

Úvod do farmakologie

Farmakologie je vědní obor, který se zabývá **interakcemi mezi léčivými a organismem**. Zahrnuje **farmakodynamiku**, která studuje **způsob a míru účinku léčiv na organismus** a **farmakokinetiku**, o níž lze zjednodušeně říci, že zkoumá **působení organismu na léčivo**.



Farmakodynamika

Podání různých látek vyvolává v organismu určitou **biologickou odezvu**. Tato odezva může být příznivá nebo nežádoucí, míra této odezvy – **účinek** – obvykle závisí na koncentraci látky. Léčiva jsou látkami, u nichž převažuje příznivý účinek, který lze využít v terapii. Účinek léčiva vyvolává jeho **interakce s určitými cílovými strukturami v organismu**.

Cílovými strukturami léčiv (použitý překlad pro anglické slovo *target* = terč, cíl) jsou nejčastěji různé biomakromolekuly, převážně ve vlastním, mohou však být i v cizím organismu (patogeny). Mohou se nacházet na povrchu nebo i uvnitř buněk. V důsledku variability organismů se u různých jedinců může lišit počet biomakromolekul stejného typu i detaily jejich prostorové stavby. V některých organismech mohou pak mít biochemické procesy abnormální průběh, což se projeví vznikem patologických stavů. Léčiva přitom mohou svými interakcemi s cílovými strukturami stav organismu normalizovat.

Farmakologové nemají jednotný názor na množství různých cílových struktur léčiv v lidském organismu a v lidských patogenech, což je s ohledem na rozsah výzkumu nových léčiv poněkud překvapivé.

Publikován byl údaj o 14 tisících různých cílových strukturách léčiv, reálnější odhady počtu cílových struktur majících určitý vztah k onemocněním se však pohybují spíše jen ve stovkách. Na základě rozboru účinku používaných léčiv byl před několika lety určen počet 324 cílových struktur v lidském organismu a patogenech, z toho připadalo na schválená nízkomolekulární léčiva 248 struktur. Obě čísla mezitím narostla, k čemuž přispělo zejména studium genomu.

Důležitými cílovými strukturami jsou buněčné receptory.

V minulosti byl pojem receptor používán pro všechny cílové struktury léčiv. Toto širší chápání pojmu receptor přetrvává v některých učebnicích farmakologie dodnes; zde bude používán v užším významu.

Léčiva mohou interagovat s jednou i více cílovými strukturami.

Schopnost léčiva interagovat s více cílovými strukturami (anglický termín *target promiscuity*) může být výhodná, ale i nežádoucí. Výhodná je v případě některých multifaktoriálních chorob, jako je např. hypertenze, cukrovka 2. typu nebo rakovina, nebo při léčbě některých pacientů trpících několika chorobami. Přitom bývá pacientovi podáváno několik různých léčiv, což může být nepříjemnou komplikací účinné léčby. Jedním z cílů snah farmaceutických chemiků se proto stává i obtížný úkol vyvinout vhodná „promiskuitní“ léčiva, která by mohla nahradit několik léčiv dosavadních tím, že budou vhodně modulovat funkci několika cílových struktur současně. Na druhé straně může být ovlivnění různých cílových struktur příčinou závažných nežádoucích účinků. Pak je třeba hledat takové látky, které nežádoucí účinek nemají.

Na interakcích léčiva s cílovými strukturami může participovat jedna nebo i více funkčních skupin jeho molekuly. Uplatňují se přitom tyto typy interakcí:

- **Iontové interakce** mezi ionizovanými skupinami s opačnými náboji.

Tyto interakce jsou velmi silné (20-40 kJ/mol), jejich síla však závisí na pH prostředí, které určuje stupeň ionizace. Iontové interakce se podílejí např. na vazbě některých neurotransmiterů nebo hormonů, např. dopaminu nebo adrenalinu, na jejich receptory. Tyto látky mají v molekule ionizovanou aminoskupinu, která interaguje s ionizovanou karboxylovou skupinou receptoru (např. methylamoniová skupina ionizovaného adrenalinu se váže iontovou vazbou na aspartátový zbytek Asp 113 vazebního místa adrenergických receptorů).

- **Vodíkové vazby** mezi skupinami s charakterem donorů a akceptorů protonu.

Vodíkové vazby jsou slabší než vazby iontové (energie 5-20 kJ/mol), přesto jsou pro interakce léčiv s cílovými strukturami významné. Na interakcích adrenalinu s adrenergním receptorem se vedle iontové vazby podílejí i vodíkové vazby mezi fenolickými hydroxyly molekuly adrenalinu (donory) a hydroxyly serinových zbytků 204 a 207 receptoru (akceptory).

- Tzv. **halogenové vazby** mezi atomy halogenů a donory elektronů.

Halogeny, i když jsou výrazně elektronegovní, mohou mít ve své struktuře místa s elektropozitivním charakterem, tzv. sigma díry. Ukazuje se, že tato kladná místa mohou svými interakcemi s elektronegovními skupinami (zejména kyslíkovými atomy) cílové struktury přispívat ke stabilizaci systému léčivo-cílová struktura a ovlivňovat tak farmakologické vlastnosti léčiva. Příkladem mohou být interakce hormonů štítné žlázy obsahujících jod s donory elektronů v jejich cílové struktuře. Síla halogenových vazeb klesá v řadě $-J > -Br > -Cl$, fluor se prakticky na halogenových vazbách nepodílí. Studium halogenových vazeb a jejich významu pro účinnost léčiv je zatím jen v počátku, vzhledem k tomu, že až 40% léčiv obsahuje ve své molekule halogeny, může v budoucnosti přispět k navrhování účinnějších léčiv.

- **Interakce pól (iont)-dipól a dipól-dipól**

Interakce léčiv s charakterem dipólů s ionizovanými nebo dipolárními skupinami ve vazebném místě cílové struktury jsou poměrně silné (energie interakcí pól-dipól 8-20 kJ/mol, dipól-dipól 3-15 kJ/mol) a významně ovlivňují účinnost. Pokud ze sterických důvodů nemůže dipolární látka ve vazebném místě zaujmout správnou orientaci, aby dílčí náboje dipólu mohly elektrostaticky interagovat s ionizovanými nebo dipolárními skupinami cílové struktury, její účinnost klesá. Ukázalo se to např. při studiu účinnosti analogu cimetidinu, léčiva proti žaludečním vředům.

- **Van der Waalsovské interakce**

Změny elektronové hustoty způsobené pohybem elektronů v nepolárních skupinách vedou k tomu, že se přechodně vytváří místa s vyšší a nižší elektronovou hustotou, která můžeme považovat za přechodné dipóly. Přestože mají časově omezenou životnost, umožňují, aby docházelo k van der Waalsovským interakcím mezi místy, kde přechodně vzniká elektronový deficit s místy, kde je elektronová hustota krátkodobě zvýšena. I když jde o relativně slabé interakce (energie 0,5-5 kJ/mol), mají vliv na afinitu léčiv k cílovým strukturám

- **π - π interakce mezi aromatickými systémy**

Mezi nekovalentní síly ovlivňující afinitu léčiv k cílovým strukturám patří i přitažlivé interakce mezi aromatickými kruhy s konjugovanými π -elektrony. Uplatňují se při vytváření terciární struktury bílkovin nebo dvojité šroubovice DNA. U některých léčiv se mohou jejich aromatické systémy účastnit π - π interakcí s aromatickými jádry fenylalaninu v bílkovinách. Jiným příkladem π - π interakcí léčiv je vkládání (interkalace) některých cytostatik s planární aromatickou strukturou mezi báze DNA. Přitom dochází k deformaci dvojité šroubovice, kterou je potlačena replikace i transkripce DNA.

- **Hydrofobní interakce**

Na interakcích léčiv s cílovými strukturami se mohou podílet nejen jejich polární, ale i nepolární hydrofobní skupiny v molekule. Na rozdíl od jiných interakcí, které jsou charakterizovány entalpickými změnami v systému léčivo – cílová struktura, jsou hnací silou entropické změny vyvolané změnami struktury vody v okolí hydrofobních skupin. Kapalná voda není zcela homogenní, ale jsou v ní místa se zvýšenou uspořádaností molekul. V okolí hydrofobních skupin je těchto uspořádaných míst více než v jiných místech objemu vody. Přesný fyzikální popis změn struktury vody při vzájemných interakcích hydrofobních skupin je velmi složitý. Zjednodušeně si však místa se zvýšenou uspořádaností molekul vody můžeme představit jako malé ledovečky. Dojde-li ke kontaktu hydrofobních skupin, pak celkový počet ledoveček v systému musí klesnout, protože se do okolí dvou interagujících skupin už nevejdou. Část proto musí „roztát“. Tím se zvýší neuspořádanost systému, takže vzroste jeho entropie. Za příklad hydrofobní interakce může sloužit interakce mezi aromatickým kruhem adrenalinu a fenyllovým zbytkem fenylalaninu 290, která se spolu s π - π interakcí spolupodílí na vazbě adrenalinu na adrenergní receptor. Jiným příkladem mohou být interakce alkylskupin v molekule léčiva s alifatickými řetězci zbytků valinu, leucinu a isoleucinu v bílkovinách.

- **Kovalentní vazby**

Většina léčiv se váže na cílové struktury v důsledku nekovalentních interakcí, některá léčiva se však mohou vázat kovalentně. Kovalentní vazby jsou velmi silné, k jejich rozštěpení je zapotřebí značné množství energie (150-600 kJ/mol), takže je lze považovat za irreverzibilní. Při vazbě léčiv na cílové struktury mohou být využity jen výjimečně. Příkladem jsou alkylační cytostatika, která blokují dělení buněk vytvořením irreverzibilní kovalentní vazby při reakci alkylační látky s nukleofilními skupinami guaninu, popř. dalších bází v DNA. Tím je znemožněna transkripce a translace genů. Jiné látky, léčiva nebo i některé polutanty, se mohou kovalentně vázat na skupiny aktivních míst enzymů nebo receptorů a tím je trvale zablokovat. Zvláštní skupinu tvoří léčiva, která se na své cílové struktury (obvykle kovové ionty v aktivních místech enzymů, ale i nukleofilní skupiny v DNA) vážou **koordináční** vazbou

Cílovými strukturami léčiv mohou být zejména:

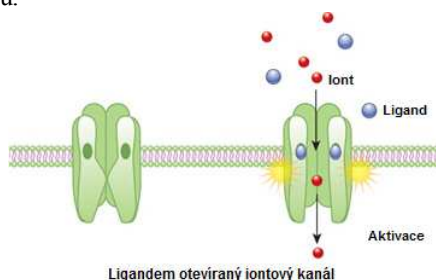
- **Receptory.** Jsou to bílkovinné útvary na povrchu nebo i uvnitř buněk, jejichž prostřednictvím jsou buněčné funkce a projevy řízeny z vnějšího prostředí určitými signálními molekulami, tzv. chemickými posly, jako jsou neurotransmitéry, hormony, růstové faktory apod.

Přenos signálů do buňky může být endokrinní (prostřednictvím hormonů sekretovaných endokrinními žlázami a transportovaných krví k cílovým buňkám), parakrinní (uvnitř tkáně), kontaktní nebo synaptický (mezi zakončeními nervových buněk). Při navázání signální molekuly změní receptor svůj tvar, což v buňce vyvolá určitou odezvu, což někdy je spuštění kaskády enzymatických reakcí. Přirozené signální molekuly a látky, které interagují s receptorem stejným způsobem, se nazývají **agonisté**. **Antagonisté** jsou látky, které se sice mohou na receptor navázat, neaktivují jej však, ale naopak blokují. Přirozená signální molekula pak nemůže s receptorem interagovat a vyvolat odpovídající buněčnou odezvu. Léčiva s účinkem agonisty mohou korigovat poruchy vyvolané nedostatkem přirozené signální molekuly. Naopak, onemocnění vyvolaná nadměrnou přítomností signálních látek, lze potlačit podáváním antagonisticky působících léčiv. Některá léčiva mohou ovlivňovat více typů nebo podtypů receptorů, antagonistu jednoho receptoru může dokonce být agonistou druhého. Interakce s více receptory může být výhodná, ale také může být příčinou vedlejších účinků léčiva.

Receptory na povrchu buněk přenášejí signály z vnějšího prostředí do buněk. Jsou trojího typu:

- **Iontové kanály**, které regulují průchod iontů (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) buněčnou membránou.

Řada procesů v buňce je ovlivňována koncentrací iontů. Ionty nemohou normálně difundovat buněčnou membránou. Ta je tvořena lipidickou dvojvrstvou a vytváří tak pro polární látky nepropustnou bariéru. K tomu, aby se ionty dostaly do buňky nebo z ní ven, slouží iontové kanály. Jsou to jakési "tunely" tvořené soustavou několika bílkovin procházejících napříč buněčnou membránou. Nemohou být trvale otevřeny, protože průchod iontů do buňky a zpět by byl nekontrolovatelný. V buňce by zůstávaly jen ty ionty, které jsou v jejím okolí a koncentrace iontů vnitř a vně buňky by byly stejné. Normálně jsou tedy iontové kanály zavřené a otevírají se, až k tomu dostanou signál. U iontových kanálů otevíraných ligandem se kanál otevře při „nasednutí“ určité regulační molekuly nebo iontu na receptorové místo jedné z bílkovin iontového kanálu. Bílkovina přitom změní konformaci. Dominovým efektem se následně změní konformace dalších bílkovin iontového kanálu. Kanál se přitom otevře, takže určité ionty přes něj mohou procházet. Některá léčiva mohou funkci iontových kanálů ovlivňovat. Např. "Ca blokátory" snižují krevní tlak tím, že blokují otevření iontových kanálů pro vápenaté ionty. Při blokádě klesne koncentrace vápníku v buňkách cévního a srdečního svalstva, což má za následek rozšíření cév a snížení síly potřebné k srdečnímu stahu.



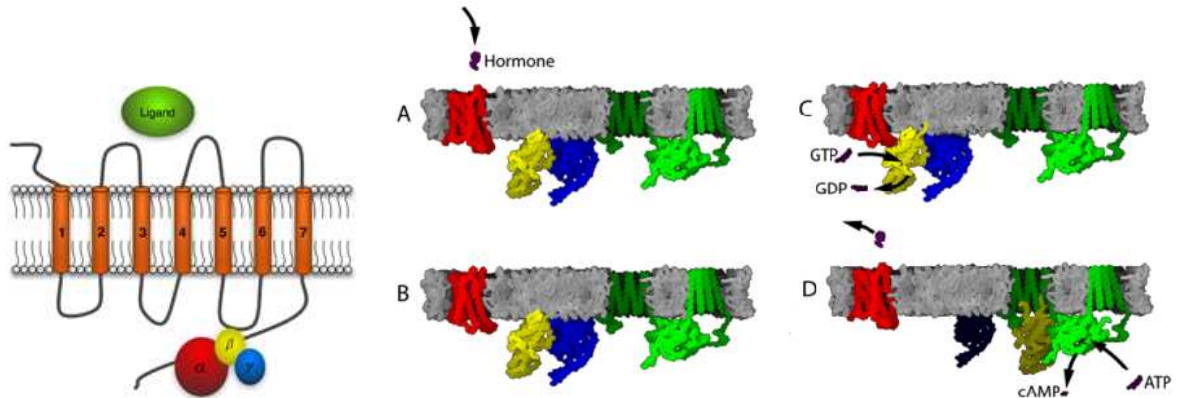
Jiné iontové kanály se otevírají nebo zavírají při změnách elektrostatického potenciálu buněčné membrány (takové kanály mají důležitou úlohu při přenosu nervového vzruchu), další se otevírají působením světla (rhodopsinové kanály) nebo po mechanickém podráždění (např. iontové kanály buněk středního ucha).

- **Receptory spřažené s G-proteiny**

Receptory spřažené s G-proteiny (GPCR, G-protein-coupled receptors) se podílejí na smyslovém vnímání, řízení přenosu nervového vzruchu, ovlivňování chování a nálady a na imunitní odezvě. Jsou tvořeny bílkovinou, která prochází buněčnou membránou. Detailní struktury nejsou příliš známé, nedávno byla rentgenokrytograficky zjištěna trojrozměrná struktura teprve druhého receptoru tohoto typu. Vazebné místo pro ligand mají na extracelulární straně, uvnitř buňky mají vazebné místo pro tzv. G-protein. Aktivace receptoru extracelulárními přenašeči signálů vyvolává uvnitř buňky tvorbu "druhých posílů", tj. molekul cyklického adenosin-3',5'-fosfátu (cAMP), inositoltrifosfátu (IP_3), diacylglycerolu (DG), popř. i dalších látek, které pak spouští aktivační reakce zahajující různé buněčné procesy. cAMP např. zprostředkovává v buňce přenos signálů od řady extracelulárních nízkomolekulárních látek a peptidických hormonů, např. adrenalinu, histidinu, kortikotropinu (ACTH), IP_3 a DG se podílejí na přenosu signálů vyvolaných interakcí noradrenalinu nebo vasopressinu s jejich receptory, atd.

Přenos signálu z vnějšího prostředí dovnitř do buňky přitom probíhá poměrně složitým způsobem. Po nasednutí signální molekuly na extracelulární část receptoru se změní konformace bílkoviny. Na intracelulární straně se přitom otevře vazebné místo pro G-protein. G-protein je složen ze tří podjednotek α , β a γ ; podjednotka α obsahuje GDP. Při interakci s receptorem se změní charakter vazebného místa G-proteinu pro GDP. GDP se přitom uvolní a místo něho se naváže GTP. Tím se destabilizuje struktura G-proteinu, který se následně rozpadne. Podjednotka α s navázaným GTP pak putuje buněčnou membránou, až se dostane k dalšímu enzymu, adenylátcyklase a naváže se na něj. Přitom se změní struktura adenylátcyklasy a zpřístupní se její vazebné místo pro ATP. Adenylátcyklasa pak přemění ATP na cAMP. Přitom může katalyzovat přeměnu více molekul, čímž se signál uvnitř buňky zesílí.

Existují i jiné typy G-proteinů: G_i protein, jehož podjednotka α naopak adenylátcyklasu deaktivuje nebo G-protein, který aktivuje fosfolipasu C. Ta štěpí fosfatidylinositoldifosfát na inositoltrifosfát (IP_3) a diacylglycerol (DG), které spouští v buňce jiné signalizační dráhy než cAMP.



Receptor spážený s G-proteinem Schema buněčných událostí po aktivaci receptoru (žlutá je zde podjednotka α)

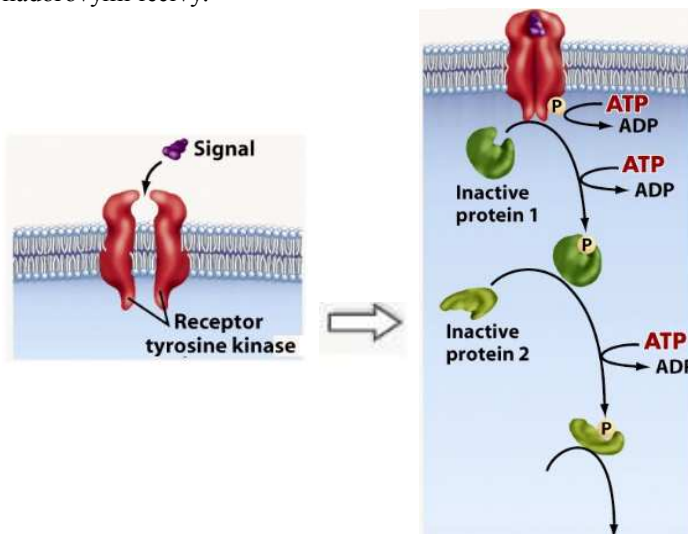
Dlouhodobá aktivace receptoru agonistou může však vést k jeho **desenzitizaci**. Přitom dochází k fosforylaci serinových a threoninových zbytků v třetí cytoplasmatické smyčce receptoru. Na fosforylovanou smyčku se pak váže bílkovina β -arrestin. Vazba arrestinu vyvolá změnu aktivní konformace receptoru na inaktivní s uzavřeným vazebným místem pro G-protein. K přenosu signálu pak už nedochází. Desenzitizace receptoru je reverzibilní.

Při řadě onemocnění dochází k narušení přenosu signálů prostřednictvím receptorů spážených s G-proteiny. GPCR jsou proto cílovou strukturou řady důležitých léčiv z nejrůznějších terapeutických skupin. Patří mezi ně zejména léčiva určená k léčbě poruch centrálního nervového systému, ale i řada jiných léků, např. ranitidin používaný v terapii žaludečních vředů, léky proti hypertenzi losartan a valsartan, goserelin a další protinádorově působící analoga hormonu gonadoliberinu, apod. Ze seznamu 200 nejprodávanějších léků patří mezi léky zacílené na GPCR asi třetina. V r. 2012 obdrželi za výzkum receptorů spážených s G-proteiny Nobelovu cenu za chemii Robert Lefkowitz a Brian Kobilka. Téměř 20 let před Lefkowitzem a Kobilkou, v r. 1994, byla Nobelova cena za fyziologii a medicínu udělena M. Rodbellovi a A.G. Gillmanovi, kteří objevili způsob iniciace kaskády reakcí při buněčné signalizaci s účastí GTP a G-proteinů.

→ **Receptory s tyrosinkinasovou aktivitou**

Tyto receptory-enzymy prochází buněčnou membránou. Na extracelulární straně je receptorové místo, uvnitř buňky aktivní místo enzymu tyrosinkinasy. Po navázání ligandu se změní struktura receptoru a otevře se aktivní místo enzymu. Tyrosinkinasa receptoru pak začne katalyzovat fosforylaci intracelulárních bílkovin. Tím jsou tyto bílkoviny aktivovány a mohou zahájit řadu různých vnitrobuněčných procesů. Agonisty tyrosinkinasových receptorů jsou např. peptidické hormony (insulin), růstové faktory a cytokiny.

Při interakci růstových faktorů s jejich receptory na povrchu buněk jsou aktivovány tyrosinkinasy, které se pak podílejí na přenosu signálu k růstu a dělení buňky. V nádorech dochází k poruchám regulace růstu buněk zapříčiněných buď nadměrnou expresí růstových faktorů, popř. jejich receptorů, nebo mutacemi které vedou k trvalé aktivaci tyrosinkinasy receptoru. Výsledkem je nekontrolované dělení a růst nádorových buněk. Látky, které brání interakci růstových faktorů s receptorem nebo inhibují tyrosinkinasy receptorů proto jsou důležitými protinádorovými léčivy.



Receptory s tyrosinkinasovou aktivitou

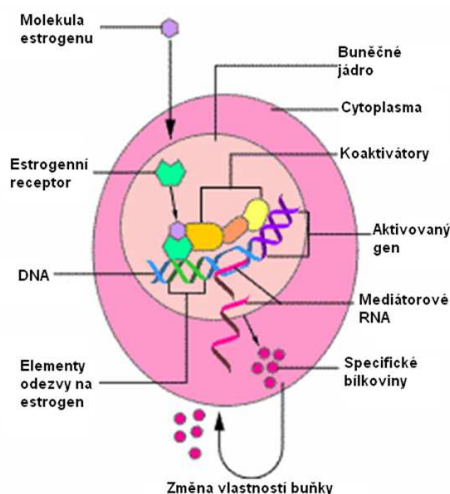
Signální molekula (např. růstový faktor) interaguje s extracelulární částí receptoru. Přitom dojde k dimerizaci receptoru a současně se změní konformace receptorové bílkoviny. Díky této změně mohou být hydroxylové skupiny tyrosinu na intracelulární části receptoru fosforylovány. Fosforylaci je kinasa aktivována a katalyzuje fosforylaci dalších bílkovin v buňce. Kaskádou fosforylačních aktivačních reakcí je pak až do buněčného jádra předáván signál k dělení buňky nebo jiným projevům buňky.

- Předání signálu lze zabránit několika způsoby (využívanými v protinádorové terapii):
- Vně buňky (pomocí protilátek):
 - Vyvážením ("neutralizací") signální molekuly, která pak nemůže interagovat s receptorem
 - Zábranou dimerizace
 - Obsazením vazebného místa receptoru
 - Uvnitř buňky (malé lipofilní molekuly)
 - Inhibicí tyrosinkinasy receptoru

Pozornost je přitom věnována zejména receptorům pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a pro epidermální růstový faktor (EGF). VEGF aktivuje prostřednictvím kinyzy spřažené s receptorem (VEGFR) buněčné bílkoviny podílející se na angiogenezi, tj. růstu a dělení buněk, které vytváří cévy zásobující rostoucí nádor živinami. Zabrání-li se interakci VEGF s VEGFR, zastaví se růst nových cév a tedy i přísun živin potřebných pro růst nádoru. Antiangiogenní látky přitom nádorové buňky přímo nelikvidují, ale tím, že zastaví jejich množení a růst, mohou zlepšit vyhlídky likvidace nádoru vlastním imunitním systémem organismu a/nebo chemoterapií. K léčivům, která takto působí, patří např. protilátky proti receptorům. Problémem přitom je existence více typů VEGF (5 typů) i VEGFR (3 typy). Přesto je takto zacílená terapie úspěšná. Příkladem uplatnění protilátky v protinádorové terapii může být trastuzumab, (Herceptin), protilátka proti VEGFR2 (označovanému také HER2), který je nadměrně exprimován v asi 30% nádorů prsu.

Další rodinu receptorů tvoří **nitrobuněčné (intracelulární) receptory**. Reagují na signální molekuly, které díky svému lipofilnímu charakteru mohou pronikat přes buněčnou membránu, jako jsou steroidy, hormony štítné žlázy, retinoidy a eikosanoidy (thromboxany a prostaglandiny).

Intracelulárními receptory jsou např. estrogenní receptory v buňkách některých ženských tkání, jako je prs nebo děloha. Vyskytují se tam v jádrech buněk ve formě komplexu s jiným proteinem. Když dojde k interakci receptoru s ženským pohlavním hormonem estrogenem, komplex se rozštěpí. Uvolněný receptor dimerizuje a dimer s navázaným estrogenem pak interaguje s aktivátory procesu transkripce genů regulujících růst a dělení buněk. Tím je ovlivňován vývoj ženského organismu i jeho funkce. Estrogeny ale také mohou podporovat růst buněk některých nádorů prsu a ženských pohlavních orgánů. Látky blokující estrogenní receptory (tamoxifen, toremifen) jsou proto používány jako protinádorová léčiva.



Schema estrogenního receptoru a jím zprostředkované buněčné odezvy

- **Přirozené signální molekuly.** Cílovou strukturou léčiv mohou být vedle receptorů i jejich přirození agonisté. Jak bylo ukázáno, blokáda receptorů znemožní přenos signálu z vnějšího prostředí do buňky. Buňka pak na vnější signál nereaguje. Stejný efekt mohou však mít i různé látky, které se mohou na signální molekulu navázat a tím zabránit její interakci s receptorem.

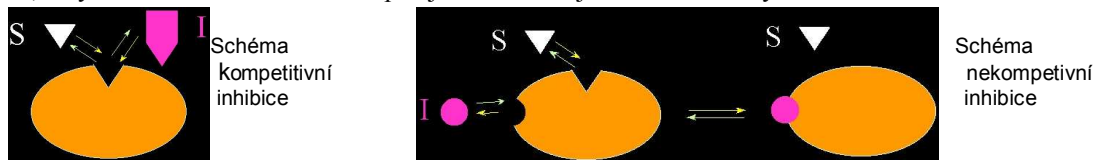
Důležitá je zejména „neutralizace“ mitogenních látek, které dávají buňce signál k buněčnému dělení, mitose. Mitogenní účinnost mají již zmíněné **růstové faktory**, dále pak některé **cytokiny** nebo **hormony** i **některé nízkomolekulární látky**. Jako léčiva blokující signální molekuly polypeptidického charakteru byly v posledních letech vyvinuty především některé protilátky. Bevacizumab, protilátka proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru VEGF, se používá v protinádorové terapii. Jiné protilátky, ale i fúzní bílkoviny nebo rozpustné receptorové bílkoviny s podobným mechanismem účinku jsou zkoušeny pro léčbu zánětlivých autoimunitních onemocnění způsobených produkcí nadměrného množství cytokinu $TNF\alpha$.

- **Enzymy.** Léčiva, jejichž cílovou strukturou jsou enzymy, které katalyzují metabolické přeměny v organismu, působí tak, že enzymy buď inhibují, nebo naopak aktivují.

Enzymy působí tak, že se do jejich aktivního místa naváže substrát, který je pak reakcí katalyzovanou enzymem přeměněn na produkt. Ten je z aktivního místa uvolněn. Při vazbě substrátu do aktivního místa se uplatňují různé typy nekovalentních interakcí, jako jsou iontové nebo vodíkové vazby, interakce dipól-dipól nebo van der Waalsovy síly. Aby enzymová reakce mohla proběhnout, musí charakter aktivního místa umožnit dostatečně pevnou vazbu substrátu, avšak poměrně slabou vazbu produktu. Jinak by aktivní místo zůstalo zablokované produktem. Aktivní místo nemusí mít vždy ideální tvar pro substrát, často při interakci se substrátem dochází k indukované konformační změně. Při ní se tvar aktivního místa změní tak, aby nekovalentní vazebné síly byly maximální možnou měrou využity pro vazbu substrátu.

Léčiva ovlivňující aktivitu enzymů lze podle mechanismu účinku rozdělit na:

- **Kompetitivní inhibitory**, které soutěží s přirozeným substrátem o aktivní místo enzymu. Čím větší je koncentrace inhibitoru, tím více aktivních míst je obsazeno a tím menší množství substrátu se může přeměnit na normální produkt. Enzymové inhibitory tak brání přirozeným metabolickým přeměnám probíhajícím v organismu. Nazývají se proto také antimetabolity.
- **Nekompetitivní inhibitory**, které se neváží v aktivním místě, ale na jiném místě enzymové molekuly, tzv. **alosterickém** místě. Při vazbě nekompetitivního inhibitoru do alosterického místa dochází ke změně tvaru celé molekuly enzymu, tedy i aktivního místa. Substrát pak je vázán slaběji nebo nemůže být navázán vůbec.



Kompetitivní i nekompetitivní inhibitory mohou být **reverzibilní** nebo **ireverzibilní**.

Reverzibilní inhibitory jsou vázány poměrně slabě, takže mohou být z vazby na enzym vytěsněny, v případě kompetitivní inhibice přirozeným substrátem. Vazba ireverzibilních inhibitorů je naopak velmi pevná, někdy může jít i o vazbu kovalentní. Nemohou proto být z vazebného místa vytěsněny, takže blokují aktivitu enzymu trvale.

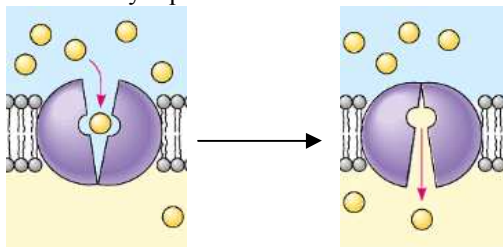
- **Aktivátory enzymů** jsou látky, které naopak reakci enzymu se substrátem podporují. Aktivátory působí tak, že zlepšují podmínky pro přeměnu substrátu na produkt tím, že příznivě ovlivňují prostorové uspořádání aktivního centra enzymu. Dochází k tomu zpravidla při konformační změně způsobené vazbou aktivátoru do alosterického místa enzymu. Podobně jako inhibitory, mohou i aktivátory enzymů být reverzibilní nebo ireverzibilní. Aktivace může být i nepřímá, prostřednictvím jiných enzymů. Ty mohou aktivovat první enzym buď kovalentním navázáním vhodné skupiny, nejčastěji fosfátové (proteinkinasy) do alosterického centra nebo naopak odštěpením části molekuly, jejíž přítomnost průběh enzymatické reakce blokuje (patří sem např. přeměna neaktivních zymogenů na aktivní enzym, např. trypsinogenu na trypsin).

Léčiva ovlivňující aktivitu enzymů mají v terapii velmi důležité postavení.

Např. atorvastatin, léčivo snižující hladinu cholesterolu v organismu, je inhibitorem 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázy, klíčového enzymu biosyntézy cholesterolu. Léky proti bolesti, jako je např. ibuprofen, inhibují enzym cyklooxygenasu. Mezi nově zaváděné inhibitory enzymů patří cíleně směřovaná protinádorová léčiva, jako je imatinib, gefitinib, erlotinib, sunitinib, sorafenib, lapatinib apod. (koncovka -nib označuje inhibitory), které blokují tyrosinkinasy receptorů pro EGF nebo VEGF. Jako aktivátor enzymu působí např. nitroglycerin používaný pacienty s anginou pectoris, který po podání uvolňuje oxid dusnatý a ten pak aktivuje guanylátcyklasu.

- ▶ **Bílkovinné přenašeče (transportéry)**. Jsou to transmembránové proteiny umožňující, aby se do buňky dostávaly různé látky, které jsou natolik hydrofilní, že nemohou pronikat normálními difuzními procesy přes buněčnou membránu tvořenou lipidickou dvouvrstvou.

Bílkovinné přenašeče procházející přes buněčnou stěnu mají lipofilní povrch a otevřenou hydrofilní dutinu. Do dutiny mohou vstupovat hydrofilní molekuly polárních látek, jakými jsou aminokyseliny, nukleotidy, nebo některé neurotransmitery, např. adrenalin nebo dopamin. Přitom dojde ke změně konformace bílkoviny, vstup do dutiny se uzavře a naopak se otevře výstupní otvor na druhé straně buněčné membrány. Tím je přenášená molekula z dutiny uvolněna.



Schematické znázornění funkce bílkovinného přenašeče

Některé látky mohou dutiny přenašečů zablokovat, takže pak do buňky se nedostane běžně transportovaná látka. Působí tak některá léčiva onemocnění centrálního nervového systému, např. tricyklická antidepresiva, ale i drogy. Jestliže např. přenašeče adrenalinu obsadí amfetamin, pak na povrchu nervových buněk bude adrenalinu přebytek, protože nemůže být "stažen" zpět do buňky. Přebytečný adrenalin interaguje s více receptory než normálně, čímž se zvyšuje nervová aktivita. Některá jiná léčiva bílkovinné ovšem přenašeče neblokují, ale využívají je jako "černí pasažéři" k proniknutí do buněk (např. antiparkinsonikum DOPA se tak dostává do buněk místo dopaminu).

Transport molekul léčiva ven z buněk zajišťuje jiný typ bílkovinných přenašečů.

Jsou to tzv. ABC přenašeče (ATP-Binding Cassette transporter), které získávají energii pro transport molekul léčiv proti koncentračnímu gradientu z ATP. Patří mezi ně např. MRP1 (Multidrug Resistance Protein 1), BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) nebo P-gp1 (P-glykoprotein 1). Hrají důležitou úlohu při mnohočetné lékové rezistenci (MDR, **M**ulti**D**rug **R**esistance), která se může vyvinout u některých nádorů a zapříčiňuje selhání chemoterapie. Látky blokující aktivitu ABC přenašečů mohou přispět ke zvýšení účinnosti chemoterapie nádorových onemocnění. Jsou proto intenzivně studovány. Patří mezi ně např. deriváty cyklosporinu, léčiva používaného při transplantacích, nebo kardiovaskulárního léčiva verapamilu. Mechanismus jejich účinku zatím není dostatečně prozkoumán, některé z těchto látek ovlivňují hladinu glutathionu, který se na transportu léčiv z buněk podílí.

- **Strukturní bílkoviny** vytvářející vnější a vnitřní strukturu buněk a tkání. Patří mezi ně např. aktin, kolagen a keratin. Cílovou strukturou několika protinádorových léčiv je **tubulin**

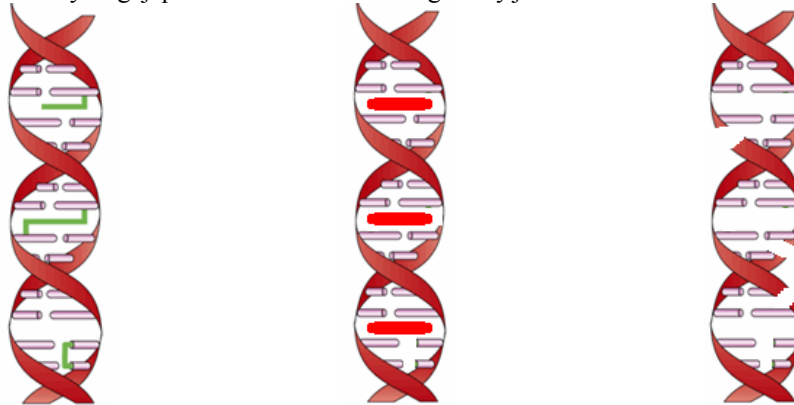
Tubulin je bílkovina, která uvnitř buňky polymeruje za vzniku miniaturních trubiček - mikrotubulů. Ty jsou zodpovědné za integritu buněk a mobilitu struktur v buňkách - např. při dělení buněk vytváří "mitotické vřetánko" které se primárně podílí na rozdělení chromosomů a tím i na dělení buněk. Po rozdělení buňky mikrotubuly depolymerují. Zablokování polymerace tubulinu (alkaloidy *Vinca*) nebo depolymerace mikrotubulů (paklitaxel) blokuje dělení buněk. Léky působící na mikrotubuly se proto používají v protinádorové terapii.



- **Nukleové kyseliny** jsou důležitou cílovou strukturou, zejména pro řadu **protinádorových léčiv**. Patří mezi ně řada léčiv, které na nukleové kyseliny působí různými mechanismy. Jsou to:

- **Alkylační látky** – alkylace je narušena normální funkce DNA a tedy i dělení buněk.

Alkylační činidla reagují s nukleofilními skupinami molekuly DNA, nejčastěji s dusíkem v poloze 7 guaninu. Monoalkylovaná DNA snáze podléhá mutacím. Při alkykaci bifunkčními nebo trifunkčními alkylačními činidly a DNA dochází k zesítnění – propojení bází buď na stejném řetězci dvojité spirály DNA (intrastrand cross-linking) nebo na obou řetězcích (interstrand cross-linking). Podobě působí platinová cytotatika, která však nepropojuje báze DNA kovalentně, ale koordinační vazbou s atomem platiny. Bifunkční alkylující látky propojují spíše báze komplementárních řetězců, platinové deriváty reagují přednostně se sousedícími guaniny jednoho řetězce. Zesítnění brání replikaci i transkripci.



Alkylace DNA (monoalkylace, propojení 2 bází komplementárních řetězců, 2 bází na jednom řetězci)

Schematické znázornění interkalace

Přerušení řetězců DNA

- **Interkalační látky** - se "vmezežují" mezi páry bází v řetězcích DNA.

Interkalační látky mají planární molekulu, jinak by nemohly proniknout mezi báze. Mají aromatický charakter a zpravidla jsou poměrně hydrofobní. Jejich antimikrobní a protinádorová účinnost je vysvětlována tím, že svým proniknutím mezi báze deformují dvojitou šroubovici DNA a tím brání její replikaci a inhibují působení enzymu topoisomerasy II, enzymu, který řídí prostorové uspořádání DNA. Mezi interkalační látky patří např. anthracyklinová protinádorová antibiotika, jako je široce používaný doxorubicin.

Do této skupiny patří i planární sloučeniny interagující s „**G-kvadruplety**“ na konci telomer.

Telomery jsou zvláštní struktury na konci chromosomů, které obsahují mnohonásobně se opakující sekvence nukleotidů bohaté na guanin. Při každém buněčném dělení se konce telomer zkracují, zkrácení pod minimální délku dává signál k buněčné smrti – apoptose. Telomery tak působí jako určité biologické hodiny.

Zároveň, ale i nádorové buňky obsahují aktivní formu enzymu telomerasy, který koncové struktury telomer prodlužuje, takže ke zkrácení nedochází. V normálních buňkách dospělého organismu je telomerasa inaktivní. Předpokládá se proto, že inhibice telomerasy by mohla zastavit dělení nádorových buněk a inhibitory telomerasy jsou proto intenzivně studovány jako potenciální protinádorové léky. Účinek telomerasy lze však zablokovat i jiným mechanismem.

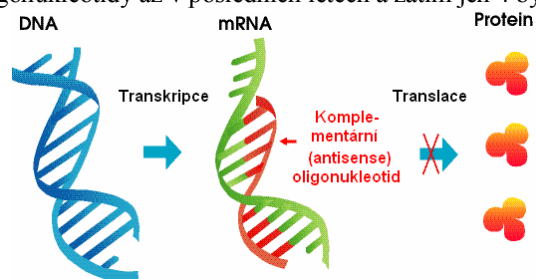
Oligonukleotidové sekvence bohaté na guanin vytváří na konci telomer zvláštní struktury se čtyřmi paralelními řetězci oligonukleotidů, tzv. G-kvadruplety. Tyto struktury je třeba rozrušit, aby telomerasa mohla řetězce prodloužit. Potenciálním protinádorovými léčivými proto mohou být i takové látky, které G-kvadruplety nerozvolňují, ale naopak stabilizují. Tyto látky mají planární strukturu podobně jako běžné interkalátory, tato struktura je však rozsáhlejší. Inhibují topoisomerasu II a s kvadruplexy interagují silněji než se zdvojenými řetězci standardní DNA.

- Látky přerušující řetězce DNA se váží do malého žlábků dvojité spirály DNA, kde pak rozštěpí řetězec nukleotidů, obvykle radikálovým mechanismem.

Do této skupiny patří endiiny, zajímavé látky s konjugovanými trojnými vazbami produkované mikroorganismy, které mají výrazný protinádorový účinek (kalicheamycin, neokarzinostatin). Jejich endiynové seskupení cykloaromatizuje na aromatický biradikál, který se stabilizuje odštěpením dvou vodíků z DNA. Přitom vzniká biradikál v molekule DNA, jehož reakce s kyslíkem vede k rozštěpení nukleotidového řetězce. Pro malou specifitu a nepříznivé vedlejší účinky je však uplatnění endiinů zatím jen omezené.

- Komplementární („antisense“) oligonukleotidy jsou řetězce nukleotidů vytvářející sekvenci, která odpovídá sekvenci ve vybraném úseku m-RNA a může se tedy na něj vázat na základě párování bází. Tím je zablokovan přepis m-RNA na bílkovinu.

Komplementární oligonukleotidy nabízejí vysoce specifický účinek v přerušení exprese některých genů (např. "onkogenů") na jejich bílkovinné produkty. Studovány jsou již od 70. let, jejich využití v terapii však naráží na řadu problémů se stabilitou a přípravou, které jsou postupně řešeny. Do klinického zkoušení se dostaly první komplementární oligonukleotidy až v posledních letech a zatím jen 4 byly povoleny pro použití v terapii.



Za specifický druh komplementárních oligonukleotidů lze považovat **malé interferující ribonukleové kyseliny, siRNA a mikroRNA, miRNA**. Jsou to přirozené oligoribonukleotidy, které mají důležitou úlohu v regulaci buněčných procesů. Jejich účinkem, který je souhrnně nazýván RNA interference, je „umlčení“ genů (gene silencing).

siRNA jsou tvořeny krátkými zdvojenými řetězci RNA s 21-25 nukleotidy, miRNA jsou jednořetězcové. Oba typy mohou způsobit postranlační umlčení genů, tj. zablokovat přepis mRNA na odpovídající bílkovinu. Ruší tak funkci genu, aniž by přitom došlo k jeho poškození. siRNA asociují s nukleasovým komplexem nazvaným RISC (RNA-induced silencing complex) a tím jej nasměrují k m-RNA s komplementární sekvencí. RISC potom část m-RNA rozštěpí. Zbytek molekuly se pak stane vysoce náchylný k další degradaci a rozpadne se. miRNA rovněž blokují translaci mRNA, nemusí však vyvolávat její štěpení. Při některých onemocněních může docházet k nadměrné produkci určitých typů miRNA. Zatímco siRNA mohou být využity přímo jako léčiva, miRNA se proto spíše stávají cílovou strukturou jiných léčiv, tzv. **antagomirů**, které miRNA blokují. První informace o umlčení genů malými interferujícími RNA byly publikovány teprve v r. 1998. Přesto nyní už značně pokročila řada projektů zaměřených na potenciální využití RNA interference v léčbě virových a nádorových onemocnění, onemocnění srdce, genové terapii apod.

Poznání různých typů RNA, které nekódují bílkoviny, ale mohou regulovat procesy translace a/nebo i transkripce, se v posledních letech rychle rozšiřuje. Perspektivně se cílovou skupinou léčiv mohou např. stát **dlouhé nekódující RNA (lncRNA – long non-coding RNA)**. Jsou to ribonukleové kyseliny tvořené 100-200 nukleotidy. Dlouhé nekódující RNA se patrně podílejí – zatím jen nedostatečně známým způsobem – na regulaci transkripce genů, např. na tom, že v organismu potomků jsou exprimovány geny pouze z jedné rodičovské alely. Jejich funkce, které jsou v současné době intenzivně studovány, ale mohou být mnohem rozmanitější.

- Látky interagující s ribosomální RNA - blokují biosyntézu bílkovin v ribosomech.

Ribosomální RNA je cílovou strukturou účinku některých antibiotik, jako je streptomycin, tetracykliny nebo chloramfenikol. Tyto látky inhibují pohyb ribosomu podél mRNA a blokují přenos rostoucího polypeptidového řetězce z jednoho zbytku tRNA na druhý.

- **Lipidy** jsou základní složkou buněčných membrán. Membrány jsou tvořeny dvěma vrstvami fosfolipidů uspořádanými tak, že na jejich povrchu jsou skupiny hydrofilní, uvnitř hydrofobní. Dvojvrstva fosfolipidů představuje bariéru mezi vnějším a vnitřním prostředím buňky, která brání průchodu vody, iontů a polárních molekul a umožňuje, aby koncentrace těchto látek uvnitř a vně buněk byla odlišná. Změny v buněčné membráně ovlivňují vnitřní prostředí buňky a tím i její projevy.

Předpokládá se, že inhalační anestetika působí tak, že zvyšují fluiditu buněčných membrán a tím narušují přenos signálů, především nervového vzruchu, do buňky. Některá antibiotika a antimykotika vytvářejí spirálové struktury procházející buněčnou membránou. Ty pak fungují jako kanálky pro průchod iontů a polárních molekul membránou. Jiná antibiotika přímo slouží jako přenašeče iontů přes buněčnou membránu. Vankomycin - antibiotikum používané jako poslední šance v těch případech, kdy jiná antibiotika selhávají, atakuje bakteriální přenašeče lipidů (přesněji stavebních bloků buněčných membrán sestávajících z lipidické, disacharidické a peptidické složky). Tím blokuje výstavbu buněčných stěn rezistentních bakterií, která je nezbytným předpokladem pro jejich růst a množení.

► **Sacharidy (glykokonjugáty) na povrchu buněk.** Konjugáty sacharidů s proteiny nebo lipidy zakotvené v buněčné membráně mají velký význam pro vzájemné rozpoznávání a komunikaci buněk. Jsou rovněž důležité pro vzájemnou adhezi buněk mezi sebou v tkáních.

Na povrchu nádorových buněk jsou některé specifické glykoproteiny, které jsou považovány za nádorové antigeny. Protilátky proti těmto antigenům mohou být využity k přípravě tzv. cíleně směřovaných protinádorových léčiv. Konjugát léčiva s protilátkou zařídí, aby léčivo bylo přivedeno přímo k nádorové buňce. Glykoproteiny povrchu buněčných stěn hrají velkou roli i v mechanismech virové nebo bakteriální infekce. Virus nebo bakterie rozpoznají určitou glykoproteinovou strukturu na povrchu hostitelské buňky, adhezí k ní a tím nastartují proces infekce. Zablokování procesu rozpoznání nebo adheze může zabránit infekci. V poslední době se tímto směrem ubírá např. výzkum nových léků proti HIV. Látky, které blokují interakce selektinů, glykoproteinů buněčných membrán cévní výstelky, s povrchovými sacharidy bílých krvinek, mohou být novými protizánětlivými léky, jiné látky interagující s glykoproteiny zprostředkujícími buněčnou adhezi mohou být použity jako léky proti nadměrné srážlivosti krve, ale i jako nové antikoncepční přípravky. Interakce glykokonjugátů povrchu buněk hrají velkou roli i při alergických a autoimunitních onemocněních.

► **Volné molekuly a ionty.**

Některá léčiva mohou interagovat s molekulami a ionty, které se mohou volně vyskytovat v tělních tekutinách a jejichž nadbytek může být příčinou různých poruch. Patří mezi ně např. cholestyramin, iontoměnič, který vychytává ze zažívacího traktu žlučové kyseliny a tím vlastně snižuje i množství cholesterolu, z něhož žlučové kyseliny vznikají. S kovovými ionty interagují chelatační látky jako je desferal a podobná léčiva snižující zátěž organismu nadměrným množstvím železa, která může způsobit narušení funkce jater a zapříčinit i nadměrný vznik škodlivých kyslíkatých radikálů Fentonovou reakcí. Chelatační látky se také používají jako antidota při otravách těžkými kovy.

Afinita léčiva k cílové struktuře, účinnost a potence léčiv

Vysokomolekulární cílové struktury mohou mít v důsledku variability genetické výbavy větší či menší rozdíly ve stavbě molekuly, které se pak mohou projevit v individuálních rozdílech v účinku různých léčiv. Individuální rozdíly ve struktuře genů kódujících stejný bílkovinný produkt jsou nazývány **genový polymorfismus** (pozor – nezaměňovat s polymorfií krystalů léčiv). Polymorfismus genů je způsoben zděděnými nebo nově vzniklými mutacemi.

Často přitom jde o tzv. jednonukleotidový polymorfismus (Single Nucleotide Polymorphism, zkratka SNP), rozdíly způsobené „bodovou mutací“, tj. změnou jediného nukleotidu v genu. Důsledkem je záměna jedné aminokyseliny v kódovaném proteinu (enzym, receptor, strukturní bílkovina, růstový faktor). Tato záměna nemusí mít na funkčnost bílkoviny vliv, ovlivní-li však prostorovou stavbu aktivního místa, mohou se v její funkci projevit rozdíly, např. se zrychlí nebo zpomalí enzymová reakce. To pak může vést ke změně účinků léčiva na pacienta nebo změně průběhu eliminace léčiva z organismu. Jinak velmi účinný lék může být pro určitého pacienta bezcenný nebo může působit jen ve zvýšených dávkách. Naopak, někdy může dokonce dojít ke zvýšenému výskytu vedlejších účinků, což může ohrozit i pacientovo zdraví. Lékaři proto mají stav pacientů sledovat a podle potřeby upravovat nebo měnit terapeutický režim.

Účinky léčiva ovšem nezávisí jen na prostorové stavbě cílových struktur, ale i na jejich počtu. Ten určují jednak individuální rozdíly v **počtu kopií určitého genu** (CNV, copy number variation), jednak **regulace exprese genu** – zda je potlačen nebo podpořen vznik bílkovin, které gen kóduje.

Mapování lidského genomu přineslo zjištění, že počet kopií určitého genu může být u různých jedinců proměnný. Podobně jako v případě SNP mohou být rozdíly počtu kopií genů děděné nebo mohou vznikat během vývoje organismu – v důsledku chromosomálních mutací – delecí, duplikací, inverzí nebo translokací určitých kódujících úseků DNA. Odhaduje se, že u nepříbuzných jedinců se liší počty genů v asi 0,4% genomu. Nové mutace, k nimž dochází během vývoje, mohou zapříčinit rozdíly v jemné struktuře (polymorfismu) i v počtu genů dokonce u původně identických jedinců, jakými jsou jednovaječná dvojčata. Změny v počtu kopií některých genů mohou být spojeny s určitým onemocněním – např. u jednoho typu nádoru plic byl zjištěn zvýšený počet kopií genů kódujících receptor pro epidermální růstový faktor.

Expresi genů ovlivňují **epigenetické změny**, k nimž dochází buď v DNA (methylace cytosinových zbytků) nebo v histonech – bázičských bílkovinách, kolem nichž jsou řetězce DNA ovinuty. Tyto změny mohou ztížit nebo naopak ulehčit transkripci genů.

Kromě toho má na expresi genů vliv již zmíněná **RNA interference**. Situaci dále komplikuje i možnost rozdílného sestřihu genů při transkripci DNA a postranlační modifikace proteinů.

Zatímco genů je jen něco přes 20 tisíc, díky jejich rozdílnému sestřihu DNA nebo postranlačním modifikacím je kódovaných bílkovin mnohem více. Individuální odchylky při expresi genů a postranlačních modifikacích proteinů (např. rozdíly v připojené cukerné složce glykoproteinů ovlivňující imunitní charakteristiky) závisí na řadě faktorů: typu tkáně, věku, pohlaví apod., ale třeba i na životním stylu. Rostoucí znalosti molekulární biologie a pokroky bioanalytických technik umožňují definovat a zjišťovat stále více takových individuálních odchylek. Počet prováděných genetických vyšetření roste, genomika a proteomika postupně pronikají do biochemické diagnostiky. Jejich využívání je jedním z předpokladů zavedení tzv. **individualizované terapie**, podávání léků "na míru", s níž se počítá v brzké budoucnosti.

Při klinických zkouškách léčiva se individuální odchylky do jisté míry opomíjejí. Ze souboru výsledků se zjišťují průměrné hodnoty pro průměrného pacienta, který však může být vybrán v rámci určité skupiny (podle pohlaví, věku, charakteru onemocnění apod.). Výsledky proto mají **statistický charakter**. U reálných pacientů jsou splněny s větší či menší **pravděpodobností**.

Pravděpodobnostní charakter údajů o léčivech je třeba mít neustále na paměti. Farmakodynamické nebo farmakokinetické zákonitosti jsou platné pro velké soubory, nemusí však platit pro jednotlivce. Lékaři proto mají účinky léků na pacienta sledovat a podle výsledků terapie individuálně upravovat.

Po podání léčiva se v systému ustaví dynamická rovnováha mezi volným léčivem, neobsazenými cílovými strukturami a léčivem navázaným na cílové struktury. Čím lépe přitom interaguje léčivo s cílovou strukturou, tedy čím vyšší je jeho **afinita** k cílové struktuře, tím více je tato rovnováha posunuta ve prospěch komplexu léčivo-cílová struktura a tím více se může projevit účinek.

Mírou afinity léčiva k cílové struktuře je disociační konstanta komplexu léčivo-cílová struktura K_D ($K_D = K_A$). Čím je afinita vyšší, tím snáze léčivo interaguje s cílovou strukturou. Malá afinita znamená, že koncentrace léčiva musí být vyšší, aby došlo k interakci. Většina léčiv má disociační (afinitní) konstanty řádu $10^{-10} - 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Protože jde o velmi malé koncentrace, vyjadřuje se někdy afinita léčiv k cílové struktuře pomocí hodnoty pD ($= -\log K_D$).

Molekuly léčiva nemusí interagovat jen s jedinou cílovou strukturou. Interakce s různými cílovými strukturami vyvolávají různé biologické odezvy. Jejich intenzita závisí na afinitě léčiva k jednotlivým cílovým strukturám.

Někdy mohou různé interakce zvýšit žádoucí účinek nebo mohou umožnit využití léčiva v různých indikacích. Často se však stává, že interakce molekul léčiva s jednou cílovou strukturou vyvolá žádoucí terapeutický účinek, ale interakce s jinou se naopak projeví nežádoucím toxickým efektem.

Nežádoucí účinek ale mohou přinášet i terapeuticky účinné interakce léčiva s jednou cílovou strukturou.

Tak např. blokáda receptorů pro epidermální růstový faktor (EGFR) využívaná v protinádorové terapii, protože brzdí růst některých nádorů, působí nepříznivě na kožní buňky. Asi 80% léčených pacientů pak trpí vyrážkami a u 10-15% vyžadují projevy kožní toxicity doplňkovou léčbu nebo i přerušeni léčby.

Cílem práce farmakochemiků je připravovat léčiva, která mají co nejvyšší terapeutický a co nejnižší toxický účinek. Zcela eliminovat nežádoucí účinky se ale nedaří a vždy je třeba proto třeba u každého léčiva zvažovat poměr mezi přínosy a riziky, které jeho podání pacientovi přináší.

V r. 1920 postuloval Clark teorii, podle níž biologická odezva na podání léčiva závisí na množství obsazených cílových struktur (receptorů). Jakmile jsou veškeré cílové struktury obsazeny, pak už další zvyšování dávky (správněji: koncentrace léčiva v krevní plasmě) nemůže vést k zesílení odezvy. Zbytečné zvyšování dávky může naopak způsobit nepříjemné zvýšení výskytu nežádoucích vedlejších účinků. Závislost odezvy na dávce (koncentraci) léčiva má v ideálním případě typický sigmoidní tvar: Optimální terapeutický účinek bývá dosahován při podání takových dávek léčiva, které sice nevyvolávají maximální účinek, ale při nichž se ještě neprojeví výrazněji vedlejší účinky. Např. krevní tlak pacienta by se měl pohybovat v určitém optimálním rozmezí. Maximální účinek léků snižujících krevní tlak může být spojen s poklesem tlaku na příliš nízké hodnoty, které už nestačí k tomu, aby krev pronikla do všech kapilár. Předávkování tak může způsobit výpadky v zásobování důležitých orgánů kyslíkem a živinami.



Do popředí se proto dostává otázka určení **optimální terapeutické dávky** léčiva.

Dávka se obvykle vyjadřuje v mg léčiva na kg hmotnosti nebo na m² povrchu těla. Povrch těla člověka s hmotností 70 kg přitom činí asi 1,7 m². Je-li léčivo podáno v **podprahové dávce**, pak je jeho koncentrace příliš nízká a požadovaný účinek se neprojeví. Je-li naopak koncentrace léčiva příliš vysoká, pak se sice může projevit výrazný terapeutický efekt, současně však mohou být i nežádoucí vedlejší účinky natolik silné, že nad terapeutickým přínosem převáží. V tomto případě se hovoří o **toxické dávce** (TD), jejímž krajním případem je **letální dávka** (LD), která pacienta usmrtí. **Účinná (efektivní) dávka** (ED) je dávka, která vyvolá optimální terapeutický účinek. Aby byly omezeny individuální odchylky, určují se tyto dávky u většího souboru jedinců a stanoví se obvykle tak, že se zjistí dávka, kdy se účinek projeví v 50% případů.

Velikost nebezpečné dávky se zjišťuje u pokusných zvířat, např. LD₅₀ představuje dávku, která se projeví úhynem 50% zvířat. Hodnoty zjištěné u pokusných zvířat pak slouží k odhadu bezpečných dávek pro klinické zkoušky u člověka.

Ukazatelem bezpečnosti léčiva je **terapeutický index**, tj. poměr LD₅₀/ED₅₀ (resp. TD₅₀/ED₅₀). Podaná dávka léčiva by měla být taková, aby se jeho plasmatická koncentrace pohybovala potřebnou dobu v **terapeutickém rozmezí** („terapeutickém okénku“), tj. v intervalu, kde je dosažen příznivý poměr mezi požadovaným účinkem a toxickým působením.

Vztahování účinku léčiva na dávku není vždy dostatečně vypovídající, protože individuální odchylky ve farmakokinetických parametrech (viz dále) mohou způsobit, že při stejné dávce léčiva je v určitém čase koncentrace léčiva v krevní plasmě různých pacientů různá. Při preklinických a klinických studiích se proto zkoumá účinek léčiva v závislosti na jeho koncentraci v krevní plasmě (C_p).

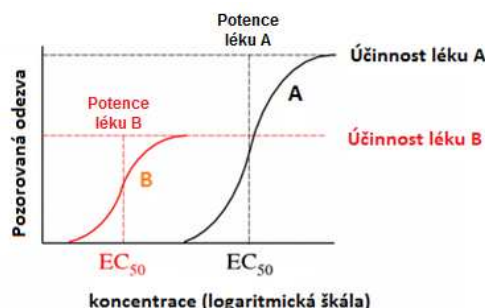
Při zkouškách nového léčiva se sleduje biologická odezva v závislosti na podané dávce. Míra schopnosti léčiva vyvolat určitou intenzitu biologické odezvy je nazývána **potence**, česky někdy také **síla**.

Termín **síla** je ale poněkud zavádějící, protože farmaceuti stejným termínem také označují obsah účinné látky v určité lékové formě, např. v tabletách. Ty mohou být vyráběny o různé „síle“ pro podání různým kategoriím pacientů, kdy množství účinné látky obsažené v tabletě činí např. 10 mg, 25 mg, 50 mg a 80 mg.

Léčiva s velkou potencí vyvolávají výraznou odezvu už při nižších koncentracích, zatímco k vyvolání odezvy u léčiv s malou potencí je nutná koncentrace vyšší. **Potence je úměrná k afinitě a účinnosti**.

Např. mezi léčivy tlumícími bolest se vysokou potencí vyznačuje morfin, zatímco ibuprofen má potenci jen malou.

Při srovnávání účinků různých látek vyvolávajících určitou biologickou odezvu se ukázalo, že rozdílné mohou být nejen dávky (koncentrace) vyvolávající určitou odezvu, ale i velikost této odezvy. Ta je označována jako **účinnost**¹.



¹ Poznámka: Anglický termín pro **účinnost** léčiva je *efficacy*. Podobný termín *effectiveness*, kterému by mohla odpovídat **efektivnost**, se vztahuje k účinnosti za reálných podmínek. Léčivo, které je sice velmi účinné, může mít takové vedlejší účinky, že může být podáváno jen ve snížených dávkách. Efektivnost je tedy mírou upotřebitelnosti léčiva a může tedy být menší než účinnost. Třetí podobné anglické slovo *efficiency*, česky zde snad **užitkovost**, vyjadřuje poměr mezi vstupy a výstupy systému a je spíše ekonomickým termínem, u léčiv to může být např. poměr mezi cenou a dosaženým terapeutickým účinkem.

Např. léčivo A vyvolává téměř dvojnásobnou odezvu (např. více snižuje krevní tlak) ve srovnání s léčivem B (červený graf), je tedy účinnější. Má ale podstatně menší afinitu k cílové struktuře a tedy i potenci, takže k dosažení 50% maximální odezvy musí být jeho koncentrace v plasmě podstatně vyšší.

Jak už bylo řečeno, podle Clarkovy teorie účinnosti závisí biologická odezva (E) na stupni obsazenosti cílových struktur (T) léčivem (L).

Maximální odezva E_{\max} je dosažena, jsou-li obsazeny všechny cílové struktury. E_{\max} je tedy úměrná celkové koncentraci cílových struktur $[T_T]$. Poměr zjištěné odezvy k maximální odezvě pak bude rovný poměru množství obsazených cílových struktur k jejich celkovému množství:

$$\frac{E}{E_{\max}} = \frac{[TL]}{[T_T]}$$

Pro disociační konstantu K_D komplexu léčivo – cílová struktura platí:

$$K_D = \frac{[L][T]}{[TL]}$$

Celkové množství (koncentrace) cílových struktur je: $[T_T] = [T] + [TL]$.

Z těchto vztahů lze odvodit:

$$K_D = \frac{[L]([T_T] - [TL])}{[TL]} = \frac{[L][T_T]}{[TL]} - \frac{[L][TL]}{[TL]} = \frac{[L][T_T]}{[TL]} - [L]$$

$$K_D + [L] = \frac{[L][T_T]}{[TL]}$$

$$\frac{K_D + [L]}{[L]} = \frac{[T_T]}{[TL]}$$

Dosazením do první rovnice obdržíme:

$$\frac{E}{E_{\max}} = \frac{[TL]}{[T_T]} = \frac{[L]}{K_D + [L]}$$

Pro 50% maximální odezvy ($E/E_{\max} = 0,5 = EC_{50}$) pak odvodíme, že $K_D = EC_{50}$. To znamená, že koncentrace léčiva, která vyvolá 50% maximálního účinku je rovna disociační konstantě komplexu cílová struktura-léčivo a tedy i afinitní konstantě. EC_{50} je proto vhodnou mírou pro vzájemné porovnávání potence různých léčiv. Účinné bývají běžně mikro až nanomolární koncentrace léčiv, tedy řádově $10^{-6} - 10^{-9}$ M. Někdy se proto místo hodnoty EC_{50} používá její záporný logaritmus pD_2 ($pD_2 = -\log K_D = -\log EC_{50}$).

Clarkův model účinnosti je však jen velkým zjednodušením situace. Je vhodný snad v případech, kdy cílovými strukturami jsou extracelulární receptory, ale ani přitom nedokáže vysvětlit všechny experimentálně zjišťované skutečnosti.

V 50. letech minulého století proto modifikovali Clarkův model nezávisle na sobě Ariens a Stephenson. Rozdíl v chování různých léčiv vysvětlili tím, že proces vyvolání biologické odezvy je dvoustupňový. V prvním stupni dochází k vazbě léčiva na cílovou strukturu a až v druhém kroku je iniciována odezva. Druhý krok je řízen schopností komplexu cílové struktury s léčivem odezvu vyvolat. Ariens tuto schopnost označoval jako vnitřní aktivitu (intrinsic activity) α a zavedl pojem úplných agonistů ($\alpha=1$), parciálních agonistů ($0 < \alpha < 1$) a antagonistů ($\alpha=0$). Stephenson předpokládal, že vazba ligandu na cílovou strukturu vyvolá stimul (S), jehož intenzita závisí na afinitě léčiva k cílové struktuře a jeho účinnosti E (pro níž zavedl termín efficacy). Čím vyšší je účinnost, tím větší je odezva a tím nižší dávka léčiva je zapotřebí k vyvolání maximálního účinku. V r. 1961 formuloval Paton „rychlostní“ teorii účinnosti. Podle této teorie stimul vzniká jen při obsazení volných vazebných míst cílových struktur. Obsazení vazebného místa je spojeno s konformační změnou, která spouští kaskádu událostí vyvolávajících biologickou odezvu. Pokud zůstává vazebné místo obsazeno, k další odezvě nedochází. (Teorii lze přirovnat ke hře na klavír. Tón zazní jen při stisknutí klávesy, pak už dál nezní, i když zůstává klávesa stisknuta. Původní Clarkova teorie může přitom být analogicky přirovnána ke hře na varhany, kdy tón zní po celou dobu stisku klávesy). Podle Patona nezávisí účinek na množství cílových struktur a jejich obsazenosti, ale na rychlosti, jakou se léčivo váže na cílovou strukturu a jakou je z ní uvolňováno. Účinnost pak má být závislá na rychlostních konstantách asociace a disociace ligandu, korelace však není dobrá. Dalším pokusem o vysvětlení nesouladu některých výsledků s Clarkovou teorií byl model dvou stavů. Podle tohoto modelu mohou být cílové struktury buď v aktivním – relaxovaném (R) stavu nebo inaktivním – rigidním stavu (tensed state, T), mezi nimiž je dynamická rovnováha. Vazba léčiva může posunout rovnováhu buď k relaxovanému stavu, čímž je biologická odezva zesílena, nebo k rigidnímu stavu, kdy je odezva naopak potlačena. Posledním příspěvkem k receptorové teorii účinnosti léčiv je model ternárního komplexu, který popisuje interakce ligandu, receptoru a G-proteinu a počítá nejen s pouhým soutěžením dvou ligandů o receptor, ale i s možnostmi jejich vzájemného ovlivňování.

Farmakokinetika

Farmakokinetika se zabývá působením organismu na léčivo, tj. osudem léčiva v organismu od podání až po jeho vyloučení. Farmakokinetika vychází z předpokladu, že biologická odezva, a to jak žádoucí terapeutická odezva, tak i vedlejší účinky, závisí na koncentraci léčiva v místě jeho cílové struktury.

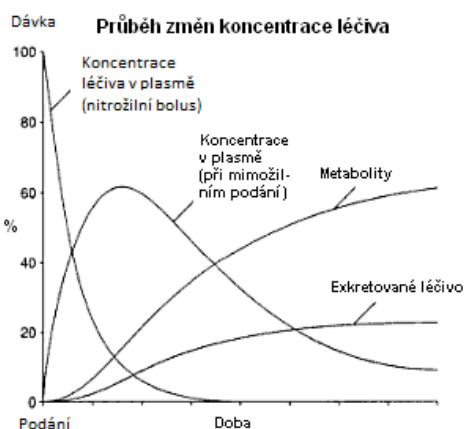
Mnoho látek se slibnými biologickými účinky se nikdy nestane léčivem. Je to proto, že jim chybí určité farmakologické vlastnosti, které musí léčiva splňovat (v angličtině: *drug-like properties* nebo také *druggability*, druhý termín se ale používá i pro označení charakteru cílových struktur – schopnosti interagovat s léčivem). Vedle dobrých farmakodynamických vlastností musí mít také takové farmakokinetické parametry, které zaručí, že se po podání dostane v dostatečné koncentraci do cílové tkáně, tam pronikne do buněk a poté, co se projeví jeho účinek, bude organismem eliminováno.

Studium farmakokinetiky má velký význam především pro správné dávkování léčiva. Koncentrace léčiva na cílovém místě není určena samotnou dávkou, ale závisí na **absorpci** léčiva organismem po podání, jeho **distribuci** v organismu krevním oběhem, **metabolismu** a vylučování z organismu, **exkreci**. Někdy se tyto farmakokinetické faktory souhrnně označují zkratkou **ADME**.

Většina léčiv se dostává k místu působení **krevním oběhem**.

Přímé podání léčiva do krevního oběhu, ať již okamžitě formou **jednorázové nitrožilní injekce** (tzv. bolus), nebo postupně formou **infuze**, může být pro pacienty nepohodlné a nepříjemné. Často vyžaduje asistenci zdravotníka a v případě infuzí mnohdy i pobyt pacienta na lůžku.

Pro pacienta výhodnější jsou **neinvasivní způsoby podání**, především ústy (perorální podání – tablety, kapsle, sirupy a suspenze), popř. podání přes sliznice (čípky, nosní kapky, spreje a inhalační roztoky) nebo přes kůži (masti, krémy, tinktury, léčivé náplasti). Přitom se ale do krevního oběhu většinou nedostane celá podaná dávka léčiva. S cílovými strukturami pak může interagovat jen její určitý podíl. Jak velký tento podíl je, závisí na farmakokinetických vlastnostech léčiva.



Farmakologickým parametrem, na němž závisí koncentrace léčiva v krvi při neinvasivním podání (popř. i při některých způsobech injekčního podání, jako jsou podkožní nebo nitrosvalové injekce), je **absorpce** léčiva.

Většina perorálně (ústy) podaných léčiv je absorbována v zažívacím traktu. Aby se léčivo dostalo do krevního oběhu, musí nejprve projít střevní sliznicí. Látky s malou molekulovou hmotností (≤ 200) se přitom mohou „protlačit“ mezi buňkami střevních stěn. Větší molekuly, jaké ovšem má většina léčiv, musí nejprve proniknout do buněk lemujících střevní stěnu a odtud do krevních kapilár. Léčivo přitom musí opakovaně procházet buněčnými membránami, které jsou tvořené fosfolipidickou dvouvrstvou bránící průchodu polárních látek.

Molekuly různých látek mohou pronikat do buňky čtyřmi různými způsoby: aktivním transportem pomocí bílkovinných přenašečů, průstupem přes „vodní kanálky“ v buněčných stěnách, difuzí přes lipidickou dvojvrstvu buněčné membrány a konečně endocytózou.

Aktivní transport molekul léčiva do buňky pomocí transportních bílkovin byl zmíněn v souvislosti s výčtem cílových struktur léčiv. **Průstup léčiv vodními kanálky do buněk** se významněji neuplatňuje, protože tyto kanálky (póry) mají menší průměr (0,4 nm), než je průměr molekul většiny léčiv (kolem 1 nm). **Endocytóza** (pinocytóza) spočívá ve vchlípení části buněčné membrány s okolní extracelulární tekutinou obsahující roztok léčiva do buňky. Vchlípený útvar se může uzavřít buněčnou membránou, takže se v buňce vytvoří jakýsi váček naplněný tekutinou. Obal váčku tvořený zbytkem buněčné membrány se pak v buňce rozpadne a tekutina s léčivem se uvolní. Takto pronikají do buněk vysokomolekulární léčiva.

Hlavním mechanismem průniku léčiva je **difuze přes lipidickou dvojvrstvu buněčné membrány**.

Jde o pasivní transport, jehož hnací silou je gradient koncentrace léčiva vně a uvnitř buňky. Aby léčivo mohlo membránou do buněk pronikat, musí mít dobře vyváženou polaritu – musí být natolik polární, aby bylo dostatečně rozpustné ve vodném prostředí tělních tekutin, současně však natolik lipofilní (hydrofobní), aby se ve vnitřní lipidické části dvojvrstvy buněčné membrány „rozpouštělo“. Lipofilita léčiva se obvykle charakterizuje jeho rozdělovacím koeficientem mezi n-oktanolem a vodou (P), n-oktanol přitom slouží jako modelová látka simulující lipidy buněčné stěny, které mají podobnou polaritu.

Požadavky na vlastnosti léčiva z hlediska absorpce udává empirické „**pravidlo pěti**“.

Pravidlo formuloval Christopher Lipinski z výzkumných laboratoří firmy Pfizer. I když bylo publikováno poměrně nedávno (1997), rychle se mezi farmakochemiky rozšířilo a stalo užitečným kritériem pro posuzování pravděpodobnosti uplatnění různých látek jako perorálních léčiv. Pro získání lepších předpovědí použitelnosti léčiv bylo také různě modifikováno.

Pravidlo pěti říká, že by léčivo nemělo mít molekulovou hmotnost přes 500, nemělo mít více než 5 skupin, které jsou při tvorbě vodíkových můstků donory a ne více než 10 skupin, které jsou akceptory a logaritmus jeho rozdělovacího koeficientu mezi n-oktanolem a vodou ($\log P$) by měl být menší než 5.

Léčiva s $\log P > 5$ jsou špatně rozpustná ve vodném prostředí biologických tekutin. Přestože mohou v důsledku své vysoké lipofility snadno a rychle pronikat přes buněčné membrány, jejich špatná rozpustnost může negativně ovlivnit časový průběh absorpce. Jejich aktuální koncentrace v krevní plasmě pak nemusí postačovat k vyvolání požadovaného účinku. Přes buňky sliznice zažívacího traktu mohou procházet jen látky, které jsou rozpuštěné ve vodném prostředí tekutin zažívacího traktu (objem asi 250 ml, pH 1-7,5). Rozpouštění je rovnovážným procesem. Je-li část látky nerozpuštěná, pak snížení její koncentrace v roztoku po jejím průchodu vyvolá přechod dalších molekul do roztoku, proces absorpce se tím ale může zpomalit.

Vysoce polární léčiva, jejichž rozdělovací koeficient je příliš malý (někdy dokonce záporný), difundují přes membrány buněk sliznice zažívacího traktu jen neochotně, takže jejich absorpce je velmi pomalá. Aby se taková léčiva dostala k cílovým tkáním v potřebné koncentraci, bývají podávána injekčně přímo do krevního oběhu. I když je „pravidlu pěti“ věnována značná pozornost v moderních učebnicích farmakochemie v kapitolách o vztazích mezi strukturou a účinností léčiv (viz FarmChem 04), je třeba si uvědomit, že je jen určitou idealizací: Analýza provedená u používaných léčiv zahrnutých do CMC databáze např. ukázala, že v 80% případů se $\log P$ se pohyboval mezi 0,4 do 5,6, průměr činil 2,5.

Výjimkou z pravidla pěti jsou léčiva, která mohou do cílových buněk pronikat **aktivním transportem**, jehož se účastní bílkoviny procházející buněčnou membránou. Transportní bílkoviny jsou substrátově specifické. Podílejí se např. na transportu polárních antibiotik, fungicidů, srdečních glykosidů apod. Jak již bylo ukázáno, po interakci se substrátem rozpuštěným v extracelulární tekutině změní transportní bílkovina konformaci, na vnější straně se uzavře, uvnitř buňky otevře a léčivo uvolní.

Některá léčiva s velkými molekulami nebo léčiva navázaná na polymery nebo na nanočástice mohou do buněk pronikat i tak, že dojde k vchlípení (invaginaci) buněčné membrány s roztokem léčiva (pinocytóza) nebo s pevnou částicí (fagocytóza). Vchlípená část stěny se v buňce uzavře za vzniku váčku (vezikulu), buněčné enzymy zbytky membrány rozloží a léčivo z váčku uvolní.

Léčiva se mohou do krevního oběhu dostávat nejen injekčně nebo absorpcí přes sliznice zažívacích orgánů, ale i **přes další sliznice** (nosní, ústní, plicní a poševní) a také **přes kůži**.

Přitom se léčivo po absorpci vyhne tzv. prvnímu průchodu játry (viz dále) a není proto ještě před vstupem do krevního oběhu zčásti inaktivováno jaterními enzymy. V případě absorpce v plicích je výhodou i to, že plicní tkáň je propustná i pro větší molekuly (zkoušeno je např. inhalační podání insulinu). K absorpci přes pokožku dochází při aplikaci dermatologických přípravků – mastí, krémů atd. nebo léčivých náplastí. Taková aplikace je výhodná, má-li léčivo působit místně, může však být využita i k podání léčiv působících na celý organismus. Absorpce přes pokožku je však pomalá a málo účinná (na rozdíl od sliznic se v průběhu evoluce kůže vytvořila jako ochrana před průnikem látek z vnějšího prostředí do organismu).

Jakmile léčivo pronikne do krevního oběhu, dochází k jeho **distribuci** v organismu.

Léčivo, které je rozpuštěné v krevní plasmě, se přitom dostává do kapilár zásobujících tkáň krví. V některých orgánech je síť kapilár hustší, takže jsou krví více zásobeny než jiné. Distribuce léčiva v tkáních proto není rovnoměrná. Póry ve stěnách kapilár v tkáních pak pronikají molekuly léčiva spolu s živinami a kyslíkem do mimobuněčné tekutiny a odtud se dostávají do buněk tkáň. Kromě krve mohou léčivo k orgánům distribuovat i jiné tělesné tekutiny, jako je mozkomíšni mok, plodová voda nebo nitrooční tekutina.

Při distribuci léčiva krevním oběhem hraje významnou roli skutečnost, že některá léčiva se mohou **adsorbovat na plasmatické bílkoviny** (albumin, α_1 - kyselý glykoprotein, lipoproteiny a globuliny) i další složky krve. V krvi se pak ustaví rovnováha mezi adsorbovaným a volným léčivem.

Ve většině případů může pouze volné léčivo vyvolat farmaceutickou odezvu a být eliminováno. Adsorbované léčivo přitom slouží jako určitý zásobník, z něhož se volné léčivo postupně uvolňuje, když jeho koncentrace v krvi po průniku do cílových buněk nebo metabolických přeměnách klesne. Adsorpce tak může prodloužit biologický poločas léčiva (viz dále) a potlačit jeho eliminaci z organismu, může ale také zpomalit jeho průnik do cílových tkání a tím snižovat jeho koncentraci v buňkách.

Od krevních kapilár běžných tkání se liší kapiláry zásobující krví mozek. Ty tvoří tzv. **hematoencefalickou bariéru**. Jejím úkolem je chránit citlivou mozkovou tkáň před nežádoucími účinky některých škodlivých látek a přitom nebránit přísunu živin a kyslíku.

Buňky stěn kapilár jsou v ní uspořádány velmi těsně, takže mezi nimi prakticky nejsou žádné póry vhodné pro průchod molekul léčiva. Navíc jsou kapiláry v mozku lemovány buňkami, jejichž stěny mají zvýšenou lipofilitu. Překonat hematoencefalickou bariéru proto mohou jen léčiva s vysoce lipofilním charakterem nebo léčiva, která mohou být „propašována“ do mozkové tkáně pomocí transportních proteinů. Mají-li být použita jiná léčiva, pak musí být aplikována do mozkomíšního moku, podle nových poznatků by mohl být k překonání hematoencefalické bariéry využit fokusovaný ultrazvuk.

Jiná přirozená tkáňová bariéra organismu, **placentální bariéra**, která odděluje krev matky od krve plodu, je naopak vysoce propustná.

Mohou proto přes ni snadno procházet živiny potřebné pro růst embrya a také případně být odváděny jejich rozkladné produkty. Placentální bariérou pronikají však stejně snadno i léčiva. Embryo tak může být vystaveno účinku léků, které těhotná žena užívá. Snadno proniká placentální bariérou také alkohol, nikotin nebo drogy. Ty pak mohou značně poškodit embryo, které nemá vyvinuté žádné detoxifikační mechanismy.

Pokud cílové struktury léčiva nejsou na povrchu buněk (receptory apod.), ale až uvnitř buňky, pak musí být molekuly léčiva dostatečně lipofilní (hydrofobní), aby mohly z mimobuněčné tekutiny proniknout přes buněčné membrány do tkáňových buněk. Přitom se uplatňují již zmíněné mechanismy absorpce. U některých silně polárních léčiv se k průniku do buněk může využít určitý trik: Na polární skupiny léčiva se naváží lipofilní substituenty. Navázáním vzniknou **profarmaka** ("**proléčiva**", **prodrug**), prekurzory léčiv, které jsou natolik lipofilní, že přes buněčné membrány již mohou pronikat. Sama o sobě mohou být profarmaka neúčinná nebo jen málo účinná, účinné polární léčivo z nich vznikne až uvnitř buňky po odštěpení lipofilních substituentů působením buněčných enzymů.

Příkladem mohou být fosfonátová analoga nukleotidů adefovir a tenofovir, léčiva proti hepatitidě B a AIDS vyvinutá prof. Holým na ÚOChB AV ČR. Ta jsou vysoce polární, takže nemohou v dostatečné koncentraci proniknout membránami do buněk. Aplikují se proto jako estery pivaloyloxymethanolu (adefovir dipivoxil) nebo isopropylloxymethanolu (tenofovir disoproxil), které se po proniknutí do buněk hydrolyticky rozštěpí na účinné látky. Charakter profarmak má asi 16% všech povolených léčiv.

Léčivo je v organismu distribuováno v tělních tekutinách, jejichž základem je voda. Celkový obsah vody v organismu dosahuje 60-70% tělesné hmotnosti.

Voda je přitom obsažena v různých prostorách, kompartmentech. Největší množství vody je obsaženo uvnitř buněk, pak v extracelulární tekutině. V důležitém kompartmentu, krevní plasmě, je množství vody odpovídající asi 4,4% tělesné hmotnosti.

Koncentrace léčiva v plasmě (C_p) je úměrná celkovému množství léčiva v organismu (D):

$$C_p = D/V_d$$

kde V_d označuje **zdánlivý distribuční objem**, obvykle vyjadřovaný v litrech na kg hmotnosti.

Je to fiktivní objem tekutiny, v němž by se léčivo vyskytovalo, kdyby jeho koncentrace byla ve všech částech těla stejná jako v plasmě. Hodnota V_d může přesáhnout nejen objem krve, ale i celkový objem vody v těle. Vysoká hodnota znamená, že se léčivo kumuluje v tkáních (např. svazech nebo tukové tkáni), ale v krvi se téměř nevyskytuje. Malá hodnota naopak nasvědčuje tomu, že největší podíl léčiva je vázán v krevní plasmě. Léčivo bývá v takovém případě ve značné míře absorbováno na plasmatické bílkoviny. Hodnotu V_d lze vypočítat tak, že se celkové množství léčiva v organismu nahradí podanou dávkou (D_0), změří se koncentrace léčiva v plasmě v několika časových intervalech a pak se extrapolací zjistí C_{p0} , tj. hodnota koncentrace v čase t_0 .

V organismu podléhají léčiva různým **metabolickým přeměnám** katalyzovaných enzymy. Nejčastěji jde o **metabolickou inaktivaci**, která ovlivňuje koncentraci léčiva a jeho vylučování z organismu.

Část léčiv se může z organismu vylučovat v nezměněné formě, většina je však vylučována až po metabolické přeměně. Některá léčiva mohou být degradována již enzymy obsaženými v krevní plasmě nebo tkáních, klíčovou roli v metabolismu léčiv mají však jaterní enzymy. Ty katalyzují reakce, jimiž se zvyšuje polarita molekul. Zvýšení polarit usnadňuje eliminaci léčiva, protože polárnější látky jsou z těla vylučovány snáze než látky méně polární.

Jaterní enzymy mohou část perorálně podaných léčiv inaktivovat, ještě dříve než proniknou do krve.

Léčiva absorbovaná ze zažívacího traktu se nejprve dostanou do vratnicové (portální) žíly, která odvádí krev ze střeva do jater. V játrech se portální žíla rozdělí do systému kapilár, jimiž léčivo rozpuštěné v krevní plasmě prostupuje do jaterní tkáně. Až odtud se pak dostane do rozvětveného systému kapilár jaterní žíly, který je součástí krevního oběhu. Určité množství léčiva ale může být předčasně metabolizováno už při tomto prvním průchodu játry. Léčiva podávaná injekčně, přes nosní nebo ústní sliznici, kůži apod. se „efektu prvního průchodu“ játry vyhnou.

Metabolické přeměny léčiva v játrech zvyšují polaritu látky. Při **reakcích fáze I** dochází k různým oxidativním reakcím, hydrolyze amidů a esterů, redukci nitro a azosloučenin a reduktivní dehalogenaci.

Oxidativní reakce jsou katalyzovány skupinou jaterních enzymů nazývaných **cytochromy P 450**. Jsou to červené hemoproteiny obsahující porfyrinový kruh s centrálním atomem železa. Číselné označení odpovídá vlnové délce jejich absorpčního pásu. Je známo nejméně 18 rodin těchto enzymů. Cytochromy jsou schopné oxidovat methylové skupiny na primární alkoholy, demetylovat aminy, oxidovat aromatické uhlovodíky na fenoly a aromáty nebo látky s dvojnými vazbami na epoxidy.

Primární úlohou cytochromů je odstraňování škodlivých látek z organismu. Substrátem mohou být vedle léčiv i látky obsažené v potravě nebo i chemikálie z životního prostředí. Jejich role přitom není jen pozitivní, cytochromy např. oxidují polycyklické aromatické uhlovodíky na deriváty s epoxidovými skupinami, které mohou vyvolávat nádorové bujení.

Reakce fáze II zahrnují enzymově katalyzovaný vznik konjugátů léčiva s vysoce polárními látkami.

Konjugace dále zvyšuje polaritu metabolitů vznikajících při reakcích fáze I. Přitom jde např. o navázání kyseliny glukuronové O- nebo N-glykosidickou vazbou na hydroxylové nebo aminové skupiny léčiv nebo jejich metabolitů. Reakci katalyzuje enzym **UDP-glukuronotransferasa** přenášející zbytek kyseliny glukuronové z uridindifosfoglukuronátu. Hydroxylové skupiny některých steroidů mohou být ve fázi II sulfátovány reakcí s 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátem (PAPS) katalyzovanou **sulfotransferasami**. Epoxidy vznikající při reakcích fáze I působením cytochromů P450 na aromáty reagují s -SH skupinou cysteinového zbytku tripeptidu glutathionu za vzniku polárních aduktů. Glutathion se může vázat i na chinony vznikající metabolickou oxidací některých substituovaných aromatických látek.

Zastoupení jednotlivých cytochromů P450 i dalších enzymů podílejících se na metabolických přeměnách léčiv v organismu i jejich aktivita jsou značně variabilní a vysoce individuální. Důsledkem pak je, že metabolismus léčiv se u jednotlivých pacientů může výrazně odlišovat.

U někoho je léčivo metabolizováno velmi rychle, takže jeho hladina v organismu je pak nízká a k dosažení potřebného účinku je třeba podat vyšší dávku nebo dokonce jiný lék. U jiného pacienta může být naopak odbourávání zpomalené. Hladina léčiva je pak u něho dlouho vysoká, což může u léků s úzkým terapeutickým intervalem (jako je např. warfarin) vést k předávkování a zvýšení rizika nežádoucích vedlejších účinků. Aktivita různých cytochromů P 450 není ale určena jen zmíněnými rozdíly, ale může ji ovlivnit i přítomnost látek, které cytochromy aktivují nebo naopak inhibují. Tak např. barbituráty aktivitu cytochromů zvyšují, zatímco např. léčiva proti žaludečním vředům ji snižují. Při současném podání více léčiv pak může být hladina každého z nich v krvi jiná, než když se lék podá samostatně. Dochází k **lékovým interakcím**, které někdy mohou být pro pacienty i nebezpečné. Farmakochemici se proto snaží, aby nová léčiva aktivitu cytochromů P 450 ani nezvyšovala, ani neinhibovala.

Vedle syntetických léčiv mají na aktivitu cytochromů vliv i látky obsažené v některých léčivých bylinách (např. třezalka) nebo potravinách (např. růžičkové kapustě nebo šťávě grapefruitu).

Exkrece je proces vylučování léčiva z organismu. Vylučována mohou být jak léčiva v nezměněné formě, tak i produkty jejich metabolických přeměn. Na exkreci se podílejí především ledviny, léčiva a jejich metabolity mohou však být z organismu vylučovány i přes pokožku nebo přes různé sliznice (potem, slinami, slzami), plicemi (dechem), žlučové cesty (stolicí), ale i přes mléčné žlázy.

V **ledvinách** se krev obsahující léčiva a jejich metabolity dostává z přírodní tepny do uzlíků kapilár nazývaných glomeruly, které zapadají do kanálků nazývaných nefrony. Krev je v glomerulách pod tlakem, který působí tak, že dochází k její ultrafiltraci. Přitom nejen krvinky, ale ani vysokomolekulární složky krve krevními kapilárami neprocházejí, zatímco nízkomolekulární látky, tedy i běžná léčiva a jejich metabolity nebo rozkladné produkty, ano. Dostávají se tak do moči, s níž pak z organismu odcházejí. Průstup látek stěnou kapilár při glomerulární ultrafiltraci nezávisí na jejich polárním nebo nepolárním charakteru. Nefron je však obklopen hustou sítí vlásečnic, přes jejichž stěny mohou být exkretované látky reabsorbovány a dostávat se tak se žilní krví zpět do krevního oběhu. Zde již polarita látek hraje důležitou roli. Je-li při metabolické přeměně polarita zvýšena, je reabsorpce metabolitu potlačena nebo k ní vůbec nedochází. Nezměněné léčivo se naopak reabsorbuje snadněji.

Přes **pokožku** může být potem exkretováno až 10-15% některých léčiv. **Plicní exkrece** je důležitá pro eliminaci plynů podávaných při anestezii, přes plíce jsou exkretovány i některé těkavé metabolity léčiv. Řada metabolitů vznikajících v játrech, především některé konjugáty s kyselinou glukuronovou, přechází do **žlučových cest**, odkud se dostávají do zažívacího traktu. Část může být v tenkém střevě rozštěpena a pak reabsorbována, většina však přechází do stolice. **Stolici** jsou exkretovány i ty podíly léčiva, které zůstaly při orálním podání neabsorbovány. Možnost exkrece léčiv v **mateřském mléce** má význam především z hlediska ochrany zdraví kojenců, protože vylučovaná léčiva a jejich metabolity mohou na nezralý organismus působit toxicky. Na to je třeba brát zřetel při předepisování léků kojícím matkám. Přes mléčné žlázy může být vylučován i alkohol, nikotin a návykové drogy.

Eliminace je nevratný proces odstranění léčiva z organismu. Eliminace zahrnuje jak metabolické přeměny léčiva na neúčinné metabolity, tak i exkreci.

Rychlost eliminace je důležitou charakteristikou ovlivňující způsob podání léčiva. Je-li příliš vysoká, je třeba léčivo podávat v krátkých intervalech nebo dokonce kontinuálně infuzí, aby jeho koncentrace v krvi neklesala pod prahovou hodnotu terapeutické dávky. Naopak, příliš pomalá eliminace může vést k tomu, že po dalším podání koncentrace léčiva překročí terapeutický interval a ve zvýšené míře se projeví nežádoucí vedlejší účinky.

Poměr rychlosti eliminace léčiva k jeho celkové koncentraci se označuje jako **clearance (CL)**:

$$CL = \frac{\text{Rychlost eliminace}}{C}$$

Celková clearance (CL_T) se týká eliminace léčiva z krve nebo krevní plasmy. Clearance má aditivní charakter a je tvořena příspěvky jednotlivých orgánů. Nejdůležitější místa eliminace léčiv jsou játra a ledviny. Celková clearance je proto součtem jaterní (hepatické) clearance (CL_H), ledvinové (renální) clearance (CL_R) a clearance ostatními orgány (CL_O).

$$CL_T = CL_H + CL_R + CL_O.$$

Každý člen přitom představuje součet clearance všech eliminačních procesů – hepatická clearance je např. součet metabolické clearance (CL_M) a žlučové (biliární) clearance (CL_B): $CL_H = CL_M + CL_B$. Clearance je také ovlivněna vazbou léčiva na plasmatické bílkoviny, protože vázané léčivo není k dispozici pro eliminační procesy.

Hodnotu clearance si lze představit jako takový objem krve v těle, který je během jednotky času zcela zbaven léčiva. Protože clearance závisí na tělesné hmotnosti, vyjadřuje se v cm^3 za minutu na kg. Vedle významu pro lékaře, kteří clearance musí brát v úvahu při určení režimu dávkování léčiva, je znalost jejich hodnot užitečná i pro farmakochemiky. Porovnání clearance různě substituovaných látek umožňuje posoudit vliv strukturálních změn na chování léčiva v organismu.

Celkovou clearance lze určit z měření časového průběhu změn koncentrace léčiva v krevní plasmě (C_p) po jednorázové dávce léčiva podané injekčně do žíly (intravenózní bolus):

$$CL_T = D / C_p \cdot t$$

Vynesením koncentrace proti času od podání se získá křivka, která graficky znázorňuje průběh eliminace léčiva. Plocha pod křivkou (AUC, area under curve) odpovídá celkovému množství léčiva, které se za čas t dostane do krevního oběhu. Toto množství je přímo úměrné podané dávce (D) a nepřímo úměrné celkové clearance:

$$AUC = D / CL_T$$

Rychlost eliminace vyjádřená jako časová změna (úbytek) celkového podaného množství D je přímo úměrná koncentraci léčiva v plasmě a celkové clearance:

$$dD/dt = CL_T \cdot C_p$$

Odtud:

$$dD = CL_T \cdot C_p \cdot dt$$

a po integraci:

$$D = CL_T \cdot C_p \cdot t,$$

přičemž

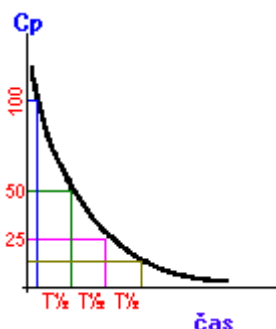
$$C_p \cdot t = AUC$$

Časovou závislost rychlosti eliminace léčiva na počáteční koncentraci lze ve většině případů popsat vztahem pro kinetiku prvního řádu:

$$C_p = C_0 \cdot e^{-k_{el} \cdot t}$$

kde k_{el} je rychlostní konstantou eliminace léčiva.

Z tohoto vztahu lze odvodit další důležitý farmakokinetický parametr, kterým je **biologický poločas léčiva** ($t_{1/2}$).



Biologický poločas je dobou, za níž poklesne koncentrace léčiva v plasmě na polovinu původní hodnoty. Čím vyšší je clearance, tím je pochopitelně biologický poločas kratší.

Naopak, mezi biologickým poločasem a distribučním objemem je přímá úměra:

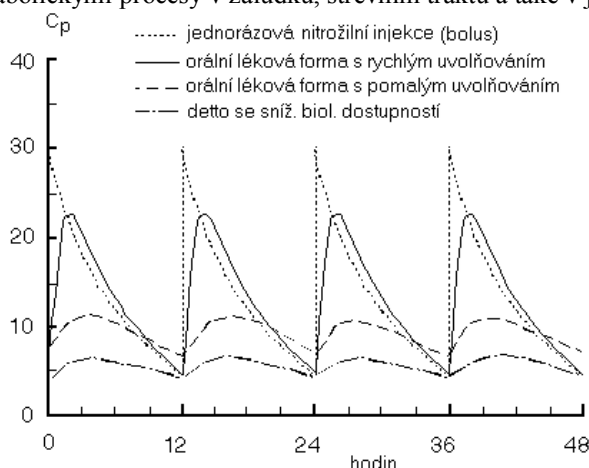
$$t_{1/2} = 0,693 \cdot V_d / CL$$

Podobný vztah platí nejen pro injekce, ale i pro léčiva podaná jiným způsobem, pouze se místo podané dávky počítá s dávkou léčiva, která se absorbuje. Tato dávka je určena **biologickou dostupností** definovanou jako podíl množství léčiva, které se po podání uvolní z lékové formy, vstřebá a v nezměněné formě dostane do krevního oběhu (F), k celkové podané dávce (D).

Jak bylo řečeno výše, celkové množství léčiva, které pronikne do krevního oběhu, je určeno velikostí plochy pod křivkou vyjadřující závislost plasmatické koncentrace na čase (AUC). Proto platí:

$$F = AUC/D$$

U léčiva podaného injekčně do žíly je biologická dostupnost rovna jedné. U léčiv podaných jinou cestou je biologická dostupnost nižší, protože léčivo nemusí být úplně vstřebáno nebo může být ještě předtím, než pronikne do krevního oběhu, zčásti eliminováno metabolickými procesy v žaludku, střevním traktu a také v játrech.

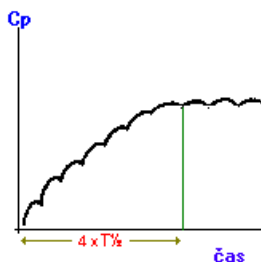


Časový průběh koncentrace léčiva v plasmě při opakovaném podání

Znalost farmakodynamických a farmakokinetických parametrů má velký význam nejen pro určení správné dávky léčiva, ale i rychlosti a/nebo četnosti jeho podání. Optimální účinek lze dosáhnout, jestliže plasmatická koncentrace léčiva se po dobu léčení pokud možná trvale pohybuje ve vymezeném terapeutickém intervalu. Tato koncentrace se označuje jako C_{ss} (od steady state = setrvalý stav). Rychlost dávkování přitom musí být shodná s rychlostí clearance:

$$\text{Rychlost dávkování} = CL \cdot C_{ss}$$

Vyrovnat rychlost dávkování a clearance lze pouze v případě infuzí. Při jednorázovém injekčním podání je třeba počítat s tím, že od doby podání plasmatická koncentrace léčiva klesá, při jiném podání (např. orální lékové formy – tablety, kapsle) koncentrace nejprve roste podle toho, jak se léčivo rychle absorbuje, pak v důsledku eliminace klesá. Podání léčiva je v takovém případě zapotřebí opakovat ve vhodných časových intervalech tak, aby bylo dosaženo alespoň částečně setrvalého stavu plasmatické koncentrace. Hodnota C_{ss} se v takovém případě vypočte jako průměr mezi vrcholem a minimem koncentračního píku. Ustálený stav plasmatické koncentrace se přitom obvykle dosahuje v čase odpovídajícím čtyřnásobku biologického poločasu.



Je-li biologický poločas příliš dlouhý, může se dosáhnout zkrácení doby ustavení setrvalého stavu tím, že se na počátku terapie nasadí větší počáteční dávky léčiva a pak se dávkování sníží.

Rezistence

Účinnost určitého léčiva může ovlivňovat vedle farmakodynamických a farmakokinetických faktorů i vznik **rezistence**, k němuž dochází při opakovaném nebo dlouhodobém podávání léčiva.

Rezistence se projevuje tím, že k vyvolání terapeutické odezvy jsou zapotřebí stále se zvyšující dávky léčiva, popř. může docházet k tomu, že k žádoucí odezvě vůbec nedojde. Vznik rezistence je jedním z velkých problémů farmakoterapie.

Na vzniku rezistence se mohou podílet jak farmakodynamické faktory (nárůst nebo pokles množství cílových struktur, mutace ovlivňující jejich afinitu k léčivu nebo jejich aktivitu), tak i změny farmakokinetických parametrů (zvýšení aktivity degradujících enzymů nebo transportních proteinů).

Známa je rezistence některých patogenních mikroorganismů na určitá antibiotika. Pro účinnost penicilinů a cefalosporinů je nezbytná přítomnost β -laktamového kruhu v molekule. Rezistence na tato antibiotika pak závisí na tom, zda buňky patogenů jsou schopné produkovat enzym β -laktamazu, která β -laktamový kruh štěpí. Při častém podávání antibiotik produkce tohoto enzymu narůstá, takže účinek antibiotika klesá. Ke vzniku rezistence však dochází i u vyšších organismů. Např. při častém používání barbiturátů se zvyšuje tvorba jaterních enzymů, které barbituráty oxidují. Tím jsou barbituráty rychleji eliminovány a jejich koncentrace v krevní plasmě klesá, takže podaná dávka pak již nestačí k vyvolání požadovaného účinku. Podobně je u drogově závislých k vyvolání halucinogenního účinku zapotřebí stále větší dávka drogy.

Rezistenci nemusí vyvolávat jen zvýšená tvorba enzymů, které léčivo odbourávají. Při podávání protinádorových léčiv působících na vnitrobuněčné cílové struktury dochází ke vzniku rezistence nárůstem tvorby transportních bílkovinných systémů, které léčivo „pumpují“ z buňky ven i proti koncentračnímu gradientu.

Vznik a nárůst rezistence lze vysvětlit **selektivním tlakem**, které léčivo vyvolává.

V důsledku rozdílné exprese nebo i mutací genů může kolísat množství nebo aktivita enzymů nebo jiných funkčních bílkovin produkovaných jednotlivými buňkami buněčné populace. Mikrobiální buňky produkující více β -laktamasy nebo s mutacemi zvyšujícími aktivitu tohoto enzymu mohou degradovat β -laktamová antibiotika rychleji. K jejich usmrcení je pak zapotřebí vyšší koncentrace antibiotika než u původních „divokých“ buněk. Není-li potřebná koncentrace dosažena, buňky přežívají. Když se pak pomnoží, jsou jejich potomci vůči antibiotiku o něco odolnější, než byla původní populace s buňkami produkujícími β -laktamasy méně. Po dalších cyklech dělení buněk v prostředí se zvyšující se koncentrací antibiotika se degradační schopnost mikroorganismů dále zvyšuje, až nakonec převáží rezistentní varianty, na něž antibiotikum už vůbec nepůsobí. Podobným způsobem mohou zvyšovat i nádorové buňky svoji odolnost vůči cytostatikům. Nedávno bylo např. zjištěno, že určitá bodová mutace jednoho genu mnohonásobně zvyšuje účinnost transportního proteinu ABCG2 čerpající cytostatika ven z buněk. Buňky s takovou „superpumpou“ jsou pak až 6000x rezistentnější než původní nádorové buňky. Zatímco citlivé buňky s původní variantou genu jsou cytostatikem usmrceny, ve zbytkovém nádoru zůstávají a dále se množí buňky s mutovaným genem, které jsou odolné. Když pak nádor znovu naroste, je tvořen rezistentními buňkami, takže cytostatikum na něj už nepůsobí.

Určitou pomocí v boji s rezistencí je **správný režim léčby**: tj. podávání léčiv v dostatečných dávkách a v intervalech určených na základě farmakokinetických studií, aby bylo zaručeno, že po celou dobu léčby bude koncentrace léčiva v organismu ve výši, která je potřebná pro požadovanou odezvu.

V 50. letech minulého století byl v některých vyspělých zemích penicilin preventivně přidáván i do zubních past, žvýkaček apod. Dávky penicilinu v těchto přípravcích byly nízké, takže většinou nestačily k usmrcení patogenních mikroorganismů. Vyvolávaly však selektivní tlak, který vedl k tomu, že začaly převládat rezistentní kmeny, vůči nimž penicilin už účinný nebyl. Jiná antibiotika byla v 60. a 70. letech přidávána do krmiv hospodářských zvířat. Tím byly potlačeny infekce, které snižovaly výnosy. Rezidua antibiotik se přitom ale dostávala s masem nebo dalšími živočišnými produkty v malých dávkách do lidského organismu. To mělo za následek, že se postupně vyvíjela rezistence i u některých lidských patogenních mikroorganismů a antibiotika přestávala být účinná. V současné době je rizikem pro vznik rezistence zbytečné užívání antibiotik u virových onemocnění, na něž antibiotika nepůsobí (např. při chřipce) a také nedodržování léčebného režimu (nedodržování předepsaných intervalů podání, předčasné ukončení léčby po vymizení prvních příznaků onemocnění).

Výjimečně může být vznik rezistence využit terapeuticky, většinou je však nežádoucí. Snaha o překonání rezistence vede jednak k intenzivnímu hledání nových léčiv působících i na rezistentní patogenní organismy nebo na nemocné buňky, jednak ke studiu kombinací léku s látkami blokujícími mechanismy rezistence.

Příkladem účinné kombinace léčiva s inhibítozem degradujícího enzymu může být přípravek amoxiclav obsahující kombinaci polosyntetického penicilinu amoxicillinu s kyselinou klavulanovou, která je účinným inhibítozem β -laktamasy. Studována jsou i léčiva blokující proteiny podílející se na transportu léčiv ven z buněk.

Kontrolní otázky pro zopakování

1. Co je předmětem farmakodynamiky?
2. Jaké jsou cílové struktury léčiv?
3. Jaké interakce se uplatňují mezi molekulou léčiva a cílovou strukturou?
4. Co si představujete pod pojmem hydrofobní interakce (hydrofobní vazba)?
5. Jaké jsou typy receptorů?
6. Jaký je rozdíl mezi agonistou a antagonistou receptoru?
7. V čem se liší kompetitivní a nekompetitivní inhibitory enzymů?
8. S jakými dalšími (kromě receptorů a enzymů) bílkovinnými cílovými strukturami mohou léčiva interagovat?
9. Jak mohou léčiva interagovat s DNA?
10. Mohou být cílovou strukturou léčiv RNA? Jaké typy RNA a jak na ně lze působit?
11. Co je příčinou vedlejších účinků léčiv?
12. Co to je terapeutické rozmezí?
13. Jak lze vzájemně porovnávat účinky různých léčiv stejné terapeutické kategorie?
14. Proč není účinek vždy úměrný podané dávce léčiva?
15. Proč mohou léčiva působit na různé pacienty odlišně?
16. Vysvětlete pojmy potence, účinnost a efektivita léčiva
17. Co studuje farmakokinetika?
18. Na čem závisí absorpce léčiva?
19. Co je biologická dostupnost?
20. Co je pravidlo pěti?
21. Čím je ovlivňována distribuce léčiva v organismu?
22. Co je zdánlivý distribuční objem a co charakterizuje?
23. Jak jsou léčiva metabolizována v játrech?
24. Jaké jsou výhody a nevýhody různých způsobů podání léčiva?
25. Jak mohou být léčiva z organismu eliminována?
26. Co to je clearance?
27. Co to je biologický poločas a jaký má význam pro dávkování léčiva?
28. Co může být příčinou rezistence.
29. Jak je možné překonávat rezistenci?