úrovni konjugačních enzymů

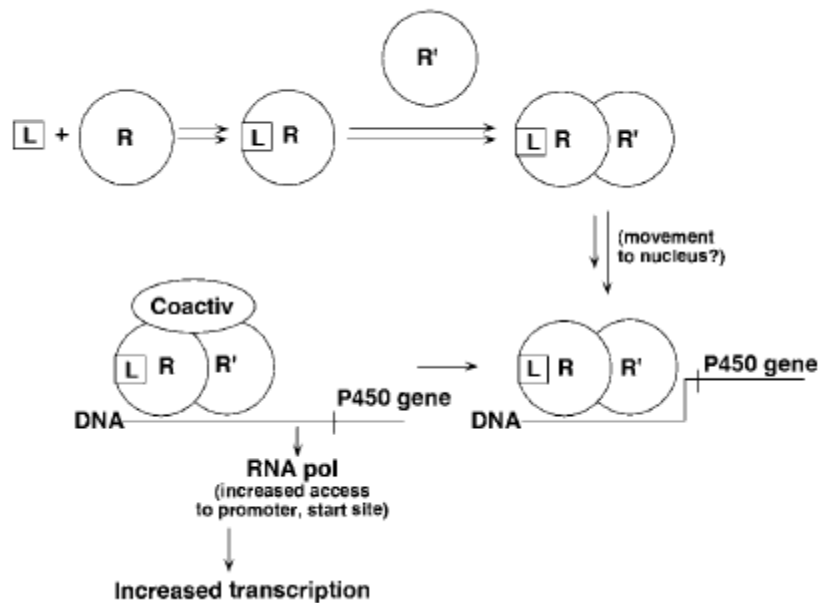
Při kombinaci léčiv může dojít k dalším potenciálním komplikacím lékových interakcí na úrovni UGT. Nebyly však tak prostudovány jako u CYP. Významné interakce u UGT byly popsány jen u několika látek. Jedná se o kodein, karbamazepin, propafenon nebo paracetamol (Kiang a spol., 2005).

Některé UGT podléhají indukci s lidskými hepatocyty a buněčnými liniemi podobně jako CYP. Patří sem např. UGT1A1 (Sugatani a spol., 2004), UGT1A3 (Sabalovic a spol., 2009), UGT1A6 a UGT2B7 (Munzel a spol., 1999). Induktory zvyšují expresi UGT enzymů (Soars a spol., 2004), ale také ovlivňují expresi dalších enzymů podílejících se na metabolismu léčiv, především CYP (Sugatani a spol., 2004). Mezi tyto induktory patří rifampicin, fenytoin, fenobarbital a karbamazepin (Soars a spol., 2004). Tyto látky působí indukci enzymů pomocí interakcí s jednou rodinou transkripčních faktorů CAR a PXR (Sugatani a spol., 2004). UGT mohou vykazovat genetický polymorfismus. Není však dostatek studií, které by se zabývaly studií vlivu genetického polymorfismu UGT na metabolismus léčiv. Polymorfní UGT jsou UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT2A1, UGT2B4, UGT2B7 a UGT2B15 (Guillemette, 2003).

## 5.2 Regulace CYP

Velká část regulace CYP se vyskytuje na úrovni transkripce, tedy rychlosti syntézy mRNA. Na obrázku č. 4 můžeme vidět obecný model, kde závazný ligand aktivuje receptor. Ve většině případů pak tento receptor váže jiný protein za vzniku heterodimeru, který zaujímá určitou pozici v 5' protiproudové oblasti CYP. V některých případech jsou přijímány koaktivátory do komplexu. Tento proces otevírá segment promotoru na RNA polymerázu, která poté kopíruje DNA za vzniku RNA. Tento obecný model je použitelný na několika případech.





Obrázek 5. Generalizovaný mechanismus indukce CYP zvýšenou transkripcí, L – ligand; R – receptor; heterodimerová složka pro vazbu receptoru R; koaktivační protein; RNA polymeráza (Anzenbacher a Zanger, 2012).

Velká část regulace proteinů podskupin CYP2C je řízen konstitutivními látkami androgenního receptoru CAR, který je spíše neobvyklý. Některé silné induktory jsou ligandy, ale většina induktorů tohoto systému způsobí vazbou na ligandy. Způsobují fosforylaci CAR na určitém místě, aby usnadnili jeho pohyb od jádra, po němž následuje interakce s ligandovým RXR proteinem pro vyvolání transkripce podskupiny CYPSB a CYP2C (Anzenbacher a Zanger, 2012).

## 5.3 Indukce CYP

Další příčinou nežádoucích lékových interakcí na úrovni CYP je enzymová indukce. Vlivem induktu dochází ke zvýšení syntézy daného enzymu, čímž dochází k urychlení metabolismu látky, která indukci vyvolala, nebo urychlení biotransformace substrátů indukovaného enzymu. Rychlost nástupu indukce závisí na biologickém poločase jednotlivých CYP a na farmakokinetice enzymového induktoru.

Po vysazení induktoru vliv enzymové indukce přetrvává, což je dáno rychlostí odbourávání příslušného proteinu (Michalets, 1998). Indukce CYP je zprostředkována převážně intracelulárními receptory, které ovlivňují transkripci příslušných genů. Tyto receptory regulují funkci některých enzymů I. a II. fáze metabolismu xenobiotik. Dále ovlivňují i metabolismus řady exo- a endogenních látek. Mezi intracelulární receptory řadíme AhR receptor (aryl hydrocarbon receptor), PXR receptor (pregnane X receptro) a CAR receptor (constitutive androstane receptor) (Pelkonen a spol., 2008).

AhR receptor reguluje převážně expresi genů v rodině CYP1, ovšem může regulovat i CYP2 (Rivera a spol., 2002; Aspiainen a spol., 2005). Tento typ receptoru může být aktivován složkami potravy. Jednou z nich je indol-3-karbinol obsažený v růžičkové kapustě (Bjeldanes a spol., 1991). Mezi hlavní ligandy patří polychlorové bifenyly, polyaromatické uhlovodíky a dioxiny (Nquyen a Brandfield, 2008). Při vazbě ligandu na cytosolický AhR receptor dojde ke změně konformace receptoru, díky které může následně proniknout do buněčného jádra. V jádře dojde ke spojení AhR receptoru s AhR jaderným translokátorem. Vzniklý dimer se váže na DNA v místě XRE-binding elements. Následuje transkripce příslušného úseku DNA (Kawajiri a Fujuu – Kuriyama, 2007). Lokalizace tohoto receptoru je především v játrech, placentě, plicích a v srdci (Dolwich a spol., 1993).

Mezi ligandy PXR receptoru patří řada léčiv užívaných v praxi (Chang a Wasman, 2006) jako je např. rifampicin. Tento induktor působí přes vazbu na tento receptor. K jeho eprimaci dochází převážně v játrech a tenkém střevě (Miki a spol., 2005). PHX receptor se v buněčném jádře váže s dalším faktorem a to s RXR receptorem, kdy jako komplex je schopný se vázat na DNA. Další působení kofaktorů způsobí následnou transkripci příslušných genů. Cílové geny jsou CYP3A4, který je jako hlavní, dále pak podrodiny CYP2A, CYP2B, CYP2C a CYP3A (Plant, 2007).

Expresí CAR receptoru je omezena převážně na játra a ledviny (Nishimura a spol., 2004). Odlišností tohoto receptoru je, že nemusí být navázán na ligand, protože je neustále aktivní. V buněčném jádře se spojí s RXR receptorem a vzniklý heterodimer se váže na příslušné úseky DNA. Při spuštění transkripce jsou přítomné i jiné kofaktory (Timsit a Negishi, 2007). Významnými CYP, na které působí CAR receptor, jsou enzymy ze skupiny

CYP2C a CYP3A (Song a spol., 1989; Carroccio a spol., 1994), dále pak CYP2B6 (Sueyoshi a spol., 1999). CYP2E1 tvoří výjimku, protože je regulován na postranlační úrovni látkami jako aceton, pyrazol, etanol a izoniazid (Song a spol., 1989; Carroccio a spol., 1994), které zvyšují stabilitu tohoto CYP. Toto zvýšení stability může být způsobeno inhibicí proteosomální degradace proteinu (Cederbaum, 2006). V tabulce č. 8 můžeme vidět příklady jednotlivých CYP, jejich induktorů a receptorů.

| <b>Enzym</b>   | <b>Receptor</b> | <b>Induktor</b>          | <b>Citace</b>            |
|----------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>CYP1A2</b>  | AhR             | Polyaromatiké uhlovodíky | Backman a spol. 2006     |
|                | PXR             | Rifampicin               | Faber a spol., 2005      |
| <b>CYP2A6</b>  | CAR/PXR         | Fenobarbital             | Benowitz a spol., 2006   |
| <b>CYP2B6</b>  | PXR             | Ritonavir                | Elsherbiny a spol., 2008 |
|                | CAR/PXR         | Fennytoin                | Kharasch a spol., 2008   |
| <b>CYP2C8</b>  | PXR             | Rifampicin               | Bidstrup a spol., 2004   |
| <b>CYP2C9</b>  | PXR             | Rifampicin               | Depre a spol., 2005      |
|                | CAR             | Karbamazepin             | Kay a spol., 1985        |
| <b>CYP2C19</b> | CAR/PXR         | Fenobarbital             | Svenson a spol., 1998    |
|                | PXR             | Karbamazepin             | Asimus a spol., 2007     |
| <b>CYP2E1</b>  | Stabilizace     | Ethanol                  | Benowitz a spol., 2003   |
|                | Stabilizace     | Izoniazid                | Chien a spol., 1997      |
| <b>CYP3A4</b>  | PXR             | Rifampicin               | Anglicheau a spol., 2003 |
|                | CAR             | Karbamazepin             | Kuypers a spol., 2004    |
|                | CAR/PXR         | Fenylytion               | Mouly a spol., 2002      |

Tabulka č. 9 Indukce jednotlivých CYP, jejich receptory a induktory

Induktory může způsobit i urychlit clearanci jiného léčiva, které je substrátem indukovaného enzymu. Nedojde pak k takové koncentraci v plazmě, aby se projevil účinek. Některé příklady lékových interakcí způsobených indukci jsou uvedeny v tabulce č. 9.

Příčinou inter- a itraindividuální variability v aktivitě CYP je působení různých exogenních inhibitorů a induktorů. Aktivitu CYP ovlivňuje i aktivita endogenních faktorů, jako je vliv hormonů, pohlaví, věk, nemoci a genový

polymorfismus. Vliv alel na metabolismus léčiv byl důkladně prostudován u CYP2D6, CYP2C19 a CYP2C9 (Zanger a spol., 2008).

Ke zjištění fenotypu CYP2D6 sloužily léčiva debrisochin, dextrometorfan a spartein pomocí sledování koncentrací parentní látky a jejího metabolitu vyloučeného močí. Test byl proveden na různých pacientech. Bylo zjištěno, že pomalí metabolizátoři mají obě alely genu pro CYP2D6 defektní, zatímco ultrarychlí metabolizátoři mají vyšší počet funkčních alel (Ingelman-Sundberg, 2005). U pomalých metabolizátorů vlivem pomalého odbourávání na neúčinné metabolity může dojít k nežádoucím až toxickým účinkům. U rychlých, vlivem genového polymorfismu, dochází k zvýšené aktivitě daného genu a léčivo je rychle inaktivováno na neúčinný metabolit. V organismu se pak nachází subterapeutické koncentrace. Dalšími ovlivnitelnými CYP kvůli genovému polymorfismu jsou nesteroidní antirevmatika CYP2C9m inhibitory protonové pumpy či klopidogrel CYP2C19, kodein, některá antidepresiva, antipsychotika CYP2D6 a betablokátory (Zanger, 2008).

| <b>Enzym</b>  | <b>Substrát</b> | <b>Induktor</b>          | <b>Klinický projev/opatření</b>          | <b>Alternativní lék</b>                           |
|---------------|-----------------|--------------------------|--|---|
| <b>CYP3A4</b> | Karbamazepin    | Rifampicin               | Subterapeutická hladina<br>TDM           | -----   |
| <b>CYP3A4</b> | Cyklosporin     | Carbamezepin<br>Fenytoin | Subterapeutická hladina<br>TDM           | Gabapentin<br>Lamotrigin<br>Topiramát<br>Valproat |
| <b>CYP3A4</b> | Intrakonazol    | Rifampicin               | Subterapeutická hladina<br>Zvýšení dávky | Flukonazol  |
| <b>CYP2D6</b> | Mexiletin       | Rifampicin               | Subterapeutická hladina                  | -----   |
| <b>CYP2D6</b> | Propranolol     | Rifampicin               | Poddávkování pacienta<br>Monitoring      | Jiné<br>betablokátory                             |

|               |            |  |  |   |
|---------------|------------|--|--|---|
|               |            |  | krevního tlaku   |   |
| <b>CYP1A2</b> | Teofylin   | Rifampicin<br>Kouření                    | Zvýšení<br>dávkování<br>teofylinu<br>Indukce<br>kouřením –<br>měsíce | -----   |
| <b>CYP2C9</b> | S-warfarin | Karbamazepin<br>Fenobarbitol<br>Fenytoin | Nedostatečné<br>potlačení<br>srážlivost krve<br>Monitoring INR       | Gabapentin<br>Lamotrigin<br>Topiramát<br>Valproat |

Tabulka č. 10 Lékové interakce založené na indukci CYP (Michalets, 1998).

## 6. Metabolismu léčiv v nádorové tkáni

Rakovinové buňky jsou často odolné vůči velkému množství strukturně

různorodých protirakovinových léčiv. Tento typ rezistence vůči více léčivům může být způsoben několika různými mechanismy, včetně přítomnosti transportérů léků, které zabraňují protinádorovým léčivům dosáhnout cílových intracelulárních koncentrací.

### 6.1 CYP a rakovina

Enzymy CYP jsou klíčovými hráči v metabolismu léků a jiných xenobiotik závislých na fázi I, většinou katalyzující oxidace substrátu, ale občas i redukční reakce. V důsledku metabolismu závislého na CYP jsou meziproducty, které často vykazují toxicitu nebo karcinogenitu, ale jsou také cílem konjugačních reakcí závislých na enzymové fázi II. Tím se stávají neaktivními polárními

## 6.2 Funkce CYP v nádorové tkáni

### 6.2.1 CYP1A

Zástupci podskupiny CYP1A se významně podílejí na biotransformaci xenobiotik u člověka, kdy katalyzují podobné reakce.

Tato podskupina má ze 70% shodnou aminokyselinovou sekvenci. CYP1A1 souvisí s dispozicemi pro vznik rakoviny plic. Zvýšená aktivita této formy ovlivňuje výskyt nádorů nejen u plic, ale i prsu a kůže.

Je tomu tak i v případě přítomnosti CYP1A2, u kterého je možné riziko vzniku rakoviny, konkrétně nádorů močového měchýře a kolorektálních nádorů. Na katalytickou aktivitu má vliv pohlaví, věk, těhotenství, kouření a řada inhibitorů a induktorů. U kavkazské populace můžeme jedince rozdělit na metabolizátory (12%), středně rychlé (51-67%) a rychlé metabolizátory (20-37%). U japonské populace jsou pouze pomalí (14%) a rychlí metabolizátoři. Vzhledem k tomu bylo popsáno 13 mutací této formy. U 68% rychlých metabolizátorů byla tato mutace pojmenována CYP1A2\*1F. U příčiny pomalé metabolizace jsou mutace pojmenovány CYP1A2\*7, CYP1A2\*11, CYP1A2\*1C a CYP1A2\*1K (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

| <b>Substráty</b> | <b>Antidepresiva</b>                                   | <b>Antipsychotika</b>                | <b>Ostatní látky</b>   |
|------------------|--|--------------------------------------|--|
| <b>CYP1A</b>     | amirtritylin<br>fluvoxamin<br>klomoprain<br>mitrazapin | haloperidol<br>klozapin<br>olanzapin | kofein<br>dakarbazin<br>fenacetin<br>flutamid<br>grepafloxacin<br>mexiletin<br>ondansetron<br>pentoxyfyllin<br>propranolol<br>takrin |

|                   |   |  |   |
|-------------------|---|--|---|
|                   |   |  | teofylin<br>tozemifen<br>verapamil<br>warfarin  |
| <b>Inhibitory</b> | <b>Antidepresiva</b><br>fluvoxamin  | <b>Chemoterapeutika</b><br>ciprofloxacín<br>enoacín<br>grefloxacín<br>norfloxacín<br>ofloxacín<br>sparfloxacín | <b>Ostatní látky</b><br>anastozol<br>cimetidin<br>flutamid<br>grapefruitová<br>šťáva<br>lidokain<br>mexiletin<br>propafenon<br>ranitidin<br>rifampin<br>takrin<br>tokainid<br>zafirlukast |
| <b>Induktory</b>  | <b>Léčiva</b><br>griseofulvin<br>kofein<br>karbamazepin<br>Lansoprazol<br>omeprazol<br>rifambin | <b>Jídlo</b><br>brokolice<br>hlávkové zelí<br>růžičková kapusta<br>květák                                      | <b>Ostatní látky</b><br>cigaretový kouř   |

Tabulka č. 11 Léčiva, která fungují jako substráty, induktory nebo inhibitory CYP1A (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Guengerich, 1998; Lewis a spol., 2005).

## 6.2.2 CYP2E

Můžeme definovat pouze jednu formu a to CYP2E1, která je zodpovědná na biotransformaci jiných xenobiotik, kterými jsou většinou neutrální, hydrofilní a malé molekuly. Patří mezi ně acetaminofen, halogenová anestetika, aceton,

benzen, styren a izoniazid. Chronické užívání ethanolu vede k indukci této formy. Při zvýšené metabolické aktivitě u chronických alkoholiků je rychlejší biotransformace léčiv. Tato forma zodpovídá za tvorbu hepatotoxických metabolitů. Při indukci tedy dochází k zvýšené tvorbě organismus ohrožujících metabolitů. Lidé, kteří pravidelně pijí alkohol mají až trojnásobný jaterní obsah CYP2E1.

U těžkých alkoholiků dochází k poklesu aktivity všech forem CYP včetně CYP2E1. Zvýšená aktivita tohoto enzymu může tedy vést k řadě patologických stavů. Zvýšené riziko vzniku rakoviny v tlustém střevě, plicích, nosohltanu a játrech. Výzkum je však spjat převážně s výskytem nádoru plic. Studie proběhly u kavkazské, japonské a mexické populace a dělí metabolizátory na pomalé, rychlé a ultrarychlé. Pokud je přítomná varianta alel CYP2E1\*1C, je u pacientů 14násobně zvýšeno riziko nádorového onemocnění. Nejčastější mutace jsou CYP2E1\*5 a CYP2E1\*6. Nejčastější výskyt je u alely CYP2E1\*6, která se vyskytuje u 26% asijské populace a 10% kavkazské populace (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

| <b>Substráty<br/>CYP2E1</b> | <b>Celková<br/>anestetika</b>                                      | <b>Ostatní<br/>látky</b>   |
|-----------------------------|--|--|
|                             | enfluran<br>halotan<br>isofluran                                   | acetaminofen<br>anilin<br>benzen<br><i>chlorsoxazon</i><br>dakarbazin<br>etanol<br>verapamil |
| <b>Inhibitory</b>           | chlormethiazol<br>deithylkarbamát<br>disulfiran<br>řeřicha potoční |  |
| <b>Induktory</b>            | ethanol<br>izoniazid   |  |



|  |  |  |
|--|--|--|
|  | derivát<br>kys.retinové<br>hladovění<br>diabetes |  |
|--|--|--|

Tabulka č. 12 Léčiva, která fungují jako substráty, induktory a inhibitory CYP2E1 (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Guengerich, 1998; Lewis a spol., 2005).

| CYP      | Markery metabolické aktivity                                     | Enzymatická reakce   |
|----------|--|--|
| CYP2A6   | S-mefenytin  | S-mefenytin N-demetyláza   |
| CYP2B6   | Taxol  | taxol 6-hydroxyláza  |
| CYP2C8/9 | Tobutamid<br>Diklofenak  | tolbutamid 4-hydroxyláza<br>diklofenak 4-hydroxyláza   |
| CYP2C19  | S-mefenytin  | S-mefenytin 4'-hydroxyláza   |
| CYP2D6   | Bufuralol<br>Debrisočin<br>Dextrometorfan                        | bufuralol 1'-hydroxyláza<br>debrisočin 4-hydroxyláza<br>dextrometorfan O-demetyláza  |
| CYP2E1   | Chlorsoxazon   | chlorsoxazon 6-demetyláza  |
| CYP3A    | Kortizol<br>Midazolam<br>Testosteron<br>Erytromycin<br>Nifedipin | kortizol 6 $\beta$ -hydroxyláza<br>midazolam 1'-hydroxyláza<br>testosteron 6 $\beta$ -hydroxyláza<br>erytromycin N-demetyláza<br>nifedipin oxidáza |

Tabulka č. 13 Nejvýznamnější markery izoenzymů CYP (Edwards a spol., 1997).

### 6.2.2.1 Chlorazoxan

Chlorazoxan, marker metabolické aktivity CYP2E1, je lék, který se používá k léčbě svalové křeče. Působí na míchu depresivními reflexemi. Kombinace s jinými léčivy může vést k možným nežádoucím účinkům, jako je

zvracení, dysfunkce jater. Při použití s acetaminofenem je zvýšené riziko hepatotoxicity (Hamilton, 2015).

CYP2E1 je schopný katalyzovat 6-hydroxylaci chlorzoxazonu. Jeho aktivita je korelována s aktivitou 4-nitrofenol-2-hydroxylázou. Imunodetekuje CYP2E1 ve 14 vzorcích lidských jater. Katalytická aktivita nebyla u jiných CYP prokázána. Diethyldithiokarbamát (DEDTC) je specifický inhibitor CYP2E1. Byl schopen snížit aktivitu chlorzoxazon 6-hydroxylázy o cca 92% (Lucas a spol. 1999).

## **6.3 Experimentální průkazy funkce CYP v nádorové tkáni**

### **6.3.1 Rakovina tlustého střeva**

Enzym CYP2W1 se nachází ve fetálním tlustém střevě. Můžeme ho detekovat i u kolorektálního karcinomu, ale ne v transformované tkáni. Vysoká exprese CYP2W1 vede k horší prognóze.

Experimentální pokus byl proveden pomocí imunohistochemické detekce CYP2W1 u 235 maligních nádorů tlustého střeva ve stádiu I a II za použití polyklonální protilátky. Nejvyšší stupeň zahrnující více než 5% plochy nádoru na každém snímku byl použit pro klasifikaci exprese CYP2W1. Bylo zjištěno, že v 30% nádorů, byl CYP2W1 exprimován ve vysokých hladinách. V celé skupině karcinomu tlustého střeva byl nezávislým prognostickým faktorem v multivariační analýze, kde vysoká hladina exprese souvisela s horším výsledkem. Exprese CYP2W1 byla nezávislým prognostickým faktorem u pacientů s III. stupněm rakoviny tlustého střeva, ne však pro pacienty s II. stupněm rakoviny. Ve dvou plátcích střeva byla nalezena stejná exprese CYP2W1. Vzhledem k tomu, že bylo prokázáno, že enzym CYP2W1 katalyticky aktivuje sloučeniny na cytotoxické produkty, mohl by být použit jako nová léčivá forma pro léčbu rakoviny tlustého střeva (Stenstedt a spol., 2012).

### 6.3.2 Rabdomyosarkomen u dětí

Studie popisuje srovnání mRNA vzorků sedmi reprezentativních CYP v párovém nádoru a normální tkáni u dětských pacientů s rabdomyosarkomem (RMS), což je zhoubný nádor kosterní svaloviny. Při použití kvalitní RT-PCR v reálném čase byl vzor genové exprese CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2E1, CYP2W1, CYP3A4 a CYP3A5 byl analyzován u nádorů a u nenádorových tkání od 13 dětí s RMS. Koncentrace CYP byla stanovena za použití Western blotu. Hladiny exprese CYP1A1 a CYP1A2 byly zanedbatelné. Zvýšená exprese mRNA a proteinu CYP1B1 byla detekována u většiny RMS nádorů. Většina rakovinových vzorků vykazuje vyšší hladiny CYP3A4 a CYP3A5 oproti normálním vzorkům tkáně. Expres mRNA CYP2E1 je výrazně vyšší u nádorové tkáně, nebyl však zjištěn žádný vztah proteinů. CYP2W1 je exprimován hlavně v nádorech.

Výrazná exprese CYP2W1, CYP3A4 a CYP3A5 v nádorových tkáním naznačuje, že mohou být zapojeny do chemoresistance RMS. Dále mohou být využity pro lokalizovanou aktivaci protirakovinných proléčiv (Molina-Ortiz, a spol., 2014).

### 6.3.3 Rakovina prsu

Expres genů CYP1B1, CYP2C9, CYP2E1 a CYP3A4 u pacientů s rakovinou prsu byla kvalifikována pomocí PCR v reálném čase. Analýzy byly provedeny u 40 sad lidských nádorů prsu, sousedních nádorových tkání a 18 vzorků lymfocitů periferní krve. Úrovně exprese CYP2C9 a CYP3A4 jsou zanedbatelné. Expres CYP1B1 je v průměru 50krát vyšší než exprese CYP2E1. Byla zjištěna korelace exprese CYP1B1 u lymfocytů s expresí v nádorových tkáních, výrazně vyšší exprese CYP2E1 byla spojena s invazivním lobulárním typem nádorů v pokročilém stádiu, tak s nádorovou tkání pacientů s negativním progesteronovým receptorem.

Potenciální roli jako marker pro prognózu rakoviny prsu má exprese CYP2E1. Vysoká exprese CYP1B1 v nádorových buňkách může vyvolat změny reakcí na léky, které jsou substráty CYP1B1 a ovlivnit tak metabolismus nebo aktivaci kardinogenů životního prostředí (Vaclavikova a spol., 2007).

### 6.3.4 Karcinomy epitelálních buněk

Nově objeveným členem CYP indukovatelným dioxinem je CYP2S1. Jeho podíl na metabolismu je prokázán u některých aromatických uhlovodíků, kyseliny retinové, což znamená, že se účastní na biotransformaci exogenních tak endogenních sloučenin. Vysoké hladiny CYP2S1 jsou pozorovatelné v epitelálních buňkách, zejména těch, které jsou často vystaveny xenobiotikům. V dýchacím traktu ho můžeme najít v epitelech nosní dutiny, průduškách, bronchiolích. Silná exprese epitelu byla pozorována u děložního čípku, močového měchýře a kůže. V exokrinních žlázách – Pankreas – vykazovaly buňky mírné až silné hladiny exprese. V neposlední řadě byla silná exprese pozorována v epitelových buňkách celého gastrointestinálního traktu.

Expresce CYP2S1 se liší v různých nádorech od nedetekovatelných až po silné. Vysoké hladiny exprese byly pozorovány v jednom ze dvou případů studovaných karcinomů plicních skvamózních buněk, druhý vzorek vykazoval pouze slabé nebo nedetekovatelné hladiny exprese. Silná exprese byla také pozorována u karcinomu dlaždicových buněk děložního čípku, stejně jako v dvou případech zjištěných nádorů na vaječnicích – metastatický adenokarcinom a mucinózní cystadenokarcinom (Saarikoksi a spol., 2005).

### 6.3.5 Hepatocelulární karcinom

Při studiu stanovení aktivity a exprese CYP u pacientů s hepatocelulárním karcinomem (HCC) byla sledována činnost 7mi enzymů CYP – CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4. Prekarcinomatózní tkáň a nádory získané od 26 pacientů s hepatitidou B a pozitivním HCC byly stanoveny pomocí substrátů sond. Maximální metabolická rychlost substrátů

CYP sond byla snížena o 2,5-30násobek v nádorových mikrozomech, což bylo doprovázeno i odpovídajícím poklesem hladin exprese proteinů a mRNA. Byl výrazně snížen stupeň korelace exprese CYP v nádorových tkáních, což naznačuje, že hladiny exprese CYP jsou značně narušeny tumorogenním procesem. Systémová studie prokazuje, že vlivem HCC na CYP byla aktivita CYP vážně narušena a jejich expresní vzorce změněny. Stanovení exprese CYP je slibným přístupem, který lze klinicky použít pro individuální léčbu HCC (Yan a spol., 2015).

## 7. Závěr

Díky vývoji léčiv v posledních desetiletích se snaží mnoho laboratoří produkovat co nejvíce nových léčiv. Jejich interakce ve spojení s jinými léčivy a jednotlivými CYP přítomnými v játrech, ledvinách, mozku a jiných tkáních, může způsobit nežádoucí účinky. Tato práce poukazuje na možná rizika ve spojení více léčiv jak při běžné diagnóze, tak při nádorových onemocněních.

Cílem všech CYP je přeměnit léčivo na takové metabolity, aby se stali co nejvíc polárními, rozpustnými ve vodě, a mohli tak být snadno vyloučeni z těla ven. Existují výjimky, kdy může metabolismus produkovat více škodlivých látek, než jsou jeho původní sloučeniny.

Nejdůležitější studie je při léčbě onkologických onemocnění. Mnoho léků je inaktivováno pomocí CYP, některá proléčiva jsou aktivována CYP, ty se stávají cytotoxickými a účinnými při léčbě chemoterapiemi. Hrají významnou roli při léčbě rakoviny, díky jejich účasti na aktivaci a inaktivaci protirakovinových léčiv, tak inaktivaci karcinogenů.

Tyto děje jsou převážně v játrech, kde se většina CYP nachází. V současné době je objeveno 57 lidských CYP. Mutace genu CYP může způsobit nepřítomnost enzymu, sníženou expresi, změnit substrátovou specifitu nebo zvýšit expresi enzymu.

Defekty alel jsou zkoumány hlavně u CYP3A4 a CYP1B1. Mezi nejvýznamnější CYP zkoumajících v nádorové tkáni je podskupina CYP1A a CYP2E1. V minulosti byly prováděny stovky studií zaměřených na nalezení genetických variant, které by mohly predisponovat k některým typům rakoviny, které však nevedli k jasným závěrům.

Vzhledem k tomu, že studie vlivu inhibitorů na metabolismus léčiv by v budoucnu mohla vést k vynalezení nových cytostatik a látek při léčbě rakoviny, je vhodné sledovat biotransformace enzymů a CYP, studovat jejich metabolické přeměny v organismu a zhodnotit míru rizika při podání cytokinových derivátů s ostatními léky.

## 8. Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1. Katalytický cyklus CYP (Anzenbacher a Zanger, 2012).

Obrázek 2. Příklady biotransformačních reakcí a) S-oxygenace omeprazoli, b) hydroxylace kumarinu, c) N-dealkylace kofeinu, d) epoxidace karbazepinu (Parkinson, 2005).

Obrázek 3. Dva pohledy krystalové struktury lidského CYP1A2 (Anzenbacher a Zanger, 2012).

Obrázek 4. Struktura hemu v CYP; S<sup>-</sup> tvořící pátý ligand vázající se na hemové železo pocházející z cysteinu (Guengerich a Johnson, 1997).

Obrázek 5. Generalizovaný mechanismus indukce CYP zvýšenou transkripcí, L – ligand; R – receptor; heterodimerová složka pro vazbu receptoru R; koaktivační protein; RNA polymeráza (Anzenbacher a Zanger, 2012).

Tabulka č. 1 Nejdůležitější CYP v metabolismu léčiv, jejich tkáňová lokalizace, příklady substrátů jednotlivých CYP (dle Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

Tabulka č. 2 Množství CYP ve vybraných lidských tkáních (Hrysay a Bandiera, 2008).

Tabulka č. 3 Rozdělení nedůležitějších lidských CYP dle typu jejich substrátu (Guengerich, 1995).

Tabulka č. 4 UDT podílející se na biotransformaci léčiv – jejich lokalizace v tkáni a nejvýznamnější substráty (Cheng a spol., 1998; Tukey a Strassburg 2000; Fisher a spol., 2001; Kiang a spol., 2005).

Tabulka č. 5 Nejvýznamnější SULT podílející se na biotransformaci xenobiotik (Adjei a spol., 2008; Yasuda a spol., 2005; Yasuda a spol., 2007, Hempel a

spol., 2007; Thomas a Coughtrie, 2003; Morgan a spol, 1986; Riches a spol., 2009; Senggunprai a spol., 2009).

Tabulka č. 6 Nežádoucí interakce léčiv na základě interakce farmakologických léčiv (Michalets a Williams, 2000).

Tabulka č. 7 Příklady inhibitorů jednotlivých CYP.

Tabulka č. 8 Klinicky významné interakce založené na inhibici CYP (Michalets, 1998; Kousalová a spol., 2003).

Tabulka č. 9 Indukce jednotlivých CYP, jejich receptory a induktory.

Tabulka č. 10 Lékové interakce založené na indukci CYP (Michalets, 1998).

Tabulka č. 11 Léčiva, která fungují jako substráty, induktory nebo inhibitory CYP1A (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Guengerich, 1998; Lewis a spol., 2005).

Tabulka č. 12 Léčiva, která fungují jako substráty, induktory a inhibitory CYP2E1 (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Guengerich, 1998; Lewis a spol., 2005).

Tabulka č. 13 Nejvýznamnější markery izoenzymů CYP (Edwaeds a spol., 1997).



## 9. Literatura

Arpiainen, S., Raffalli-Mathieu, F., Lang, M.A.. (2005) *Regulation of the Cyp2a5 gene involves an aryl hydrocarbon receptor-dependent pathway.* Mol Pharmacol 67:1325– 1333.

Anzenbacher, P., Zanger, U.. (2012) *Metabolism od Drugs and Other Xenobiotics.*

Back, D.J., Houlgrave, R., Tjia, J.F.. (1991) *Effect of progestogens, gestodene, 3-keto desogestrel, levonorgestrel, norethisterone and norgestimate on the oxidation of ethinyloestradiol and other substrates by human liver microsomes.* J Steroid Biochem Mol Biol 38: 219-225.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.. (2002) *Biochemistry*, 5.vydání, W.H. Freeman and Company, New York.

Bjeldanes, L.F., Kim, J.Y., Grose, K.R.. (1991) *Aromatic hydrocarbon responsivenessreceptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.* Proc Natl Acad Sci USA 88:9543–9547.

Bertz, R.J., Granneman, G.R.. (1997) *Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions.* Clin Pharmacokinet 32:210- 258.

Carroccio, A., Wu, D., Cederbaum, Al.. (1994) *Ethanol increases content and activity of human cytochrome P4502E1 in a transduced HepG2 cell line.* Biochem Biophys Res Commun 203:727–733.

Cederbaum, Al.. (2006) *CYP2E1—biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury.* Mt Sinai J Med 73:657–672

Cottam, H.B., Wasson, D.B., Shih, H.C., Raychaudhuri, A., Di Pasquale, G., Carson, D.A.. (1993) *New adenosine kinase inhibitors with oral*

*antiinflammatory activity: synthesis and biological evaluation.* J Med Chem 36:3424-30.

Dolwick, K.M., Schmidt, J.V., Carver, L.A.. (1993) *Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA.* Mol Pharmacol 44:911–917.

Evans, W.E., Relling, M.V.. (1999) *Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics.* Science 286:487-491.

Falany, C.N., Kerl, E.A.. (1990) *Sulfation of minoxidil by human liver phenol sulfotransferase.* Biochem Pharmacol 40: 1027-1032.

Fisher, M.B., Paine, M.F., Strelevitz, T.J., Wrighton, S.A.. (2001) *The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism.* Drug Metab Rev 33:273-297

Glatt, H.. (1997) *Sulfation and sulfotransferases 4: bioactivation of mutagens via sulfation.* The FASEB Journal 11: 314-321.

Glatt, H.R. (2001) *Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics.* Chem Biol Interact 129: 141-170.

Guengerich, F.P.. (1990) *Mechanism-based inactivation of human liver microsomal cytochrome P-450 IIIA4 by gestodene.* Chem Res Toxicol 3: 363-371.

Guengerich, F.P.. (1995) *Human cytochrome P450 enzymes. V: Cytochrome P450: Structure, Mechanisms and Biochemistry,* 473–535, Ortiz de Montellano PR (ed.), Plenum, New York.

Guengerich, F.P., Johnson, W.W.. (1997) *Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase: rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems.* Biochemistry 36:14741–14750.

Guengerich, F.P., MacDonald, T.L.. (1990): *Mechanisms of cytochromes P-450 catalysis unified*. *Faseb journal* 4:2453-9.

Guillemette, C.. (2003) *Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes*. *Pharmacogenomics* 3: 136-158.

Hamilton, R. (2015) *Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2015 Deluxe Lab-Coat Edition*. Jones & Bartlett Learning. p. 1.

Hasler, J.A., Estabrook, R., Murray M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, C., Falck, J.R., Farrell, G., Kaminsky, L.S., Spivack, S.D., Boitier, E., Beaune, P.. (1999) *Human cytochromes P450*. *Molecular Aspects of Medicine*, 20(1-2):1-137.

Hollenberg, P.F.. (2002) *Characteristics and common properties of inhibitors, inducers and activators of CYP enzymes*. *Drug Metab Rev* 34: 17-35.

Chang, T.K., Waxman, D.J.. (2006) *Synthetic drugs and natural products as modulators of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR)*. *Drug Metab Rev* 38:51–73.

Cheng, Z., Radomska-Pandya, A., Tephly, T.R.. (1998) *Cloning and expression of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A8*. *Arch Biochem Biophys* 356:301- 305.

Ingelman-Sundberg, M.. (2005) *Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity*. *Pharmacogenomics* 5:6-13.

Isin, E.M., Guengerich, F.P.. (2007): *Complex reactions catalyzed by cytochrom P450 enzymes*. *Biochemica et Biophysica Acta* 1770: 314-329.

- Kawajiri, K., Fujii-Kuriyama, Y.. (2007) *Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor*. Arch Biochem Biophys 464:207–212
- Kiang, T.K., Ensom, M.H., Chang, T.K.. (2005) *UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions*. Pharmacol Ther 106(1):97-132.
- Kohno, Y., Sei, Y., Koshihara, M., Kim, H.O., Jacobson, K.A.. (1996) *Induction of apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by adenosine A(3) receptor agonists*. Biochem Biophys Res Commun 219:904-10.
- Kousalová, L., Baranová, J., Anzenbacher, P.. (2003) *Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – Část I. Interakce na úrovni CYP3A4*. Klin Farmakol Farma, 17:151-157.
- Krejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T.. (2000) *Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace*. Chem. Listy 94:913-918.
- Krystof, V., Lenobel, R., Havlicek, L., Kuzma, M., Strnad, M.. (2002) *Synthesis and biological activity of olomoucine II*. Bioorg Med Chem Lett 12:3283-3286.
- Krystof V, McNae IW, Walkinshaw MD, Fischer PM, Müller P, Vojtesek B, Orság M, Havlíček L, Strnad M. (2005) *Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor*. Cell Mol Life Sci 62:1763-71.
- Kunze, K.L., Trager, W.F.. (1993) *Isoform-selective mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 1A2 by furafylline*. Chem Res Toxicol 6:649-656.
- Lin, J.H., Lu, A.Y.. (1998) *Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications*. Clin Pharmacokinet 35: 361-390.

- Lindsay, J., Wang, L.L., Li, Y., Zhou, S.F.. (2008) *Structure, function and polymorphism of human cytosolic sulfotransferases*. *Curr Drug Metab* 9(2):99-105.
- Lucas, D., Ferrara, R., Gonzalez, E., Bodenez, P., Albores, A., Manno, M., Berthou, F.. (1999) *Chlorzoxazone, a selective probe for phenotyping CYP2E1 in humans*. *Pharmacogenetics* 9(3):377-388.
- Michalets, E.L., Williams, C.R.. (2000) *Drug interactions with cisapride: clinical implications*. *Clin Pharmacokinet* 39(1):49-75.
- Miki, Y., Suzuki, T., Tazawa, C.. (2005) *Steroid and xenobiotic receptor (SXR), cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance gene 1 in human adult and fetal tissues*. *Mol Cell Endocrinol* 231:75–85.
- Molina-Ortiz, D., Camacho-Carranza, R., González-Zamora, J.F., Shalkow-Kalincevstein, J., Cárdenas-Cardós, R., Ností-Palacios, R., Vences-Mejía, A.. (2014) *Differential Expression of Cytochrome P450 Enzymes in Normal and Tumor Tissues from Childhood Rhabdomyosarcoma*. *PLoS ONE* 9(4):e93261. Doi:10.1371/journal.pone.0093261.
- Munzel, P.A., Schmohl, S., Heel, H., Kalberer, K., Bock-Hennig, B.S., Bock, K.W.. (1999) *Induction of human UDP-glucuronosyltransferases (UGT1A6, UGT1A9 and UGT2B7) by t-butylhydroquinone and 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Caco-2 cells*. *Drug Metab Dispos* 27: 569-573.
- Nekvindová, J., Mašek, V., Veinlichová, A., Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P., Zídek, Z., Holý, A.. (2006) *Inhibition of human liver microsomal cytochrome P450 activities by adefovir and tenofovir*. *Xenobiotica* 36:1165-1177.
- Nguyen, L.P., Bradfield, C.A.. (2008) *The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor*. *Chem Res Toxicol* 21:102–116.

Nishimura, M., Naito, S., Yokoi, T.. (2004) *Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies*. Drug Metab Pharmacokinet 19:135–149.

Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., Raunio, H.. (2008) *Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status*. Arch Toxicol 82:667-715.

Plant. N.. (2007) *The human cytochrome P450 sub-family: transcriptional regulation, inter-individual variation and interaction networks*. Biochim Biophys Acta 1770:478– 488.

Poulos, T.L., Johnson, E.F.. (2005) P.R. Ortiz de Montellano, *Cytochrome P450*, Springer US, New York, NY.

Riches, Z., Stanley, E.L., Bloomer, J.C., Coughtrie, M.W.H.. (2009) *Quantitative evaluation of the expression and activity of five major sulfotransferases (SULTs) in human tissues: the SULT „Pie“*. Methods Mol Biol 640:309-26.

Ritter, J.K.. (2000) *Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions*. Chem Biol Interact 129(1-2):171-93.

Rivera, S.P., Saarikoski, S.T., Hankinson, O.. (2002) *Identification of a novel dioxininducible cytochrome P450*. Mol Pharmacol 61:255–259.

Rodriguez-Antona, C., Ingelman-Sundberg, M.. (2006) *Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer*, Oncogene:1679-1691.

Saarikoski, S.T., Wikman, H.A.-L., Smith, G., Henrich, C., Wolff, J., Husgafvel-Pursiainen, K.. (2005) *Localization of Cytochrome P450 CYP2S1 Expression in Human Tissues by In Situ Hybridization and Immunohistochemistry*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Volume 53(5):549-556.

Sabolovic, N., Magdalou, J., Netter, P., Abid, A.. (2000) *Nonsteroidal anti – inflammatory drugs and phenols glucuronidation in Caco-2 cells: identification of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6, UGT1A3 and 2B7*. Life Sci 67: 185-196.

- Sesardic, D., Pasanen, M., Pelkonen, O.. (1990) *Differential expression and regulativ of members of the cytochrome P450IA gene subfamily in human tissues*. *Carcinogenesis* 11: 1183-1188.
- Soars, M.G., Petullo, Dm., Eckstein, J.A., Kasper, S.C., Wrighton, S.A.. (2004) *An assessment of UDP-glucuronosyltransferase induction using primary human hepatocytes*. *Drug Metab Dispos* 32: 140-148.
- Song, B.J., Veech, R.L., Park, S.S.. (1989) *Induction of rat hepatic Nnitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilization*. *J Biol Chem* 264:3568–3572.
- Stenstedt, K., Hallstrom, M., Johansson, I., Ingelman-Sundberg, M., Ragnhammar, P., Edler, D.. (2012) *The Expression od CYP2W1: A Prognostic Marker in Colon Cancer*. *International Journal of Cancer Research and Treatment*, vol.32:2869-3874.
- Stern, J.O. and J. Peisach. (1974) *Model Compound Study of Co-Adduct of Cytochrome-P-450*. *Journal of Biological Chemistry*, 249(23):7495-7498.
- Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. (1999) *Význam cytochromu P450 pro lidské zdraví*. *Chem. Listy* 93:229-237.
- Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, Jr., Martínek, V., Páca, J.. (2004) *Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí*. *Chem. Listy* 98, 876-890.
- Sugatani, J., Yamakawa, K., Tonda, E., Nishitani, S., Yoshinari, K., Degawa, M.. (2004) *The induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 mediated through a distal enhancer module by flavonoids and xenobiotics*. *Biochem Pharmacol* 67: 989-1000.
- Timsit, Y.E., Negishi, M.. (2007) *CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors*. *Steroids* 72:231–246.
- Tukey, R.H., Strassburg, C.P.. (2000) *Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:581-616.

Vaclavikova, R., Hubackova, M., Stribrna-Sarmanova, J., Kodet, R., Mrhalova, M. Novotny, J., Gut, I., Soucek, P.. (2007) *RNA Expression of Cytochrome P450 in Breast Cancer Patients*. *Anticancer Research* 27:4443-4450.

Veinlichova, A., Jancova, P., Siller, M., Anzenbacher, P., Kuca, K., Jun, D., Fusek, J., Anzenbacherova, E.. (2009) *Effect of acetylcholinesterase oxime-type reactivators K- 48 and HI-6 on human liver microsomal cytochromes P450 in vitro*. *Chem Biol Interact* 180(3):449-53.

Williams, P.A. , Cosme, J., Ward, A., Angova, H.C., Vinkovic, D.M., Jhoti, H., (2003) *Nature* 424, 464.

Yan, T., Lu, L., Xie, C., Chen, J., Peng, X., Zhu, L., Wang, Y., Li, G., Zhou, F., Hu, M., Liu, Z.. (2015) *Severely Impaired and Dysregulated Cytochrome P450 Expression and Activities in Hepatocellular Carcinoma: Implications for Personalized Treatment in Patients*. *Mol Cancer Ther*; 14(12).

Zhang, H., Varlamova, O., Vargas, F.M., Falany, C.N., Leyh, T.S.. (1998) *Sulfuryltransfer: the catalytic mechanism of human estrogen sulfotransferase*. *J Biol Chem* 273:10888-10892.