



V Olomouci 24. ledna 2020

**Zápis o konání obhajoby disertační práce ve studijním programu Lékařská
farmakologie**

Mgr. Alena Špičáková, DiS. vědecká pracovnice Ústavu farmakologie LF UP a FNOL, studentka kombinované formy doktorského studijního programu *Lékařská farmakologie* LF UP v Olomouci.

Téma disertační práce: „**Interakce enzymů metabolismu léčiv, zejména cytochromů P450, s biologicky aktivními látkami vč. nutraceutik**“

Obhajoba se konala v Olomouci 24. ledna 2020 v 10:00 hodin.

Komise:

předseda: doc. MUDr. Karel Urbánek, Ph.D.přítomen.....

místopředseda: prof. MUDr. Rostislav Večeřa, Ph.D.přítomen.....

členové: prof. MUDr. Ondřej Slanař, Ph.D.....nepřítomen.....

prof. MUDr. Stanislav Mičuda, Ph.D.....přítomen.....

doc. RNDr. Eva Kmoníčková, CSc.....přítomna.....

prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.....přítomen.....

doc. Mgr. Jan Juřica, Ph.D.....přítomen.....

prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.....přítomen.....

prof. MUDr. Jaroslav Opavský, CSc.....přítomen.....

doc. RNDr. Peter Ondra, CSc.....přítomen.....

Oponenti: prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.přítomen.....

Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty UK v Praze

doc. PharmDr. Jan Juřica, Ph.D.....přítomen.....

Farmakologický ústav Lékařské fakulty MU v Brně

Školitel: prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.přítomen.....

Předsedající přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele. Poté uchazeč vyložil podstatný obsah své disertace. Oponenti přednesli své posudky. Uchazeč odpověděl na připomínky a dotazy oponentů. Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

Hlasování se účastnilo ...9..... členů komise. Kladně hlasovalo ...9..... členů, záporně ...0..... členů, neplatných lístků bylo odevzdáno0.....

Usnesení:

Přítomní členové komise tajným hlasováním rozhodli, že **Mgr. Alena Špičáková** obhájila/~~neobhájila~~* disertační práci a doporučili/~~nedoporučili~~* udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

.....
doc. MUDr. Karel Urbánek, Ph.D.
předseda komise



Připomínky a otázky oponentů

1. prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Odstavec 4.2.2: ...Program Autodock Vina (Trott & Olson 2010) byl použit pro ukotvení ligandů do mřížky obsahující celou strukturu proteinového modelu CYP3A4 soustředěného na enzymatické centrum blízko kofaktoru hemu.

- Výpočet molekulového modelování nezahrnuje celou molekulu enzymu CYP3A4 (to se provádí pouze v případě, kdy se sleduje interakce celé makromolekuly), nýbrž pomocí mřížky je vymezen prostor aktivního místa (blízko hemového koenzymu) a pouze v tomto vymezeném prostoru probíhá výpočet vazebné energie komplexu enzym/substrát. Tento vymezený prostor obsahuje celou strukturu proteinu v této vybrané oblasti.

Odstavec 4.2.2: ...Krystalová struktura enzymu CYP3A4 (PDBID: 5A1R) byla použita ke konstrukci dokovacích templátů (rozpoznávacích elementů; sekvence aminokyselin) enzymu/proteinu...

- Právě prostřednictvím těchto elementů/AMK dochází k interakci s ligandem.
- Celý proces si lze představit jako „ruku v rukavici“, tato představa dobře vystihuje konformační změny.
- V tomto případě se jedná o rigidní protein a flexibilní ligand(y).

V práci je použito indikačních substrátů pro jednotlivé formy cytochromů P450, které umožňují sledovat jejich aktivitu i ve směsných mikrosomech. Obvykle stačí vědět, že takové substráty jsou metabolizovány výlučně nebo skoro výlučně danou formou. S ohledem na předkládané výsledky resp. jejich interpretaci by však také bylo dobré vědět, zda tyto substráty nemohou ovlivňovat aktivitu jiných forem (např. inhibicí). Jsou taková data známa z literatury?

- 7-ethoxyresorufin CYP1A2 (CYP1A1, CYP1B1)
- Kumarin CYP2A6 (~ 5% CYP2B6)
- 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)kumarin CYP2B6 (~ 10% CYP2E1; 2A6, 2C9/19; ↑ K_M)
- Paclitaxel CYP2C8 (ostatní CYP nereagují)
- Diklofenak CYP2C9 (inh. TST CYP3A4; $IC_{50} \sim 1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; $K_M \sim 50 \times \downarrow$)
- Mephenytoin CYP2C19 (CYP2C8/9/18; 50-100x aktivnější přeměna CYP2C19)
- Bufuralol CYP2D6 (~ 5% CYP2C19; neinhibováno chinidinem)
- Chlorzoxazon CYP2E1 (CYP1A1/2, CYP3A4, CYP2D6; p-nitrofenol)
- Testosteron CYP3A4 (CYP3A5; 10x méně exprimovaná než CYP3A4)
- Midazolam CYP3A4 („gold probe“; ovlivnění jinými formami CYP lze zanedbat)

Literatura (k této otázce):

- Phillips IA, Shephard EA. *Cytochrome P450 protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998, p. 482.
- Burke MD, Thompson S, Weaver RJ, Wolf CR, Mayer RT. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem Pharmacol*. 1994, 48(5):923-36.
- Donato MT, Jiménez N, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos*. 2004, 32(7):699-706.
- Masubuchi Y, Ose A, Horie T. Diclofenac-induced inactivation of CYP3A4 and its stimulation by quinidine. *Drug Metab Dispos*. 2002, 30(10):1143-8.
- Ohyama K, Murayama N, Shimizu M, Yamazaki H. Drug interactions of diclofenac and its oxidative metabolite with human liver microsomal cytochrome P450 1A2-dependent drug oxidation. *Xenobiotica*. 2014, 44(1):10-6.
- Mankowski DC. The role of CYP2C19 in the metabolism of (+/-) bufuralol, the prototypic substrate of CYP2D6. *Drug Metab Dispos*. 1999, 27(9):1024-8.
- Ono S, Hatanaka T, Hotta H, Tsutsui M, Satoh T, Gonzalez FJ. Chlorzoxazone is metabolized by human CYP1A2 as well as by human CYP2E1. *Pharmacogenetics*. 1995 Jun;5(3):143-50.
- Hamaoka N, Oda Y, Hase I, Asada A. Cytochrome P4502B6 and 2C9 do not metabolize midazolam: kinetic analysis and inhibition study with monoclonal antibodies. *Br J Anaesth*. 2001, 86(4):540-4.



Disertantka v textu opakovaně zdůraznila, že použitý výpočet poskytuje hodnoty reakční Gibbsovy energie (ΔG) pro navázání substrátu (ligandu) na „dokovací místo“. Jak byla získána hodnota entropického příspěvku pro tento děj?

- Entropický příspěvek se v tomto případě nezjišťuje zvlášť (o to se snaží metody používající kvantovou mechaniku a molekulové modelování).
- Zde se vychází z empirické skórovací funkce, která odhaduje (skóruje) vazebnou energii komplexu enzym-ligand na základě známých analogií.
- Tento přístup dává příslib lepší korelace výpočtů s experimentem.

Disertantka v textu opakovaně zdůraznila, že použitý výpočet poskytuje hodnoty reakční Gibbsovy energie (ΔG) pro navázání substrátu (ligandu) na „dokovací místo“. Jak byla získána hodnota entropického příspěvku pro tento děj?

- Přesný výpočet je velmi obtížný a nebyl dosud vyřešen.
- Jedná se o co nejlepší přiblížení.
- Pomocí skórovací funkce se zavádějí různé předpoklady a zjednodušení.
- Nezahrnuje se kompletní výčet fyz.-chem. fenoménů, kt. se uplatňují v reálných reakcích.
- Vypočtené hodnoty jsou spíše odhadnutou vazebnou E – jejich skórem, než skutečnou hodnotou.

2. doc. PharmDr. Jan Juřica, Ph.D.

Na základě jakých parametrů přiřazujete jednotlivým látkám typ inhibice? Můžete použít i jiné nástroje pro určení typu inhibice v případě nejasného grafického znázornění?

- Typ inhibice posuzujeme podle výnosů dle Dixona a Lineweavera–Burka v souladu s literaturou.
- Hodnoty K_i pak nalézá program Graph Pad, používá výnosy dle Dixona, Lineweavera–Burka a Eadieho-Scatcharda; výnosy dle Hanese-Woolfa; Woolfa-Augustinssona-Hofsteeho potvrdily smíšený typ inhibice.
- MD by mohlo pomoci odhalit typ inhibice, pokud by se brala v úvahu větší oblast enzymu včetně přístupových kanálů (časová náročnost výpočtu).

Jsou koncentrace v řádu 30-50 $\mu\text{mol/l}$ dosažitelné *in vivo*? Lze dávku použitou na experimentálních zvířatech nějakým způsobem extrapolovat na člověka?

- 150 mg α -humulenu /kg u myší $\rightarrow 25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (70 kg člověka ~ 10 g α -humulenu)
 - $\rightarrow 80 - 300$ g rostliny
- Obsah KAO v marihuaně je 0,12-22% $\rightarrow 1$ g rostliny $\rightarrow 0,2 - 37 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$

Proč se postup preinkubace u různých markerových substrátů liší? Např. u kumarinu a 7-ethoxyresorufinu je od počátku ve směsi substrát a reakce se zahajuje přidávkem NADPH-generujícího systému; u paktitaxelu nebo diklofenaku se však přidává substrát po preinkubaci inhibitoru za přítomnosti NADPH-generujícího systému. Mohly tyto odlišnosti ovlivnit inhibiční vliv testovaných látek, zjištěný resp. typ inhibice?

- Experimenty *in vitro* byly prováděny podle zavedených protokolů dle literatury.
- Inhibiční vliv by neměl být ovlivněn (je poměrně malý a je-li, pak při vysokých hladinách inhibující látky);
- typ inhibice: obecně, mohlo by dojít ke zkreslení v př. time-dependentní inhibice (časově-závislé), NADPH se zde přidává po preinkubaci, aby se oddělil děj, kdy se generuje produkt vážící se na enzym;
- toto se našich případech netýkalo.

Doplňující otázky oponentů při obhajobě

prof. Hudeček



Komentář: Řekla jste, že in vitro metody byly potvrzeny in silico metodou. Já bych spíše doporučoval jiné vyjádření, jako in silico metody byly interpretovány, výsledky jsou tedy spíše interpretační.

doc. Juřica

Otázka: Zajímalo by mě, proč karyofylen při in vitro testu snížil inhibici CYP3A4 při použití substrátu midazolamu, ale u substrátu testosteronu se to neprojeví? Mohlo by se zjistit in silico metodou, proč to tak je?

Odpověď: Tuto situaci si vysvětlujeme podobnými hodnotami Gibbsových energií a to, jak substrátu midazolamu a beta-karyofylen oxidu, tak i testosteronu a trans-nerolidolu.

Komentář prof. Anzenbachera: Inhibice testované látky u tohoto enzymu CYP3A4 se nedá generalizovat. Je zapotřebí testovanou látku otestovat také i s jiným substrátem.

Volná rozprava

prof. Mičuda

Otázka: Co jste vše dělala na svou disertaci? Dělala jste vše sama?

Odpověď: Všechny experimenty in vitro včetně analýz jsem dělala sama. Výsledky in silico modelování jsme s kolegy z přírodovědecké fakulty společně konzultovali.

prof. Opavský

Otázka: Proč jste zjišťovala jen inhibiční potenciál, proč ne indukční?

Odpověď: Pomocí mikrosomů lze zjistit pouze inhibici. Indukce se zjišťují na hepatocytech nebo experimentem in vivo.

Otázka: Může být změna na enzymech CYP závislá i na věku (ve stáří)?

Odpověď: Ano, ve stáří dochází ke snížené expresi cytochromů P450 nebo naopak (podle životního stylu daného člověka) k indukci některých CYP.

prof. Hudeček

Otázka: Chtěl bych se zeptat na zvýšenou aktivitu enzymu CYP2A6, kterou způsobila látka trans-nerolidol. Mohlo by zde dojít k aktivaci CYP2A6?

Odpověď: Zde nedošlo k aktivaci CYP2A6, jedná se o vliv samotného experimentu....

Otázka: A mohlo by to ovlivnit aktivaci CYP2A6 u některých látek?

Odpověď: Zřejmě ne, je to metodou a nedokážeme si vysvětlit, proč to lépe funguje s bacosomy.

Komentář prof. Mičudy: Je možné, že dochází k nespecifickým reakcím se substráty, k většímu otevření aktivního místa enzymu a tím k vyšší přeměně substrátu na metabolit.