Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Role chemopreventivních sloučenin v procesu karcinogenese

Bakalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2009

Tereza Krunclová

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE
3233145712

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Petra Hodka, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne 3.9.2009 .....

Poděkování

Děkuji především Doc. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za jeho odborné a cenné rady, připomínky a ochotu kdykoliv poradit.
Dále děkuji RNDr. Jitce Křížkové za její pomoc teoretickou i praktickou při řešení této práce.

Obsah

Seznam zkratek 6
1. TEORETICKÝ ÚVOD 8
1.1. Karcinogenese 8
1.2. Metabolismus xenobiotik 10
1.3. Cytochrom P450 12
1.3.1 Klasifikace cytochromů P450 13
1.3.1.1. Cytochromy P450 rodiny 1 14
1.3.1.2. Cytochromy P450 rodiny 2 15
1.3.2. Modulace cytochromů P450 15
1.3.2.1. Inhibice cytochromů P450 16
1.3.2.2. Indukce cytochromů P450 17
1.4. Chemoprevence 17
1.5.1. Mechanismus chemoprevence 18
1.5.2. Chemopreventivní sloučeniny 19
1.5.2.1. Nežádoucí účinky 20
1.5. Flavonoidy 20
1.5.1. Využití flavonoidů 22
1.5.2. Prospěšné vlastnosti flavonoidů 22
1.5.3. Nebezpečí flavonoidů 23
1.5.4. Metabolický osud flavonoidů v organismu 24
2. CÍL PRÁCE 26
3. MATERIÁL A METODY 27
3.1. Materiál 27
3.1.1. Chemikálie 27
3.1.2. Přístroje a pomůcky 28
3.2. Metody 30
3.2.1. Příprava experimentálního materiálu 30
3.2.2. Získání tkání a izolace mikrosomální frakce 30
3.2.3. Stanovení celkové koncentrace proteinů 32

3.2.4. Elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítonosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE) .. 33
3.2.5. Western blot 35
3.2.6. Fluorimetrické stanovení aktivity cytochromu P450 . 38
3.2.7. Stanovení koncentrace cytochromu P450 39
4. VÝSLEDKY 41
4.1. Charakterizace mikrosomálních vzorků 41
4.2. Elektroforetické dělění 42
4.3. Western blot – imonodetekce indukce CYP 44
4.4. Fluorimetrické stanovení enzymové aktivity 47
5. DISKUSE 52
6. ZÁVĚR 55
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 56

seznam používaných zkratek

APS	persíran amonný-*amonium persulphate*
Ah	aromatický uhlovodík-*arylhydrocarbon*
AIDS	syndrom získaného selhání imunity *Acquired Immune Deficiency Syndrome*
BCA	disodná sůl kyseliny 4,4´-dikarboxy-2,2´-bichinolinové (bicinchonická kyselina)
BIS	N,N´-methylenbisakryamid
BSA	hovězí sérový albumin-*bovine serum albumin*
BNF	β-naftoflavon
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
CYP	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina *deoxyribonucleic acid*
EROD	deethylace 7-ethoxyresorufinu *7-ethoxyresorufin-O-deethylase*
FAD	flavinadenindinukleotid
g	gravitační zrychlení
IQ	isoquercitrin
IQS	střevní mikrosomy (proximální) „isoquercitrinové“
IQM	střevní mikrosomy (middle-střední) „isoquercitrinové“
IQT	střevní mikrosomy (terminální) „isoquercitrinové“
IgG	imunoglobulin G
K	kontrola
KJ	kontrola jaterní
KS	kontrola střevní
Mr	relativní molekulová hmotnost
MFO	mikrosomální monooxygenasa se smíšenou funkcí *mixed function oxidases*

MROD	demethylace 7-methoxyresorufinu *methoxyresorufin-O-demethylase*
MS	mikrosomy, mikrosomální
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát-redukovaný
NC	nitroceluosa
NBT	tetrazoliová modř-*nitroblue tetrazolium*
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforesa *polyakrylamid gel electropforesis*
PB	fenobarbital
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PBS	fosfátový pufr-*phoshate buffer saline*
PROD	depentylace 7-pentoxyresorufinu *7-pentoxyresorufin-0-depentylase*
PVDF	polyvinyliden fluorid
Q	quercetin
QJ	jaterní mikrosomy „quercetinové“
QS	střevní mikrosomy (proximální) „quercetinové“
QM	střevní mikrosomy (middle-střední) „quercetinové“
QT	střevní mikrosomy (terminální) „quercetinové“
R	rutin
RUS	střevní mikrosomy (proximální) „rutinové“
RUT	střevní mikrosomy (terminální) „rutinové“
RPM	otáčky za minutu-*revolutions per minute*
SDS	dodecylsíran sodný-*sodium dodecyl sulphate*
TEMED	N,N,N´, N´-tertramethylendiamin
Tris	*tris*(hydroxymethyl)aminoethan
UV	ultrafialové záření-*ultraviolet*
v/v	objemová procenta
w/v	hmotnostní procenta

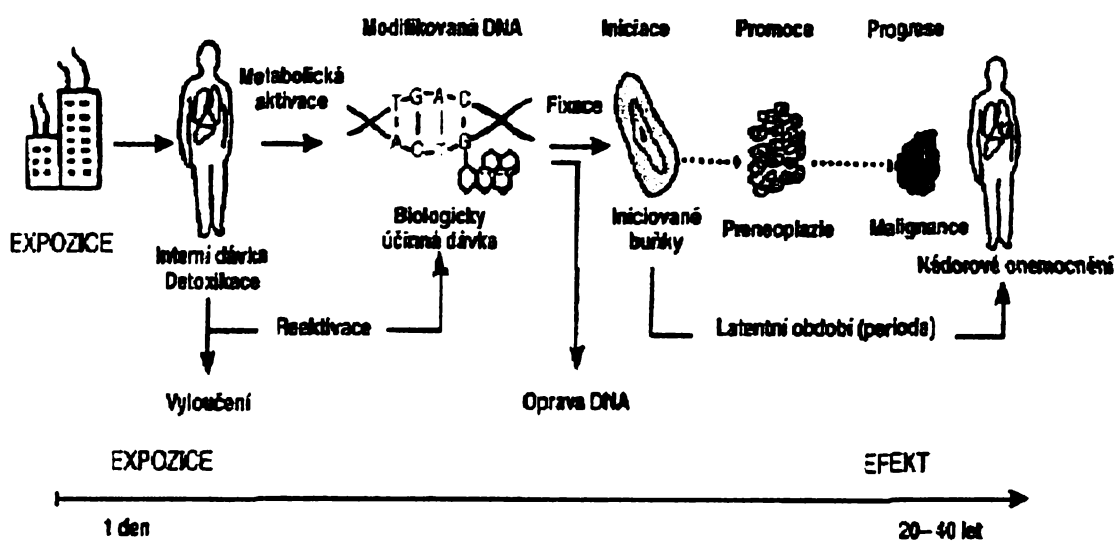
1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1. Karcinogenese

Karcinogenese je označení pro vznik onemocnění nazývaného souhrnně rakovina, která představuje více jak sto nemocí projevujících se nádorovým bujením [1]. Rakovina je celosvětově rozšířené onemocnění a patří spolu s kardiovaskulárními onemocněními k civilizačním chorobám s nejvyšší úmrtností. Na obrázku ***Obr.1*** (str.9) je vidět grafické srovnání počtu úmrtí vybraných států u mužské a ženské populace na rakovinu za rok 2000. Odhaduje se, že až 35% úmrtí na rakovinu může souviset s kouřením a stravou [2]. Léčba rakoviny se stala i v ČR jedním z nejdůležitějších cílů klinické medicíny, protože je jedním z nejčastějších příčin úmrtí [3].

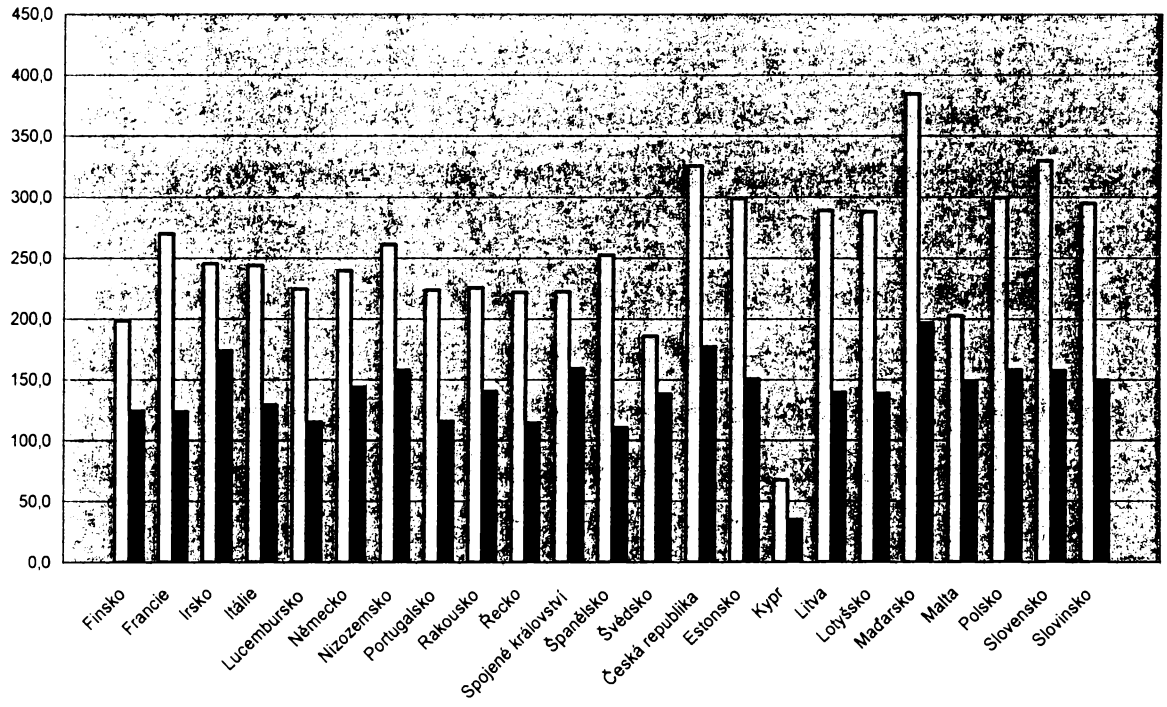
Proces vzniku rakoviny je několikastupňový a je znázorněn na obrázku ***Obr.2.***

Nádorové onemocnění je multifaktoriální a tyto faktory se dají rozdělit do dvou skupin a to na faktory způsobující a na faktory ovlivňující nádorové bujení [1]. Dále mohou být děleny na vnitřní např. dědičné, imunologické a hormonální, a nebo vnější tj. fyzikální, chemické a biologické jako např. záření, chemické látky a strava [4].



Obr.2 *Proces vzniku nádorového onemocnění [5].*

Jak je vidět na obrázku ***Obr.2*** (str.8) nádorovému onemocnění přímo předchází období zvané progrese, v němž dochází k malignanci. K maligním transformacím buňky může dojít několika možnými cestami ale jejich společným rysem je vždy selhání některého z mechanismů regulace buněčného dělení a regulace „sociálního chování" buněk. Nádorové buňky se více či méně liší od buněk, ze kterých vznikly, a proto by měly být buňkami imunitního systému rozpoznány. Nebezpečnost tohoto onemocnění spočívá právě v tom, že odlišnosti nejsou již tak dostatečné a dále k tomu nádorová buňka je schopna využít své různé „maskovací" mechanismy, kterými se brání rozpoznání imunitním systémem a následné eliminaci [6].



↑ *počet úmrtí na rakovinu na 100 000 obyvatel* → *vybrané státy*

Obr.1 *Srovnání počtu úmrtí na rakovinu na 100 000 obyvatel ve vybraných státech za rok 2000 [7].*

legenda: □ *muži* ■ *ženy*

Tato nemoc je zákeřná v tom, že může uběhnout i několik let od expozice karcinogenu do prvních projevů onemocnění. Rakovina často vzniká z různých faktorů, kterým je člověk celoživotně vystaven a které způsobují genové mutace [8]. Poruchy jsou obvykle vyvolané v onkogenech nebo antionkogenech (tumor supresorových buněk), tyto geny za normálních okolností produkují proteiny, které souvisí s buněčnou regulací a normálními signalizačními drahamy buněk. Jsou-li zmutované dochází většinou k jejich abnormálně zvýšené tvorbě produktů onkogenu a nebo abnormálně sníženou produkcí produktů antionkogenů. Mutace vede následně k porušení normální tkáňové lokalizace, pronikání do tkáně jiné a agresivnímu růstu buněk v těchto místech [6].

1.2. Metabolismus xenobiotik

Termínem xenobiotikum je označovaná látka, která je pro organismus cizí. Takových látek, kterým může být organismus vystaven je nespočetně mnoho a v životě se s nimi běžně setkáváme např. v podobě drog, léků, pesticidů, ve stravě atd. [9].

Metabolismus je slovo převzaté z řečtiny, které znamená „přeměna", tedy v tomto případě všechny osudy sloučeniny-xenobiotika v organismu.

Biotransformací se rozumí biochemická metabolická reakce, pomocí které se organismus snaží pozměnit přijaté xenobiotikum. Cílem této reakce je využití všech chemických a biologických reakcí, které má organismus k dispozici, k tomu aby bylo xenobiotikum lépe a rychleji primárně vyloučeno. Rychlejší vylučování je zajištěno především zvýšením rozpustnosti ve vodě tj.hydrofility. Biotransformace by měla probíhat cestou vedoucí k přeměně xenobiotika na neúčinnou formu tj. látku biologicky neaktivní, ale stává se, že může vzniknout i biologicky aktivní produkt [10].

V literatuře se často používá tzv. Williamsova klasifikace fází metabolismu xenobiotik. Katalytické reakce se nazývají fáze I. označovaná jako derivatizační a fáze II. označovaná jako konjugační. Při metabolismu xenobiotika v organismu se uplatňují především jako je oxidace, redukce, hydrolýza a syntéza. První tři

jmenovaný jsou dle Williamsovy klasifikace zahrnuty v I. fázi biotransformace xenobiotik, syntéza se týká II. fáze. Většina xenobiotik je právě prostřednictvím těchto dvou fází biotransformována [11].

V I fázi jsou dominantní zejména oxidační reakce a to hlavně enzymové systémy oxydoreduktas, zejména systémy cytochrom P450 a dále FAD-dependentní monooxygenasy tj.enzymy, které jsou přítomny v mikrosomech. Hlavními enzymy nemikrosomální oxidace jsou alkoholdehydrogenasa, amonioxidasa atd..
Reakce I. fáze jsou např. alifatická a aromatická hydroxylace, tvorba arenoxidů, N-, S- a O-dealkylace, N- a S-oxidace, deaminace, dechlorace a desulfurace. Mezi hlavní nemikrosomální reakce se řadí dehydrogenace, oxidace purinů, monooxidace a aminooxidace. U redukčních reakcí je to pak např. azoredukce, nitroredukce, redukce karbonylu a redukce disulfidů, redukce N-oxidů a sulfoxidů a redukční dehalogenace. Příkladem hydrolytických reakcí je hydrolýza esterů a amidů a hydrolytická deaminace.

Reakce II. fáze biotransformace jsou založeny především na konjugačních reakcích typu glukuronidace, sulfátové konjugace, glutathionové konjugace, methylace, acetylace a peptidové konjugace [10].

Možný osud xenobiotika v organismu je znázorněno v tabulce ***Tab.1***

Tab.1 *Možné osudy xenobiotika v organismu*

<table>
<tr><th>1.etapa</th><th>2.etapa</th><th colspan="4">3.etapa-biotransformace</th></tr>
<tr><td rowspan="5">vstup</td><td rowspan="5">distribuce</td><td>I.fáze</td><td>II.fáze</td><td>„III.fáze“</td><td rowspan="6">vyloučení</td></tr>
<tr><td>1)→ aktivovaný metabolit</td><td rowspan="3">→ →3)→
konjugace</td><td rowspan="4">→→→4)→
transport</td></tr>
<tr><td>2)→ neaktivovaný metabolit</td></tr>
<tr><td>→(x)</td></tr>
<tr><td colspan="2">→(x)</td></tr>
<tr><td colspan="5">lipofilní----------→ hydrofilní</td></tr>
</table>

Převzato z [10] a adaptováno

legenda: →(x): tato fáze nenastane

→,→,→,→ : možné průběhy cest
1), 2), 3), **4)** : začátky cest

V I. fázi mohou být biologicky aktivní látky inaktivovány nebo se naopak změní jejich aktivita z biologicky neaktivních na aktivní. Klíčovým krokem k aktivaci některých léčiv a aktivaci karcinogenů je tvorba reaktivních elektrofilů, které se váží na makromolekuly (proteiny, DNA) a tvoří kovalentní adukty. Reakce II. fáze biotransformace se zdají být ve většině případů procesem inaktivujícím, jelikož jsou to reakce převádějící xenobiotikum na snadněji vylučitelný produkt ledvinami, ale i tady existují výjimky a v posledních letech se stále více objevují případy, kdy i těmito reakcemi dochází ke zvyšování toxicity a reaktivity. Proto II. fázi biotransformace nelze tedy považovat za jednoznačně detoxikační proces.

Fáze na sebe mohou navazovat, ale často proběhne proces II. fáze i bez nutnosti fáze I.

II. fáze nemusí ale nutně být konečným krokem eliminace xenobiotik. Konjugáty je nutné z buněk transportovat a tento proces se někdy chybně označuje jako III. fáze biotransformace. I tento proces však nevyžaduje nutně předchozí dvě fáze [11].

1.3. Cytochrom P450

Cytochrom P450 (EC 1.14.14.1) nazývaný též „hem-thiolátový protein P450"je jedním z nejdůležitějších proteinů z enzymovou aktivitou, který se účastní metabolismu xenobiotik [12,13].

Tento enzym tvoří početnou superrodinu hemoproteinů, které slouží jako terminální oxidasa mikrosomální oxidasy se smíšenou funkcí (MFO). Přičemž MFO jsou jedny z nejdůležitějších enzymů metabolizující xenobiotika [12-14].

Označení tohoto proteinu souvisí s jeho objevem jakožto zvláštního pigmentu (proto P) v savčích jaterních mikrosomech [15].

První zmínky o cytochoromu P450 pochází z roku 1958. V této době byl označován jako mikrosomální pigment schopný vázat oxid uhelnatý (CO). Celé své označení P450 získal díky charakteristické pozici absorpčního maxima o vlnové délce 450 nm, který vykazuje v redukovaném stavu s navázaným CO [16]. Byl považován za membránový hemoprotein s neznámou fyziologickou funkcí. Po objevení jeho funkce výrazně vzrost zájem o jeho studii [17].

Cytochrom P450 hraje hlavní roli při detoxikaci látek exogenních (z okolního prostředí), tj. např. drog, léků, potravinových doplňků a enviromentálních polutantů. Účastní se také metabolismu endogenních látek (tělu vlastních), tj. např. cholesterolu, nasycených a nenasycených mastných kyselin, steroidů, prostaglandinů atd. [18]. Cytochrom P450 není jen jeden (viz následující kapitola: Rozdělení cytochromů P450). V biosyntetických cestách př. steroidů a žlučových kyselin je jich zapojen omezený počet, většina se účastní metabolismu xenobiotik zahrnující léky, toxické látky a chemické karcinogeny [14]. V organismu se zúčastní především I. fáze biotransfomace [19].

Mikrosomální P450 jsou syntetizovány na ribosomech vázaných na membránu drsného endoplasmatického retikula a v cytosolu jsou ko-translačně začleněny do jeho membrány [20].

Železo v cytochromu je vázáno čtyřmi vazbami přes atomy dusíku na pyrolové skelety, další dva ligandy atomu železa (pátý a šestý) jsou vázány nad a pod rovinou hemu. Pátým ligandem je zbytek aminokyseliny cysteinu, který se váže pomocí sulfhydrylové skupiny a šestým ligandem je atom kyslíku z molekuly vody [19,21].

Tento membránový protein se vyskytuje v buňkách v mitochondriích a v endoplasmatickém retikulu [20].

U obratlovců se cytochrom P450 vyskytuje v játrech, kůži, nosní sliznici, placentě, varlatech, vaječnících, v aortě, krevních destičkách a v nervovém systému. U lidí také v lymfocytech [22].

1.3.1. Rozdělení cytochromů P450

U Cytochromu P450 se vyskytují jeho tzv. násobné formy tzv. Isoformy, (geneticky podobné enzymy shodující se v mechanismu katalýzy) [19,23].

K označení cytochromu P450 se používá zkratka CYP [24].

CYP tvoří rodiny a podrodiny, do kterých byly zařazeny podle podobnosti aminokyselinové sekvence. Stejnou rodinu tvoří CYP, které vykazují více jak 40 % sekvenční podobnost. Tyto Rodiny jsou označeny arabskou číslicí za zkratkou CYP.

Proteiny, které jsou si svou sekvencí podobné z více jak 55 % jsou řazeny do stejné podrodiny a jsou označovány velkým písmenem za číslem rodiny. Konkrétní isoformy jsou označeny ještě druhou číslicí následující za podrodinou (př. CYP1A1, CYP2B1) [25,26].

Nyní je známo více jak 7700 sekvencí CYP. V lidském organismu bylo nalezeno 18 rodin a 44 podrodin, 57 sekvencí a 58 pseudogenů [27].

Následující 2 kapitoly jsou věnovány rodinám 1 a 2, které byly pro naši práci stěžejní.

1.3.1.1. Cytochromy P450 rodiny 1

Rodina CYP1 má v lidském organismu významnou roli v metabolismu léčiv a karcinogenů. Existují zde 3 podrodiny (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1), 3 geny a 1 pseudogen (CYP1D1P/1A8P). Funkcí CYP1 je např. hydroxylace estrogenů (1A2 a 1B1) a také se účastní metabolismu hemu (1A2). CYP1 jsou indukovány pomocí polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU). PAU se nalézají např. v cigaretovém kouři a připáleném jídle. Tato rodina může aktivovat karcinogeny a mutageny. Vysoká hladina CYP1A2 je spojována se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny tlustého střeva [22,27].

CYP1A2 je také identifikován jako klíčový faktor v metabolické aktivaci mnoha chemických karcinogenů jako je aflatoxin B-1 a různých heterocyklických aromatických aminů a některých nitroaromatických sloučenin. Přispívá v inaktivaci některých léků [28].

CYP1A1 a 1A2 se vyskytují napříč živočišnou říší a vykazují vzájemně vysokou homologii a jsou velice evolučně konzervované. Mají odlišnou, ale překrývající se substrátovou specifitu [22].

Význam v lékařských vědách má z této rodiny ještě CYP1B1, jehož genová mutace pravděpodobně souvisí s vrozeným glaukomem [29].

1.3.1.2. Cytochromy P450 rodiny 2

V lidském organismu je rodina CYP2 začleněna především do metabolismu léčiv a steroidů. Představuje 13 podrodin, 16 genů a 16 pseudogenů. Je to nejpočetnější lidská rodina obsahující asi třetinu lidských CYP. Protože mnohé z těchto proteinů jsou schopny hydroxylace steroidů je jejich exprese závislá na pohlaví. Některé z nich se také účastní metabolismu xenobiotik. Pro CYP 2B u hlodavců jsou silným induktorem barbituráty [27]. Indukce obecně je popisována v odstavci 1.3.2.2. (str. 17). Fenobarbital je silným induktorem CYP2B1/2 v krysích játrech. CYP2B1 a CYP2B2 vykazují 97% identitu [30].

Cytochromy této rodiny jsou evolučně sekvenčně vysoce variabilní a to zřejmě souvisí s jeho funkcí spojenou s metabolismem cizorodých látek. Je to nejméně konzervovaná rodina CYP [31].

1.3.2 Modulace cytochromu P450

Jak již bylo uvedeno cytochrom P450, který je v organismu mimo jiné též zodpovědný za metabolismus léků a aktivaci karcinogenů, je společným cílem zkoumání mnoha vědních oborů zahrnující např. farmakokinetiku a toxikokinetiku [32].

Modulace jeho enzymové aktivity inhibicí, indukcí či aktivací je velice zkoumána též ve farmakologii, enzymologii a chemii obecně. Změny aktivity u člověka, tedy *in vivo*, jsou velkým lékařským problémem. Mění metabolismus léků, a tím se mění i jejich biologická aktivita. Vznikají tak nežádoucí lékové interakce [33].

Vzhledem k přítomnosti či nepřítomnosti určitého genu cytochromu P450 v jednom druhu, ale ne v ostatních, nemusí být extrapolace dat ohledně toxicity z hlodavců na člověka úplně správná [34].

Hlodavci a lidi se liší obsahem CYP. Přestože mají přítomny stejné rodiny tohoto enzymu tak se liší v počtech genů. Například u myší bývá počet genů často vyšší a jako výhodnější experimentální model, ze kterého se získávají výsledky, které jsou pro člověka více relevantní, se zdá být pes rasy beagle. Dalším

významným faktorem, který se v metabolismu léků uplatňuje a který je třeba brát v úvahu, je genetický polymorfismus. Pojmem genetický polymorfismus znamená odlišnost v sekvenci DNA, která se objevuje ve více jak 1% populace a může mít za následek rozdílnou metabolizaci léků či karcinogenů [27].

Pokusy, které byly prováděny *in vivo*, byly provedeny především na hlodavcích, ale i lidská játra obsahují cytochromy, které jsou inducibilní při expozici člověka těmto induktorům jako je např. fenobarbital, makrolidová antibiotika, difenylhydantion, enviromentální chemikálie, polychlorované bifenyly a další [35].

Aktivita cytochromu P450 je ovlivněna velkým počtem genetických, endogenních a enviromentálních faktorů, což způsobuje variabilní a individuální metabolismus léčiv u každého jedince [36].

1.3.2.1 Inhibice cytochromu P450

Inhibicí se rozumí snížení aktivity enzymu. Látka, která je za inhibici zodpovědná, se nazývá inhibitor [9].

Inhibice metabolismu léků, jako výsledek kompetice mezi dvěma rozdílnými léky matabolizovanými tím samým CYP, může mít za následek zvýšení koncentrace jednoho či obou léků v plasmě, a to může nakonec vést k řadě menších či větších zdravotních potíží a někdy i k smrti. Díky této interakci muselo být z trhu staženo několik významných léků. Nástup inhibice je obvykle rychlý a nastává často po jednorázovém podání inhibitoru [33].

Inhibice může být reversibilní a ireversibilní.

První zmiňovaná je častý případ popsaný v tzv. lékové interakci a dochází k ní v důsledku přímé kompetice tj. soutěžení o vazebné místo na CYP mezi substrátem a inhibitorem. Potenciálními reversibilními inhibitory jsou sloučeniny s volným el.párem např. heterocyklické sloučeniny obsahující dusík.

Ireversibilní inhibice je způsobena kovalentní modifikací CYP enzymů reaktivními meziprodukty. Modifikovaná může být hemová složka, taková modifikace je např. popsaná pomocí ethinylenestradiolu, který je substrátem

CYP3A4. Modifikovaná může být i proteinová složka a to se projeví tehdy, je-li modifikace na aminokyselinovém zbytku, který je součástí vazebného místa enzymu. Tuto modifikaci způsobuje např. chloramfenikol [32].

1.3.2.2. Indukce cytochromu P450

Indukce CYP spočívá ve zvýšení exprese genů pro CYP např. po podání léků a to vede ke zvýšení celkového množství enzymu a tím současně zrychluje jeho schopnost metabolizovat léky. Těmito interakcemi se může zmírnit farmakologický účinek léku a v důsledku zvýšení metabolismu a následnému rychlému odstranění léku z organismu to nakonec vede ke snížení jeho plasmatické koncentrace.

Plný účinek induktoru se může projevit za delší dobu, která může trvat dny i týdny, čas se liší podle druhu induktoru. Indukce pomalejší proces než inhibice.

Indukce je všeobecně nepřímá a CYP se nedostane do fyzické interakce s induktorem narozdíl od inhibice.

Tato indukce enzymů metabolizujících xenobiotika je intenzivně zkoumána díky jejím vážným účinkům, které se projevují ve farmakologické odpovědi organismu na léky a další xenobiotika [32, 33].

1.4. Chemoprevence

Termín chemoprevence byl použit již před více jak 30 lety a je definovaný jako inhibice či pozastavení procesu karcinogenese využitím netoxických látek jako potravinových, přírodních nebo farmaceutických sloučenin, které brzdí rozvoj rakoviny. Jejich schopnost spočívá v tom, že buď blokují poškození DNA, které zahajuje proces karcinogenese (protože poškození mnohých regulačních genů vede ke vzniku invazivní a metastázující rakoviny) nebo zdrží či zvrátí progresi v premalignantních buňkách v nichž takové poškození již nastalo. [37,38]. Obecně lze říci, že vzniku a výskytu tohoto onemocnění se zabraňuje používáním vybraných sloučenin. Prevence vzniku rozvoje rakoviny je důležitým krokem při eliminaci onemocnění. Prevence spočívá především v tom, že se zamezí kontaktu s nebezpečnými např. karcinogeními látkami, ale je složité se některým látkám

vyhnout absolutně. V životním prostředí se vyskytuje mnoha látek, které byly na základě mutagenních testu prohlášeny za potencionální karcinogeny. Mnohé z těchto sloučenin se běžně nacházejí v potravinách [39].

S poznáváním mechanismu chemoprevence se rozšiřuje syntéza sloučenin, které v *in vivo* testech (na experimentálních zvířatech) jsou schopny zabránit rozvoji karcinogenese selektivním působením na specifickou cílovou molekulu.

Statistická data z oblasti karcinogenese jasně poukazují na nezbytnost preventivního přístupu k tomuto onemocnění [38].

Chemopreventivní sloučeniny je nutno vzhledem k potřebám každého jedince podávat individuálně. Pokud má sloučenina velmi silné účinky, ale současné má také nezanedbatelnou a významnou toxicitu, může být použita pro jedince se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny tj. např. jedince, kterému byl primární nádor již chirurgicky odstraněn. Takovou sloučeninu nelze použít pro širokou veřejnost. Pokud má sloučenina mírné ochranné účinky a nízké účinky toxické, je vhodné zvážit její podávání jedinci s nízkým rizikem vzniku nádorového onemocnění [39].

1.4.1. Mechanismus chemoprevence

Inhibitory procesu karcinogenese lze zařadit do tří tříd. Tabulka ***Tab.2*** (str.19) ukazuje dělení sloučenin podle různých cílů zásahu chemopreventivních sloučenin. Některé látky mohou vykazovat i více aktivit př. mají schopnost blokátorů i látek potlačujících.

1. -inhibitory jimiž jsou látky, které brání tvorbě nebo absorpci karcinogenů a působí tedy ve fázi iniciace procesu karcinogenese
2. -blokátory, které brání metabolické aktivaci karcinogenu tj.dosažení nebo reakci karcinogenu s buněčným cílem a brání jejich vazbě na DNA, působí též ve fázi iniciace
3. -látky potlačující, které již působí ve fázi promoce a brání expresi neoplastických buněk, které by jinak vstoupily do fáze progrese a způsobily tvorbu maligního nádoru [37,38].

Tab.2 Působení efektorů, převzato z [37] a adaptováno

fáze karcinogenese	typ efektoru
expozice enviromentálním/vnějším faktorům	
↓	← *inhibitory bránící tvorbě a absorpci karcinogenu*
tvorba karcinogenu / absorpce	
↓	← *blokátory*
reakce s buněčným cílem, poškození DNA, mutagenese	
↓	← *potlačující látky*
neoplastické projevy	

1.4.2. Chemopreventivní sloučeniny

Pro účely chemoprevence bylo navrženo velké množství sloučenin, u kterých byly protektivní vlastnosti prokázány, což je pozitivní v tom, že lze vybrat optimální chemopreventivní sloučeniny pro určité skupiny jedinců a pro daný typ chemoprevence [39]. Mnoho těchto látek bylo nalezeno empiricky [38].

Potenciální chemopreventivní sloučeniny mají různé vlastnosti, chemickou strukturu i fyziologické účinky. Jedná se o látky, jako jsou vitamíny (např.kyselinu listovou a vitaminy A,C, a E), minerální látky (např. selen, molybden a vápník), přírodní produkty (např. karotenoidy a flavonoidy) a syntetické látky (např. deriváty vitaminu A a D, a tamoxifen) [37].

Významnou skupinu chemopreventivních sloučenin tvoří fytochemikálie. Tyto sloučeniny specificky interagují s různými stupni procesu karcinogenese.

Fytochemikálie jsou nevýživové složky stravy, které jsou obsaženy v rostlinách a vyznačují se chemopreventivními vlastnostmi. Tyto látky jsou často izolovány a podávány jako potravinové doplňky. Z řady klinických studií je zřejmé, že mají významné protikarcinogenní a protimutagenní vlastnosti. Významným zdrojem chemopreventivních látek je ovoce a zelenina. V USA byly například realizovány mnohé vládní programy na podporu konzumace zeleniny a ovoce, jako nezanedbatelné složky potravy a důležitého faktoru prevence vzniku rakoviny, které se zakládaly právě na klinických studiích. Z tohoto pohledu se jako vhodná zelenina se doporučuje např. česnek, sója, rajčata a brukvovitá zelenina [40].

1.4.2.1. Nežádoucí účinky chemopreventivních sloučenin

Použití vysokých dávek a dlouhodobější podávání chemopreventivních sloučenin může vést až k účinkům, které jsou pro člověka nežádoucí a škodlivé. Jsou-li fytochemikálie, které jsou pro organismus xenobiotikem, podávány v koncentrované formě, mohou kromě příznivých účinků vyvolat i ty nežádoucí. Negativní vlastnosti mohou mít více důvodů buď 1) je chemikálie sama o sobě toxická, nebo 2) se metabolicky přeměňuje na toxický produkt např. cytotoxickou látku, prooxidant či látku mutagenní, nebo 3) může zasahovat do endogenních metabolických drah a 4) může také interagovat s jinými chemikáliemi přítomnými v organismu např. s léky a nakonec 5) může způsobit indukci enzymů, které jsou zodpovědné za aktivaci prokarcinogenů [41].

Již v 15. století na podobné jevy upozornil Paracelsus, který definoval jedovatou látku: „ *Všechno je jedovaté a není nic, co by jedovaté nebylo, záleží jen na dávce, co činí látku jedovatou"* [10].

1.5. Flavonoidy

Flavonoidy, jak již bylo uvedeno, jsou zástupci fytochemikálií s chemopreventivními vlastnostmi.

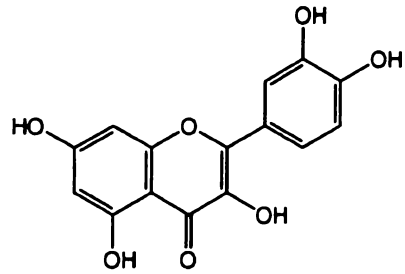
Flavonoidy jsou sekundární metabolity všech vyšších suchozemských cévnatých rostlin. Obecně se řadí do 6 podskupin: chalkony, flavony, flavonoly, flavanony, anthokyaniny a isoflavanoidy [9, 42].

Význam flavonoidů jako pigmentů v rostlinné říši je znám již dlouho. V rostlinné fyziologii flavonoidy reagují na světlo a kontrolují látky zvané auxiny, které mají v rostlině význam regulátorů růstu a diferenciace [43,44].

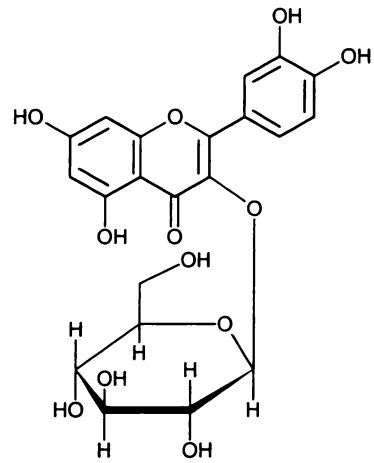
Jsou obsaženy ve všech potravinách rostlinného původu především v ovoci, zelenině, ořechách a nápojích, které mají rostlinný původ, tj. čaj, víno, cola, ginko biloba. Bylo již popsáno více než 4000 různých flavonoidů [44].

V rostlinách se většinou vyskytují ve formě glykosidů, které jsou rozpustné ve vodě a jsou chemicky stabilní. Cukernou složku často tvoří glukosa, galaktosa, arabinosa, xyluosa, rhymnosa a další [45].

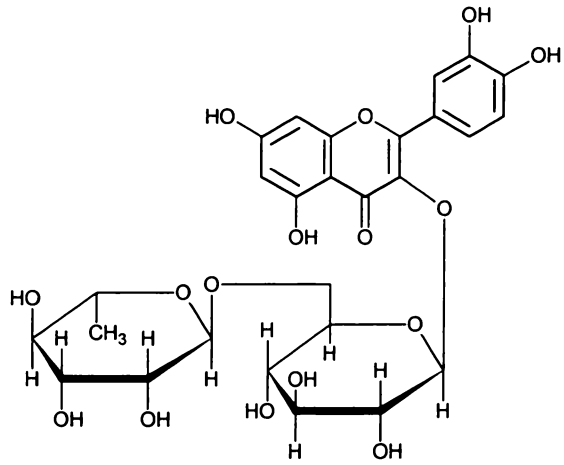
Příklady flavonoidů, kterých se týkala experimentální část této práce tedy, quercetinu, isoquercitrinu a rutinu jsou uvedeny na obrázcích ***obr.3*** , ***obr.4*** a ***obr.5***



Obr.3 *Struktura quercetinu*



Obr.4 *Struktura Isoquercitrinu*



Obr.5 *Struktura rutinu*

1.5.1. Využití flavonoidů

Rostlinné flavonoidy mají mnoho biologických vlastností a jsou běžnými součástmi potravinových doplňků. Zájem o tyto sloučeniny jako doplňky stravy je veliký díky jejich pozitivním vlastnostem na zdraví. Bohužel není mnoho studií, které se zabývají jejich škodlivými účinky v případě jejich nadměrného užívání. Kromě toho tyto potravinové doplňky nemají často své prospěšné vlastnosti podložené klinickými testy. Navíc dávky, ve kterých jsou flavonoidy v těchto doplňcích přijímány, jsou mnohem vyšší než z běžné rostlinné stravy [46]. Koncentrace quercetinu, flavonoidu, který je v těchto doplňcích běžně obsažen například v některých případech až 20x převyšuje denní dávku, která by byla běžně přijata z rostlinné stravy [43].

1.5.2. Prospěšné vlastnosti flavonoidů

Na základě mnohých epidemiologických studií bylo dokázáno, že příjem stravy založené z významné části na zelenině vede k zvyšování délky života a k omezení mnohých chorob jako jsou kardiovaskulární onemocnění.

Flavonoidy mohou také inhibovat reversní transkriptasu a i tato skutečnost vede ke zvýšenému zájmu o tyto sloučeniny v oblasti medicíny. Této vlastnosti se využívá při léčbě retrovirových infekcí zahrnujících např. syndrom získané snížené imunity (AIDS) [43].

Mnohé flavonoidy slouží jako materiál pro vývoj léčiv. Pro své významné cytostatické a antioxidační účinky jsou navrženy jako protikarcinogeny a kardioprotektivní sloučeniny [46].

Mohou též ovlivnit některé kroky, které vedou k rozvoji zhoubných nádorů např. ochranou DNA před poškozením [44].

V posledních letech byla také věnována zvýšená pozornost výzkumu jejich schopností inhibovat buněčný cyklus, buněčnou proliferaci a oxidativní stres. Flavonoidy se mohou též zúčastnit inhibice detoxikujících enzymů, enzymů související apoptosou a imunitním systémem [42].

1.5.3. Nebezpečí flavonoidů

Nebezpečí flavonoidů, jako chemopreventivních sloučenin již bylo popsáno výše. Toto nebezpečí pro lidskou populaci představuje především opomíjený fakt, že více není vždy lépe. Navzdory jejich prospěšným vlastnostem provedené studie poukazují i na jejich potenciální mutagenní a genotoxické vlastnosti. Toto bylo zjištěno na experimentálním modelu jak bakteriálním tak i savčím. Některé flavonoidy mohou působit jako mutageny i jako prooxidanty, které generují volné radikály a ty následně mohou poškodit DNA. Také mohou inhibovat klíčové enzymy zapojené do metabolismu hormonů. Poškozená DNA nebo špatně opravená DNA může následně vést ke zlomu a mutacím, které mají za následek vznik preneoplastických lézí. Dále mohou inhibovat enzymy asociované s DNA, jako jsou topoisomerasy.

Tyto potenciálně nebezpečné vlastnosti je nutné brát v úvahu hlavně při vysokých dávkách, kdy mohou převážit nad vlastnostmi prospěšnými. Navzdory všem klinickým studiím prokazující jejich kladné vlastnosti zůstává otázkou, kde je hranice netoxické dávky, která má ještě chemoprotekční efekt [46].

Quercetin

Quercetin je jeden z flavonoidů kterých se naše práce týkala a z jeho struktury jsou odvozené ostatní námi používané flavonoidy. Mnoho studií prokazuje jeho prospěšné vlastnosti v oblasti kardiovaskulárního systému a jeho protivirové, protizánětlivé a protimikrobiální vlastnosti.

Patří mezi flavonoly, které jsou v lidské rostlinné stravě nejvíce obsaženy. Ve vysokých koncentrací se nachází v běžně konzumované zelenině jako je např. cibule, jablka, kapusta a v mnohých běžných nápojích jako je např. červené víno, černý a zelený čaj. [43,46]

V pokusech, které byly provedeny *in vitro* zabraňuje oxidaci některých lipoproteinů, jejichž oxidace je považovaná za klíčový krok ve tvorbě aterosklerotických plaků. Tímto se stal také chemoprotektivní sloučeninou v oblasti aterosklerotického onemocnění [47].

1.5.5. Metabolický osud flavonoidů v organismu

Biologická dostupnost (bioavailabillity) je podíl množství podaného xenobiotika, které je obsaženo v krevní plasmě jako nezměněné. Závisí na více faktorech, např. na cestě vstupu xenobiotika do organismu či na rychlosti jeho eliminace [10]. Biologická dostupnost flavonoidů se v různých druzích zeleniny liší [46].

Za jejich pozorované účinky nakonec může jen to množství flavonoidu, která zůstane biologicky dostupné, neboť zbytek je např. eliminován či pozměněn střevními mikroorganismy [43]. Tato dostupnost je ovlivněna jejich chemickou formou, ve kterých jsou v potravinách k dispozici (často glykosidové konjugáty), jejich hydrofobicitou, jejich náchylností k odbourávání a v neposlední řadě též mikrobiální střevní florou [42].

I když jsou experimentálně zjištěny hodnoty průměrného denního příjmu různých flavonoidů z potravy, je nutno k určení aktivní dávky flavonoidů pro organismus brát v úvahu jeho absorpci [47].

Flavonoidy a isoflavonoidy se běžně vyskytují jako estery, ethery nebo glykosidové deriváty nebo jejich směsi [42].

Tyto flavonoidy vyskytující se ve formě glykosidů, které obsahují cukernou složku, nemohou být absorbovány ze střeva. Předpokládá se, že absorpci podléhají jen volné flavonoidy tzv. aglykony, pouze ty jsou schopny procházet střevní stěnou, avšak je možné, že glykosidy mohou používat i nějaké transportní mechanismy [47].

Při použití anaerobní fermentace v pokusech prováděných in vitro s použitím mikroflóry žijící v tlustém střevě bylo prokázáno, že došlo k rychlé dekonjugaci isoquercitrinu a rutinu. Rutin prošel deglykosylací, štěpením kruhu a dehydroxylací. Je jasné, že mikroflóra tlustého střeva má velký potenciál pro přeměnu a degradaci flavonoidů na nízkomolekulární fenolické sloučeniny, které mají v tlustém střevě ochrannou biologickou funkci. Místo absorpce flavonoidů a forma, ve které jsou absorbovány jsou důležitými faktory při zkoumání jejich metabolických drah v organismu [45].

Je tedy zřejmé, že flavonoidy mohou mít navzdory svým kladným vlastnostem i negativní účinky, jak již bylo probráno výše, a proto sledování indukce CYP vyvolané těmito induktory v závislosti na místě indukce, tedy na místě kde došlo k absorpci flavonoidů je významným předmětem zkoumání. Předkládaná práce by měla vést k rozšíření poznatků týkajících se této problematiky a pomoci k poznání působení chemopreventivních látek-vybraných flavonoidů. Testů, které by se prováděly s využitím střevních mikrosomů po per orálním podání chemopreventivních látek je málo a k této problematice je důležité zjistit více skutečností, které povedou k objasnění mechanismu metabolismu flavonoidů v těchto místech. Proto se i naše studie zabývala jak mikrosomy jaterními tak i střevními získanými *in vivo* z experimentálního modelu potkana.

2. Cíl práce

Tato práce je zaměřena na stanovení enzymu cytochromu P450, tedy enzymu který je jeden z nejdůležitějších podílející se na I. fázi metabolismu xenobiotik v organismu. Flavonoidy jsou potenciálními induktory tohoto enzymu a tudíž jejich interakce s karcinogeny je negativní a může vést ke zvýšení rizika rozvoje nádorového bujení.

K realizaci tohoto cíle je třeba splnit následující úkoly:

1. Studovat indukční vliv vybraných flavonoidů na cytochrom P450, na experimentálním modelu (samci potkana) po perorální premedikaci, v jaterní a střevní tkáni.

2. Pomocí metody Western blot sledovat indukční efekt vybraných flavonoidů u isoforem CYP: 1A1, 1A2, 1B1, 2B1 v mikrosomálních preparátech.

3. Dále porovnat změny na úrovni indukce proteinu s metabolickou aktivitou studovaných isoforem CYP pomocí měření přeměny jejich specifických substrátů.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. **Materiál**

3.1.1. Chemikálie

Fluka, Švýcarsko

tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), dodecylsulfát sodný (SDS),

Koch-Light laboratoře Ltd., UK

2-merkaptoethanol

Lach-ner.s.r.o. ČR

methanol

Linde, ČR

suchý led

Millipore Corp., USA

immobilion-P přenosová membrána

Penta, ČR

glycin

PML a.s ČR

Laktino–odtučněné sušené mléko

Riede-de Hoen, Německo

qercetin

Serva, Německo

akrylamid, N,N´-methylenbisakrylamid (BIS),

N,N,N´,N´-tetramethylethylendiamin (TEMED), Triton X-100, Coomassie briliant blue R-250

Setuza a.s, ČR

Vegetol-slunečnicový olej

Sigma-Aldrich, USA

β-naftoflavon, 7-ethoxyresorufin, 7-methoxyresorufin, 7-pentoxyresorufin, redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH), SigmaMarker „wide range" (6500–205000), bicinchonová kyselina (BCA), protililátky IgG konjugovaná s alkalickou fosfatasou proti slepičím protilátkám IgY, BCIP/NBT tablety

Velaz s.r.o., ČR

Samci potkana, kmen Wistar (140-150g)

Whatman, USA

Whatman papír, č.3

Isoquercitrin poskytl Prof. Ing. Vladimír Křen, DrSc

Protilátky slepičí protilátky proti CYP1A1/2 a králičí CYP2B4 poskytl Doc. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Rutinové mikrosomy (R), kontrolní mikrosomy (K) a β-naftoflavonové (BNF) mikrosomy (vše jaterní i střevní, potkaní a po premedikaci danými látkami) poskytla RNDr. Jitka Křížková

Fenobarbitalové (PB) jaterní potkaní mikrosomy poskytla RNDr. Věra Kotrbová

3.1.2. Přístroje a pomůcky

Analytické váhy

PESA 40SM-200, Švýcarsko

Automatické mikropipety

BioHit, Finsko, Nichirio, Japonsko

Centrifugy

Sanyo mikrocentrifuga MSE, Velká Britanie, Janetzki K23, Německo, Janetzki K24 Německo, Beckman Coulter:OptimaTM LE-80K ultracentrifuga, USA

Luminescenční spektrofotometr

PerkinElmer LS55

Souprava na elektroforézu

HoeferTM miniVE, Amersham Biosciences USA

Souprava na ekektropřenos

Biometra®Fastblot B 43, USA

Spektrometr

SpektroMOM 195 D, Maďarsko; Specord M40, Carl Zeiss Jena, Německo

Zdroj deionizované vody

Simplicity 185, Millipore Corp., USA

Další

Mikrotitrační destička (96 jamek); mikrozkumavky dle Eppendorfa; pH metr ATI Orion 370, USA; Sonikátor-Elmasonic E30H, P-lab; vortexový mixér-MS 1 Minishaker; vodní lázeň-Julabo TW 8, Německo; zdroj napětí pro elektroforesu a Western blot-EPS 301 Amersham Pharmacia biotech, USA; třepačka 0S-2 basic IKA; skleněný homogenizátor Potter-Elvehjem; silnostěnné zkumavky, kahan, kleště, skleněné maskované mikrokyvety.

3.2. Metody

3.2.1. Příprava experimentálního materiálu

K získání experimentálního materiálu obsahující vybrané tkáně byli použiti samci laboratorních potkanů kmene Wistar, ve váhovém rozmezí 140-150 g. Potkani byli 5 dní ponecháni k aklimatizaci a stravu měli *ad libitum*. Poté byli rozděleni do dvou skupin po čtyřech jedincích a použitím perorální žaludeční gaváže každé skupině byly podávány vybrané flavonoidy (quercetin a isoquercitrin). Flavonoidy byly podávány po dobu 5ti dnů v dávkách 60 mg/kg tělesné hmotnosti pokusného zvířete a jako rozpouštědlo bylo použito 1ml slunečnicového oleje. Premedikovaní potkani byli necháni přes noc hladovět a po 24 hodinách po poslední dávce z nich byly usmrceni použitím suchého ledu (CO_2) a byly vyjmuty játra a tenká střeva.

3.2.2. Získání tkání a izolace mikrosomální frakce

Játra byla ponechána celá a tenká střeva byla rozdělena na tři částí. První část-proximální byla odstraněna asi 2 cm pod žaludkem v celkové délce asi 10 cm, druhá část byla následující část-středního střeva ve stejné délce a třetí část byla odebrána v téže délce asi 10 cm z konečné části střeva-z distální části. Všechny tkáně byly uchovány v mrazících boxech při teplotě -80°C.

Použité pufry:

Pufr P1: 0,15 M KCl, 0,005 M Tris; pH 7,4; 23,5 mg tokoferolu v 0,5 ml methanolu/1l–přidaný do pufru před použitím

Pufr P2: 0,1 M $Na_4P_2O_7.10H_2O$; pH 7,2

Pufr P3: 0,15 M KCl, 0,05 M Tris, 20% (v/v) glycerol; pH 7,4

K izolaci mikrosomální frakce byly použity tkáně, které byly uchovány při -80°C. Izolace byla provedena v chladové místnosti při teplotě 4°C. Mikrosomální frakce byly získány metodou podle van der Hoevena a Coona [48].

Jaterní a střevní tkáně byly zváženy (hodnoty všech experimentálních vzorků viz. výsledky), důkladně promyty pufrem P1, nůžkami rozstříhány na malé kousky a poté opět promyty pufrem P1 v 2 násobku jejich hmotnosti. Takto připravené tkáně byly následně homogenizovány v 4 násobném množství pufru P1 pomocí skleněného homogenizátoru Potter-Elvehjem. Výsledný homogenizát byl centrifugován, a centrifugovány při 600g po dobu 10 minut a teplotě 0-5°C (centrifuga Janetzki K-23 s výkyvným rotorem, 4x70ml, 2000 RPM). Supernatanty byly spojeny dohromady a nechány v kádince na ledu, sedimentované pelety byly rehomogenizovány v objemu pufru P1 odpovídajícímu přibližně ¼ původního objemu původní hmotnost tkáně a opět centrifugovány za stejných podmínek. Následně byly supernatanty z obou centrifugací spojeny, a znovu centrifugovány tentokrát po dobu 20 minut při 15 000G při 0-5°C (Janetzki K-24, úhlový rotor, 6x35 ml, 13 500 RPM).

Poté byly supernatanty opatrně odděleny od pelet, a supernatanty byly ultracentrifugovány při 123 000G po dobu 90 minut při 4°C (ultracentrifuga Beckman, úhlový rotor Ti45, 35 000 RPM).

Supernatanty byly odděleny a výsledné pelety resuspendovány v objemu pufru P2 odpovídajícímu přibližně 2 násobku původní hmotnosti tkáně. Tento vzorek byl centrifugován při 425 000G po dobu 90 minut a 4°C (ultracentrifuga Beckham, úhlový rotor Ti70, 60 000 RPM).

Promyté pelety byly resuspendovány v objemu pufru P3 odpovídajícímu přibližně 1/5 původní hmotnosti tkáně. Takto získané mikrosomální vzorky byly následně homogenizovány v skleněném homogenizátoru Potter-Elvehjem a poté rozděleny do mikrozkumavek dle Eppendorfa (po 30μ l, 60μl, 90 μl). Vzorky byly uchovány v mrazícím boxu při teplotě -80°C až do dalšího použití.

3.2.3. Stanovení celkové koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů v jednotlivých mikrosomech byla určena pomocí metody podle Smith a kol. [49]. Aminokyseliny jako cystein, tryptofan a tyrosin obsažené v proteinech jsou schopné redukovat vápenaté kationty Cu^{2+} na Cu^{+}. BCA tvoří fialový komplex s Cu^{+} v alkalickém prostředí, tento komplex má absorpční maximum při vlnové délce 562 nm. Fialová barva vznikajícího komplexu je stabilní a dá se použít ke kvantitativnímu stanovení přítomných reagujících proteinů, jelikož intenzita barvy se zvyšuje úměrně zvyšující se proteinové koncentraci.

Použité roztoky:

Činidlo A: 2% (w/v) $Na_2CO_3.H_2O$, 0,95% (w/v) $NaHCO_3$, 0,16% (w/v) vínan sodný 0,4% (w/v) NaOH, 1% (w/v) BCA sodná sůl

Činidlo B: 4% (w/v) $CuSO_4.5H_2O$

Pracovní činidlo bylo vytvořeno smícháním činidla A a B v poměru 49:1. K experimentu byly použity silnostěnné zkumavky, které byly nejprve vyžíhány.

Pro kalibraci byl jako standard použit hovězí sérum albumin (BSA) s počáteční koncentrací 1 mg/ml, z něhož byly připraveny kalibrační roztoky standardu a pracovního činidla v objemu 1 ml a s koncentracemi BSA 20; 10; 5; 2,5; 1,25 μg/ml. Jako slepý pokus (blank) byl použit roztok obsahující 10 μl destilované vody místo BSA.

Mikrosomy byly zředěny destilovanou vodou v poměru 1:49 a k 10 μl tohoto roztoku bylo přidáno 990 μl pracovního činidla.

Všechny připravené vzorky, tedy kalibrační roztoky, roztoky mikrosomů a blank byly vortexovány a inkubovány ve vodní lázni po dobu 60 minut při 60°C.

Po zahřátí vzorků byla změřena absorbance vzorků oproti blanku při vlnové délce 562 nm na spektrometru SpectroMOM 195 D. Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační přímka a z její rovnice lineární regrese byly vypočítány koncentrace proteinů v mikrosomech. Koncentrace v původním vzorku byla získána vynásobením výsledků příslušným ředěním vzorků.

3.2.4. Elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE)

Elektroforesa je elektromigrační separační metoda, která se používá k rozdělení proteinů v elektrickém poli. Používá se diskontinuální uspořádání polyakrylamidového gelu [50]. Aniontový detergent dodecylsíran sodný (SDS), který se váže na polypeptidové řetězce jednotlivých bílkovin, denaturuje je a uděluje jim záporný uniformní náboj, který překrývá vlastní náboj proteinu. Tím je zajištěna migrace v elektrickém poli založena na jejich rozdílné molekulové resp. zdánlivé molekulové hmotnosti [51]. Metoda je založena na několika předpokladech, z nichž nejdůležitější jsou: 1) SDS se na všechny bílkoviny váže stejným způsobem, 2) relativní molekulová hmotnost je praktický úměrná délce polypeptidového řetězce, 3)náboj SDS převáží nad vlastním nábojem proteinu [52].

Použité roztoky a pufry:

Pufr A: 0,375 M Tris; pH 8,8; 0,1% (w/v)

Polymerační roztok A: 30% (w/v) akryalmid, 0,8% (w/v) BIS, v pufru A

Pufr B: 0,125M Tris; pH 6,8; 0,1% (w/v)SDS; 0,0006% (w/v) bromfenolová modř

Polymerační roztok B: 30% (w/v) akrylamidu; 0,8% (w/v) BIS, v pufru B

Vzorkový pufr: 0,065 M Tris(HCl); 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-merkaptoethanol; 10% (v/v) glycerol; 0,003% (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8

Elektrodový pufr: 0,192 M glycin; 0,025 M Tris; pH 8,3; 0,1% (w/v) SDS

Barvicí lázeň: 1,25 g Coomassie brilliant blue R-250, 270 ml ethanol, 45ml kyselina octová, destilovaná voda do celkového objemu 500ml

Odbarvovací lázeň: 500 ml ethanol, 200ml kyselina octová, destilovaná voda, celkový objem 2 l

Směs pro přípravu spodního, separačního gelu 8% (3 sady skel): pufr A 15,4 ml; polymerační roztok A 5,6 ml; 21µl TEMED; APS (100mg/ml) 210 µl

Směs pro přípravu vrchního, zaostřovacího gelu 3% (3 sady skel): pufr B 6,3ml; polymerační roztok B 700 µl; TEMED 7 µl; APS (100mg/ml) 140 µl

Standard molekulových hmotností tzv. Marker: SigmaMarker- „Wide range“

Aparatura na elektroforesu byla sestavena ze dvou skleněných tabulek o velikosti (10x10,5 cm) se dvěma spacery (tloušťka 1 mm) a stojanu na upevnění skel. Po sestavení aparatury byla zjištěna její pevnost a neprotékavost pomocí destilované vody. Poté byl namíchán roztok pro tvorbu spodního separačního gelu a byl nalit mezi skla aparatury, ihned byl převrstven destilovanou vodou kvůli rovnosti povrchu gelu a kvůli lepší polymeraci. Gel se ponechal při laboratorní teplotě polymerovat po dobu 45 minut. Následně byla destilovaná voda odstraněná a namíchán vrchní zaostřovací gel, kterým byl převrstven gel spodní a ihned po nalití se do něho zasadil teflonový hřeben pro vytvoření 10ti jamek. Vrchní gel se nechal opět polymerizovat za laboratorní teploty po dobu 45 minut. Po této době byl do aparatury mezi dvě sady skel s nalitými a zpolymerovanými gely nalit elektrodový pufr a byl odstraněn hřeben.

Nejprve byly připraveny vzorky na elektroforézu, jaterní mikrosomy byly naředěny na konečnou koncentraci 1 mg/ml a střevní 2 mg/ml a smíchány se 4x koncentrovaným vzorkovým pufrem v poměru 3:1. Všechny vzorky byly povařeny 5 minut na vodní lázni. Vzorky byly poté nanášeny mikrodávkovačem do jamek v objemu 20 µl a standard 10 µl. Standard byl nanášen vždy na začátku gelu.

Poté byly aparatury otevřeny zespodu a vloženy do elektroforetické vany, která obsahovala elektrodový pufr. Po nasazení víka byl aparát připojen na zdroj stejnosměrného elektrického proudu. Prvních 30 minut bylo nastaveno napětí na 80 V a poté bylo zvýšeno na 150 V. Elektroforesa byla ukončena v době, kdy čelo modré barvy dosáhlo spodní části gelu.

Po proběhnutí separace byla aparatura rozebrána, a gely odděleny od skel a nechány v barvicí lázni po dobu 1 hodiny a v odbarvovací lázni byly následně ponechány přes noc. Gely, které byly použity k metodě Western blot byly v rohu od sebe oddělené značkou.

3.2.5 Western blot

Metoda spočívá v kvantitativním přenosu proteinů separovaných elektroforeticky na polyakrylamidovém gelu na membránu z nitroceluosy (NC) nebo z polyvinylidenfluoridu (PVDF). Celé této metodě se říká polosuchý přenos. Metoda umožňuje detekci konkrétního proteinu, který je na membráně imobilizován. Detekce se provádí pomocí imunologických postupů. Zbylá vazebná místa na membráně, která by způsobovala nespecifické interakce jsou zablokovány nadbytkem indiferentního proteinu. V dalším kroku se nechal studovaný protein reagovat se protilátkou proti tomuto proteinu a následně se přidala sekundární protilátka proti té primární. Sekundární protilátka je značena buď radioaktivně, nebo je konjugovaná s fluoroforem nebo enzymem. Studovaný protein je následně zjištěn buď autoradiograficky, UV světlem, nebo podle tvorby reakčního produktu po přidání chromogenního substrátu [53].

Použité roztoky a pufry:

Přenosový pufr: 0,025 M Tris; 0,129 M glycin; pH 8,3

PBS Triton X-100: 0,134 M NaCl; 1,8 mM $Na_2HPO_4.10H_2O$; 1 mM NaH_2PO_4; pH 7,2; 0,3% (w/v) Triton X-100

Blokovací roztok: 5% (w/v) odtučněné sušené mléko v PBS pufru s Triton X-100

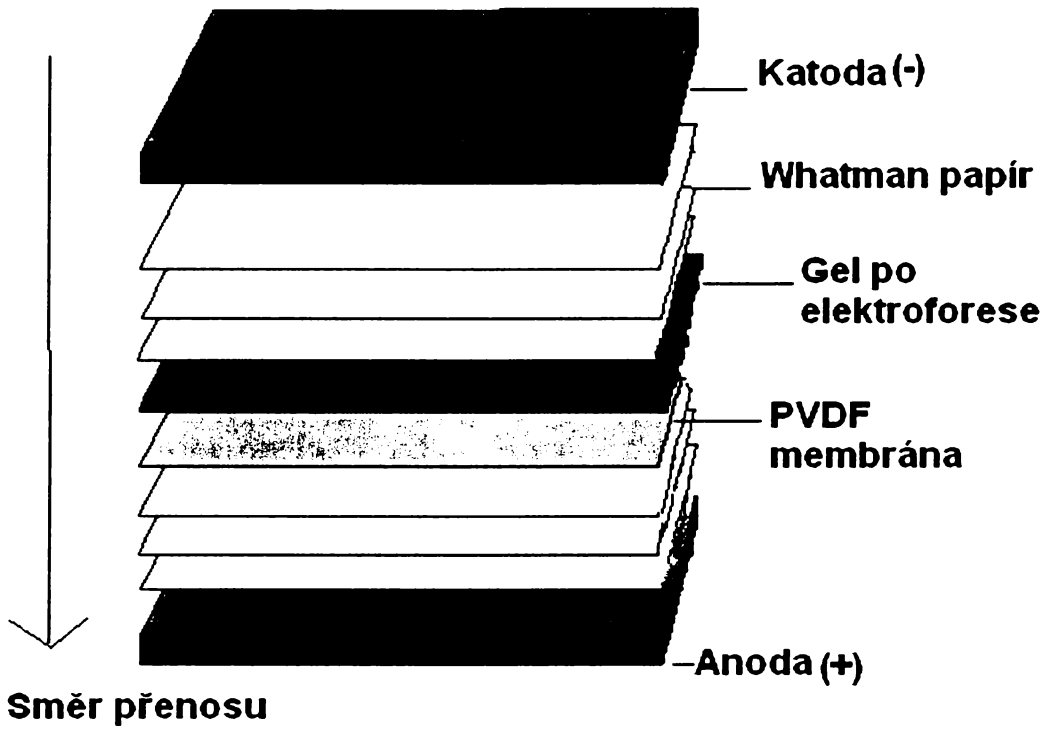
Po elektroforetickém dělení proteinů byl z polyakrylamidového gelu mechanicky odstraněn vrchní zaostřovací gel a separační gel byl inkubován v přenosovém pufru na třepačce v petriho miskách po dobu 30 minut. Pro elektro-přenos proteinů z gelu byla použita PVDF membrána, z níž byl vystřižen obdélník podle rozměrů gelu. Gely a membrány byly označeny pomocí výřezů v jejich horních rozích. PVDF membrána byla ponořena na 10 vteřin do methanolu, následně na 10 minut do vody a nakonec do přenosového pufru. Dále bylo nastříháno 6 kusů obdélníků filtračního papíru Whatman č.3. ve stejné velikosti jako přenosová membrána. Tyto papíry byly také namočeny v přenosovém pufru.

Přenosová aparatura byla omyta ethanolem a odmaštěna a na anodu byly položeny 3 vrstvy filtračního papíru Whatman č.3 a na ně PVDF membrána. Na membránu byl umístěn elektroforetický gel a přikryt dalšími 3mi vrstvami papíru. Po vytvoření tohoto „sendviče“, jehož zobrazení je ukázáno na obrázku ***Obr.6*** (str.36), byl vytlačen vzduch pomocí skleněné tyčinky. Nakonec byl celý přístroj uzavřen přiklopením víka obsahujícího katodu. Celé této metodě se říká polosuchý přenos. Přenosový proud byl nastaven na 3,5 mA násobek obsahu membrány či jejich součtu v případě většího počtu membrán. Přenos probíhal 45 minut.

Po ukončení přenosu byl „sendvič“ rozebrán, gel přenesen do barvicí lázně obsahující Comassie brilliant blue R-250 a po 30 minutách následně odbarven. Práce s gelem spočívala jen v zjištění skutečnosti, nakolik byl přenos proteinů kvantitativní. Od membrány byl odstříhnut pásek, který obsahoval standard molekulových hmotností a byl barven 10 vteřin v barvicí lázni obsahující Comassie brilliant blue R-250 a nakonec vložen do lázně odbarvovací.

Zbytek membrány byl ponechán na 10 minut ve vodě a poté byl umístěn do petriho misky s 5% odtučněným mlékem v PBS-Triton X150 a celá miska byla přes noc uchována v lednici při teplotě 4°C. Další den se k membráně přidala primární protilátka na konkrétní isoformy daného proteinu CYP1A1/2 či 2B1/2. Byla použita slepičí protilátka proti potkanímu CYP1A1/2 a na vyvolávání CYP2B1/2 byla použita slepičí protilátka proti králičímu CYP2B4. Primární protilátka proti CYP1A1/2 byla ředěna na 15 μg/ml. Proti CYP2B1/2 byla použita protilátka ředěna na 30 μg/ml. Takto byla membrána ponechána inkubovat s primární protilátkou v petriho misce v orbitální třepačce po dobu 2 hodin a poté byla primární protilátka důkladně odmyta 5% odtučněným mlékem v pufru PBS-triton X150 , tak, že 3x za sebou byla membrána promyta a nechána třepat 3-5 minut. Dále byla membrána inkubována se sekundární komerční králičí protilátkou (IgG) proti primární slepičí protilátce s navázanou alkalickou fosfatasou, naředěnou mlékem v poměru 1:1500. Inkubace probíhala na orbitální třepačce po dobu 1 hodiny. Nakonec byla membrána promyta 3x po dobu 5 minut na třepačce 5% odtučněným mlékem, poté 3x5 minut PBS Triton X-100 pufrem, a poté ještě 3x5 minut destilovanou vodou.

K samotnému zviditelnění proteinů byla použita tableta BCIP/NBT, tableta obsahující 10 mg substrátu pro alkalickou fosfatasu. Tableta byla rozpuštěna s použitím sonikátoru v 10 ml destilované vody a přidána k membráně. Po zviditelnění proteinové zóny byla reakce zastavena vložením membrány do destilované vody a následně byla membrána vysušena ve filtračním papíře.



Obr.6. *Schéma přenosové aparatury pro metodu Western blot*

3.2.6 Fluorimetrické stanovení aktivity cytochromu P450

Pro měření katalytické aktivity cytochromů P450: CYP1A1, CYP1A2 a CYP2B1/2 byly použity následující specifické substráty:

CYP1A1/2 : 7-ethoxyresorufin

CYP1A2 : 7-methoxyresorufin

CYP2B1/2 : 7-pentoxyresorufin

Které jsou dealkylovány za tvorby resorufinu, který je vhodný pro stanovení katalytických aktivit CYP. Množství fluorescence je přímo úměrné katalytické Aktivitě CYP [54].

Použité roztoky a pufry:

Pufr: 0,1 M KH_2PO_4; pH 7,4

Zásobní roztok resorufinu: 10 μM resoufin v metanolu

0,2 mM 7-ethoxyresorufin, 7-methoxyresorufin, 7-pentoxyresorufin v metanolu

5 mM NADPH

Nejprve byly připraveny roztoky resorufinu, pro sestrojení kalibrační křivky, ředěním zásobního roztoku resorufinu pufrem na konečnou koncentraci 0,4; 0,3; 0,2; 0,15; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125 μM. Slepý pokus obsahoval pouze pufr.

Všechny standardy a slepý pokus byly opatrně vortexovány.

Mikrosomální vzorky byly naředěny na konečnou koncentraci 0,5 mg/ml a byly připraveny v celkovém množství 0,5 ml (kromě vorku β-naftoflavonu (BNF), který byl ředěný na koncentraci 0,05 mg/ml). Z tohoto objemu bylo pipetováno 445 μl a přidáno 5 μl substrátu. Z takto připraveného roztoku bylo přeneseno 150 μl do jamky z 96ti jamkové mikrotitrační destičky a přidáno rychle ve stejných intervalech 17 μl roztoku NADPH, který zahajoval reakci. Následně byla destička přenesena na luminescenční fluorimetr PerkinElmer LS55, kde byla měřena fluorescence s exitační vlnové délky 530 nm (štěrbina 15) a emisní vlnové délky 585 nm (štěrbina 10). Enzymová aktivita v jednotlivých mikrosomálních preparátech byla následně vyčíslena s použitím kalibrační křivky.

3.2.7. Stanovení koncentrace cytochromu P450

Koncentrace CYP v mikrosomálních vzorcích byla stanovena metodou, kterou popsal Omura T. a Sato R. [55]. Tato metoda je založena na diferenčním spektrometrickém stanovení u kterého se využívá vazby oxidu uhelnatého (CO) na redukovaný CYP. Tento CO-komplex vykazuje charakteristické absorpční maximum při vlnové délce 450 nm.

Použitý pufr:

Pufr: 0,1 M draselný-fosfátový, 20% (v/v) glycerol; pH 7,4

Mikrosomální vzorky byly ředěny 20x pufrem do celkového objemu 1 ml. Cytochrom P450 ve vzorcích byl redukován přidáním asi 3 mg pevného dithioničitanu sodného ($Na_2S_2O_3$). Roztok v mikrozkumavce byl krátce opatrně vortexován a následně míchán po dobu asi 1 minuty. Následně byl pomocí automatické pipety roztok rovnoměrně rozdělen do 2 skleněných maskovaných mikrokyvet, které měly optickou dráhu 1 cm. Kyvety byly vloženy do spektrofotometru (Carl Zeiss Jena) Specord M40 a byla proměřena základní spektrální linie. Kyveta se vzorkem byla následně opatrně probublávána oxidem uhelnatým (CO) po dobu asi 60 s a proměřeno spektrum v rozsahu vlnových délek 401–490 nm. Byla zaznamenána hodnota absorbance při 450 nm a při 490 nm.

Koncentrace CYP byla vypočítána, s využitím Lambert-Beerova zákona, podle následujícího vzorce a vynásobena ředěním příslušného mikrosomálního vzorku.

$$cCYP = \frac{(A_{450} - A_{490})}{(\varepsilon_{450} - \varepsilon_{490}).l}.20$$

cCYP	koncentrace cytochromu P450 [μmol/l]
A λ	absorbance při dané vlnové délce
$\varepsilon_{450} - \varepsilon_{490}$	rozdíl molárních absorpčních koeficientů při uvedených vlnových délkách, který je 0,091 [cm^{-1} μmol^{-1} dm^3]
l	optická dráha kyvety [cm]
x	ředění vzorku

Specifická koncentrace cytochromu P450 ve vzorcích byla vypočítána s použitím koncentračních hodnot pro cytochrom P450 a hodnot celkového obsahu proteinů v daných mikrosomálních frakcích. K výpočtu byl použit následující vzorec:

$$Sp.cCYP = \frac{cCYP}{konc(protein)}$$

Sp.cCYP	specifická koncentrace cytochromu P450 [nm/mg]
cCYP	koncentrace cytochromu P450 [μmol/l]
konc(protein)	celková proteinová koncentrace [mg/ml]

4. Výsledky

4.1. Charakterizace mikrosomálních vzorků

Mikrosomální frakce byly izolované z jaterní a střevní tkáně z experimentálního modelu samce potkana kmene Wistar. Potkani byli rozděleni do dvou skupin po 4 jedincích a každé skupině byly podávány vybrané flavonoidy. První skupině quercetin a druhé skupině isoquercitrin. Výsledky izolace a experimentálních stanovení shrnují tabulky ***Tab.3*** a ***Tab.4*** (str.42), ve kterých jsou zaznamenány celkové koncentrace bílkovin, které byly získány stanovením s bicinchonovou kyselinou, obsah CYP a specifický obsah CYP získané výpočtem z dat ze spektrometrického stanovení CYP na základě tvorby jeho redukovaného komplexu s CO, v daných mikrosomálních vzorcích.

Tab.3 *Charakterizace jaterních mikrosomálních vzorků*

induktor	$c_{bílkovin}$ ***(mg/ml)***	c_{CYP} ***(μM)***	$c_{Spec.}$ ***CYP (nmol/mg$_{bílkovin}$)***
QJ	**23,3**	**7,2**	**0,31**
IQJ	**36,1**	**27,5**	**0,76**
RJ	**34,7***	**15,0**	**0,43**
BNFJ*	**43,4**	**31,4**	**0,72**
K	**33,8***	**21,9**	**0,64**

legenda: $m_{tkáně}$ – hmotnost odebrané tkáně, c_{CYP} – koncentrace cytochromu P450, $c_{bílovin}$–celková koncentrace bílkovin, $c_{Spec.}$CYP–specifický obsah cytochromu P450, v daných mikrosomálních vzorcích

* hodnoty převzaté od RNDr.Jitky křížkové

Tab.4 Charakterizace střevních mikrosomálních vzorků

induktor	$c_{bílkovin}$ *(mg/ml)*
QS	**4,8**
IQS	**13,5**
QM	**21,6**
IQM	**14,9**
QT	**18,2**
IQT	**15,2**
RUT	**17,7**
RUS	**13,0**
KS	**12,3**

legenda: S-proximální (přední) část tenkého střeva, M-middle (střední) část tenkého střeva, T-distální (koncová) část tenkého střeva, Q- quercetin, IQ-isoquercitrin.

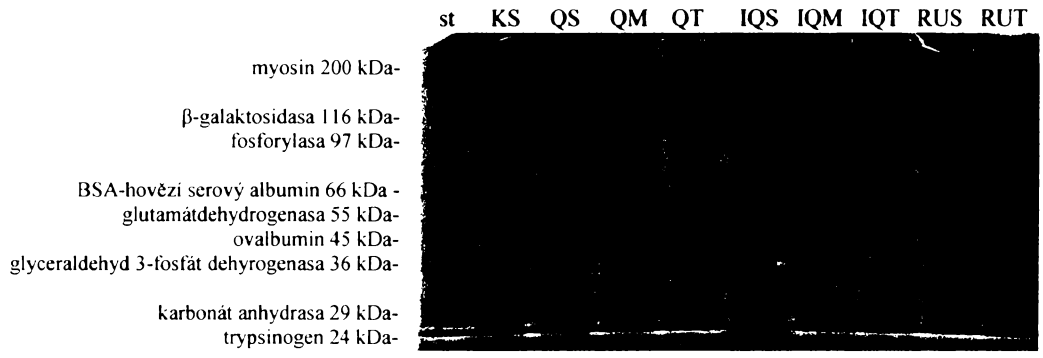
Koncentrace cytochromu P450 ve střevních vzorcích nebyla možno získat použitou spektrometrickou metodou, protože vzorky na ni byly málo citlivé.

Ze specifické koncentrace u jaterních mikrosomálních frakcí viz. tabulka ***Tab.3*** (str.41) lze vidět, že kromě quercetinu, u všech ostatních vzorků tato koncentrace v porovnání s kontrolním vzorkem narostla přibližně 2x.

4.2. Elektroforetické dělení

Elektroforesa byla použita k rozdělení proteinů v jednotlivých frakcích, byla použita gelová polyakrylamidová (PAGE) v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS). Jako vzorky byly použity jaterní a střevní mikrosomální frakce a jako standard molekulových hmotností byl použit SigmaMarker „wide range“ jehož složky včetně molekulových hmotností jsou vyobrazeny na obrázku ***Obr.7*** (str.43) spolu se elektroforeticky rozdělenými proteiny střevních mikrosomálních vzorků. Na obrázku ***Obr.8*** (str.44) zachycují separaci proteinů jaterních a střevních mikrosomálních frakcí při SDS PAGE.

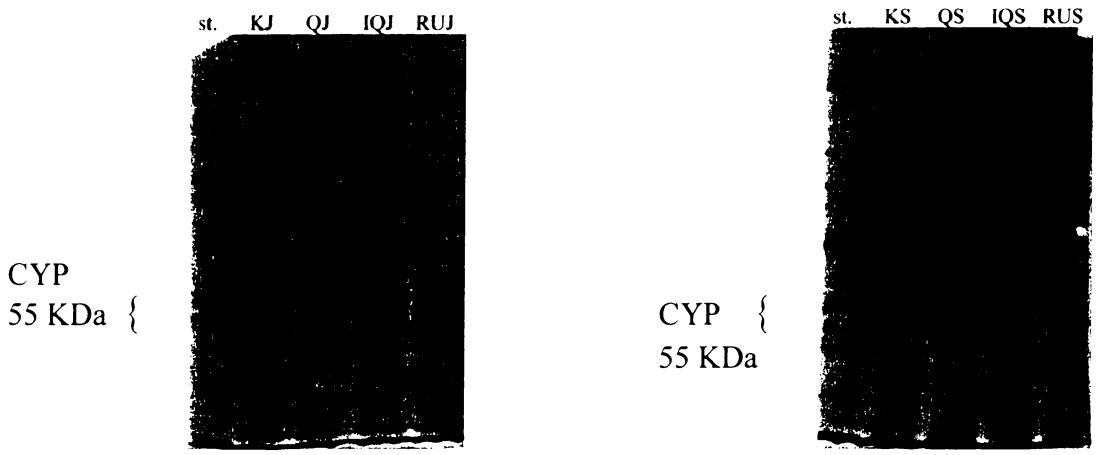
CYP1A1 a 1A2 na elektroforetickém gelu doputovali do oblasti okolo 55 kDa, což je molekulová hmotnost odpovídající savčím CYP. CYP1A1 má nepatrně větší molekulovou hmotnost než CYP1A2, tudíž doputovala gelem na kratší vzdálenost. U CYP2B1 a CYP2B2 je tomu naopak, CYP2B2 má v porovnání s CYP2B1 poněkud nižší mobilitu. Touto metodou nebylo rozdělení jednotlivýcg¨h CYP patrné, avšak metoda elektroforetického dělení proteinů dokázala mimo jiné, že k rozdělení opravdu došlo a požadované gely mohou být připraveny k následnému experimentu, kterým byla metoda Western blot.



Obr.7 *Elektroforeogram mikrosomálních střevních vzorků se standardem molekulových hmotností SigmaMarker „wide range"*

St.-standard molekulových hmotností SigmaMarker „wide range"

S-proximální (přední) část tenkého střeva, M-middle (střední) část tenkého střeva, T-distální (koncová) část tenkého střeva, Q-quercetin, IQ-isoquercitrin, R-rutin.



a) b)

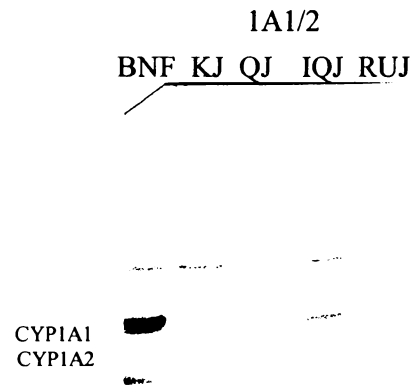
Obr.8 *Elektroforeogram mikrosomálních a) jaterních vzorků b) střevních vzorků*
legenda: st.-standard molekulových hmotností, ostatní viz seznam zkratek str.6-7.

Z gelů na obrázku ***Obr.8*** po elektroforetickém dělení je patrné, že u vzorků z jaterních mikrosomů se v oblasti CYP objevují silnější linie než u střevních vzorků.

4.3. Western blot–imunodetekce indukce CYP

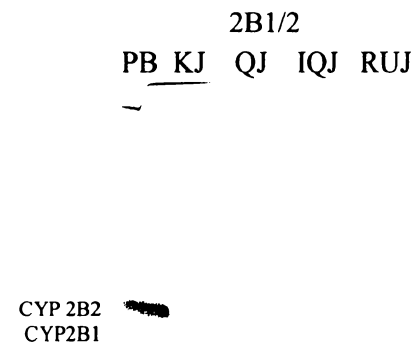
Po elektroforetickém dělení mikrosomálních proteinů byly proteiny z gelu přeneseny v elektrickém poli na povrch PVDF membrány, aby mohly být následně detekovány pomocí specifických protilátek. Byl vyhotoven imunoblot pro jednotlivé isoformy CYP, konkrétně 1A1/2 a 2B1/2. Na němž bylo možno sledovat úroveň indukce jednotlivých forem CYP. Na obrázku ***Obr.9*** (str.45) je patrná indukce CYP1A1/2 a na obrázku ***Obr.10*** (str.45) je zobrazena indukce CYP2B1/2 v jaterních mikrosomech. Tyto CYP1A1 a CYP1A2 stejně jako CYP2B1 a CYP2B2 mají vysoké procento homologie a tudíž jsou detekovány společně jednou primární slepičí protilátkou ke které se následně váže sekundární protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatasou. Pro CYP2B1/2 byla použita slepičí protilátka, která je primárně vyrobena proti králičímu CYP2B4, ale k tomuto stanovení ji lze použít, protože se též váže na CYP2B1/2 potkana protože, který je s CYP2B4 silně homologní. Výsledky imunoanalýzy CYP1A1/2 a CYP2B1/2 u střevních vzorků

jsou na obrázcích ***Obr.11.*** (str.46) a na obrázku ***Obr.12.*** (str.47), a na těchto obrázcích si lze všimnout porovnání indukce v různých částech střevní tkáně.



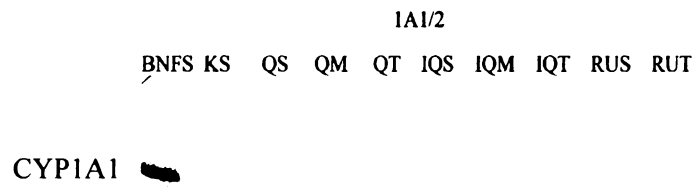
Obr.9 *Imunoblot CYP1A1/2 v jaterních mikrosomálních vzorcích*
Označení vzorků: BNF- β-naftoflavon , ostatní viz seznam zkratek str.6-7.

Z výsledků je patrné, že kromě BNF ,který je silným induktorem CYP1A1/2 v potkaních játrech a střevech (použit jako pozitivní kontrola), indukci vyvolávají i ostatní flavonoidy. Výraznými induktory CYP1A1 oproti kontrolnímu vzorku jsou isoquercitrin a rutin. Quercetin nezpůsobil indukce této isoformy CYP v příslušných mikrosomálních vzorcích. CYP1A2 (zóna s vyšší mobilitou než CYP1A1), nevykazoval významnou indukci v žádném přítomném vzorku.



Obr.10 *Imunoblot CYP2B1/2 v jaterních mikrosomálních vzorcích*
PB-fenobarbital, ostatní viz seznam zkratek str.6-7.

Žádný ze zkoumaných flavonoidů se touto metodou neprokázal jako silný induktor isoformy CYP2B2 v jaterních mikrosomálních vzorcích. Oproti kontrole slabě zvyšuje obsah CYP2B2 jen isoquercitrin a rutin. Mikrosomální preparáty připravené z jater po premedikaci potkanů fenobarbitalem byly použity jako pozitivní kontrola, a standard označující polohu CYP2B2.



Obr.11 *Imunoblot CYP1A1/2 ve střevních mikrosomálních vzorcích v různých částí tkání.*

Vzorky: viz seznam zkratek str.6-7.

Střevní mikrosomy po premedikaci β-naftoflavonem (BNFS) byly opět použity jako pozitivní kontrola. Lze si všimnout, že v porovnání s kontrolními střevními mikrosomy (KS) z proximální části, výrazná indukce nastala v této části po podání rutinu (R). Ještě znatelné zvýšení vykazoval vzorek IQM, naopak vzorek Q nevykazoval indukční shopnosti. U mikrosomálních vzorků Q byla největší indukce pozorována na začátku tenkého střeva a postupně klesala. U vzorku IQ byla největší indukce zaznamenána v prostřední části. U vzorku R, kde mikrosomy z prostřední střevní části nejsou k dispozici lze jen tvrdit, že v proximální části byla oproti distální části indukce vyšší.

2B1/2

BNFS KS QS QM QT IQS IQM IQT RUS RUT

CYP2B1/2

Obr.12 *Imunoblot CYP2B1/2 ve střevních mikrosomálních vzorcích v různých částí tkání.*

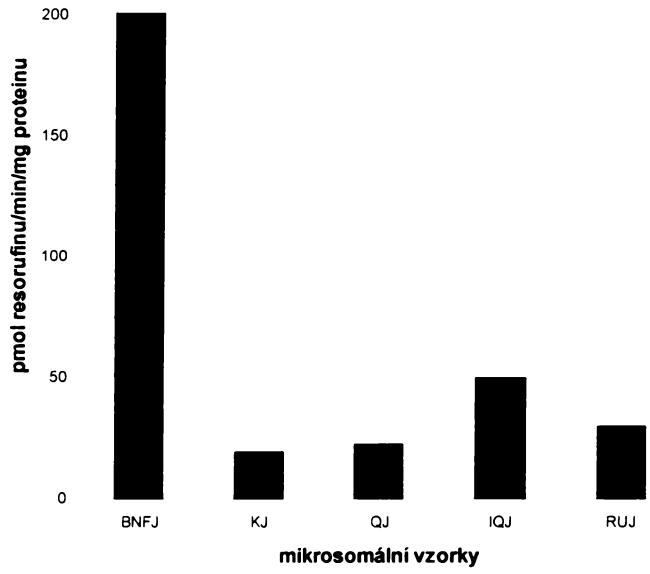
Vzorky: viz seznam zkratek str.6-7.

U střevních mikrosomálních vzorků byla imunoanalýzou isoformy CYP2B1/2 v porovnání s kontrolními mikrosomy K, prokázána zvýšená indukce u RUS a dále u Q. Vzorek IQ v této proximální části nevykazoval indukci. U Q byla největší indukce v proximální části a postupně klesala. U IQ se indukce objevila jen ve střevní části a u R v proximální, ale ne v distální.

4.4. Fluorimetrické stanovení enzymové aktivity

Deethylační aktivita CYP1A1/2 (EROD), demethylační aktivita CYP1A2 (MROD) a depentylační aktivita CYP2B1/2 (PROD) byla použita jako indikátor aktivity těchto isoforem v mikrosomálních jaterních a střevních vzorcích. Tyto isoformy jsou hlavními enzymy, které specificky metabolizují 7-ethoxyresorufin, 7-methoxyresorufin a 7-pentoxyresorufin na produkt, kterým je resorufin. Resorufin vykazuje fluorescenci, která je úměrná aktivitě příslušného enzymu, jež se reakce účastnil. Enzymové aktivity byly vypočteny pomocí kalibrační křivky, která byla sestrojena s využitím resorufinu jako standardu.

Vliv flavonoidů na EROD aktivitu CYP1A1/2, MROD aktivitu CYP1A2, a PROD aktivity CYP2B1/2 v potkaních jaterních mikrosomech je znázorněn na sloupcových grafech ***Obr.13*** (str.48), ***Obr.14*** a ***Obr.15*** (str.49).
Pro střevní mikrosomální vzorky jsou výsledky pro EROD aktivitu CYP1A1/2 pro MROD aktivitu CYP1A2 a pro PROD aktivitu CYP2B1/2 na obrázku ***Obr.16*** (str.50), ***Obr.17*** a ***Obr.18*** (str.51).



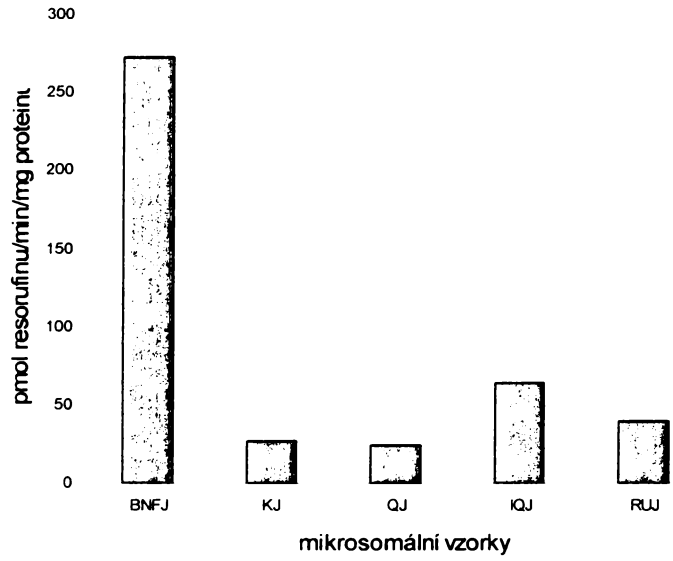
Obr.13 *Efekt vybraných flavonoidů na EROD aktivitu CYP1A1/2 v jaterních mikrosomálních vzorcích*

Vzorky: viz seznam zkratek str.6-7.

Z pozorování EROD aktivit, na obrázku ***Obr.13***, v jednotlivých vzorcích je zřejmé, že žádný z testovaných flavonoidů neovlivňuje tuto aktivitu tak silně jako BNF, použitý jako positivní kontrola.. Z vybraných flavonoidů oproti kontrole výrazně zvyšuje aktivitu isoquercitrin a rutin.

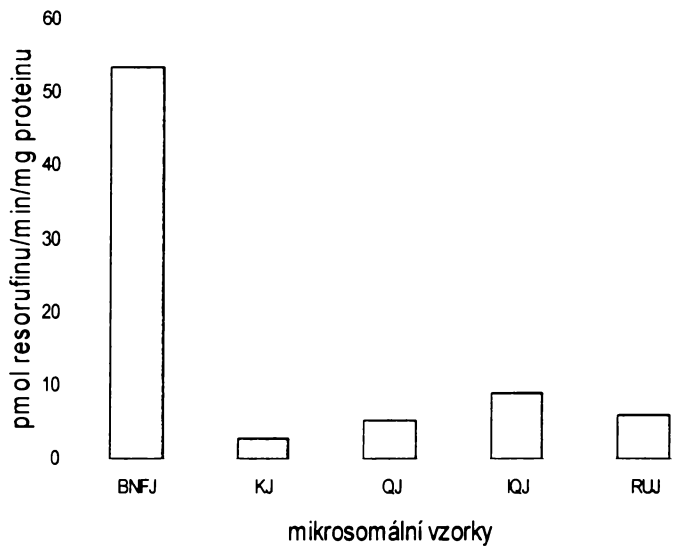
Na obrázku ***Obr.14*** (str.49) je znázorněné zvýšení MROD aktivity CYP1A2 a to také pouze quercetinem a rutinem.

Zvýšení PROD aktivity CYP2B1/2 na obrázku ***Obr.15*** (str.49), je patrné u všech vzorků, v klesajícím pořadí intenzity: IQJ, RUJ, QJ, s porovnáním s kontrolním vzorkem.



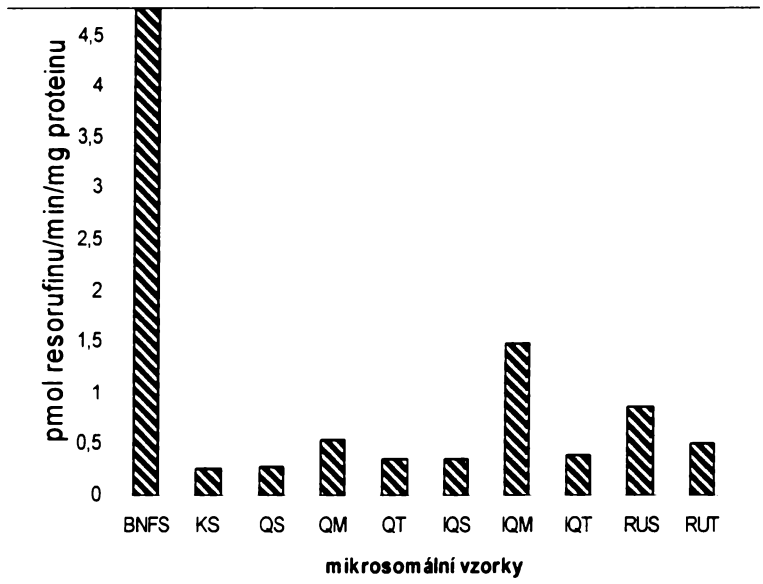
Obr.14 *Efekt vybraných flavonoidů na MROD aktivitu CYP1A2 v jaterních mikrosomálních vzorcích*

Vzorky: viz seznam zkratek str.6-7.



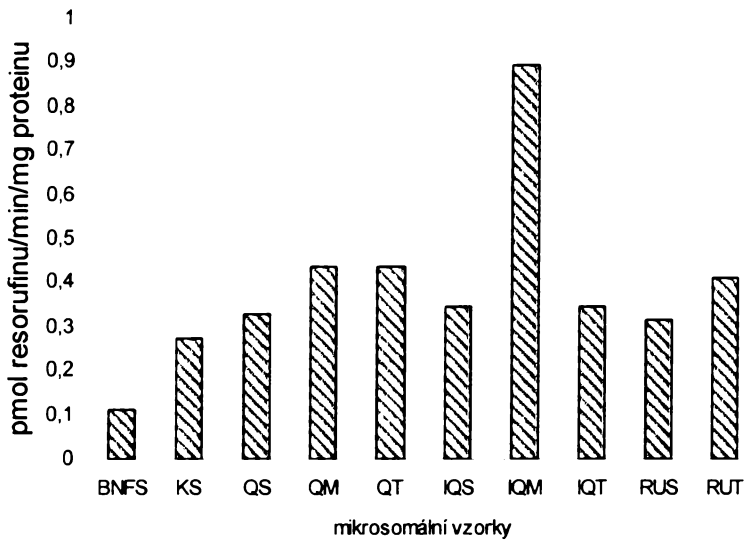
Obr.15 *Efekt vybraných flavonoidů na PROD aktivitu CYP2B1/2 v jaterních mikrosomálních vzorcích*

Vzorky: viz seznam zkratek str.6-7.



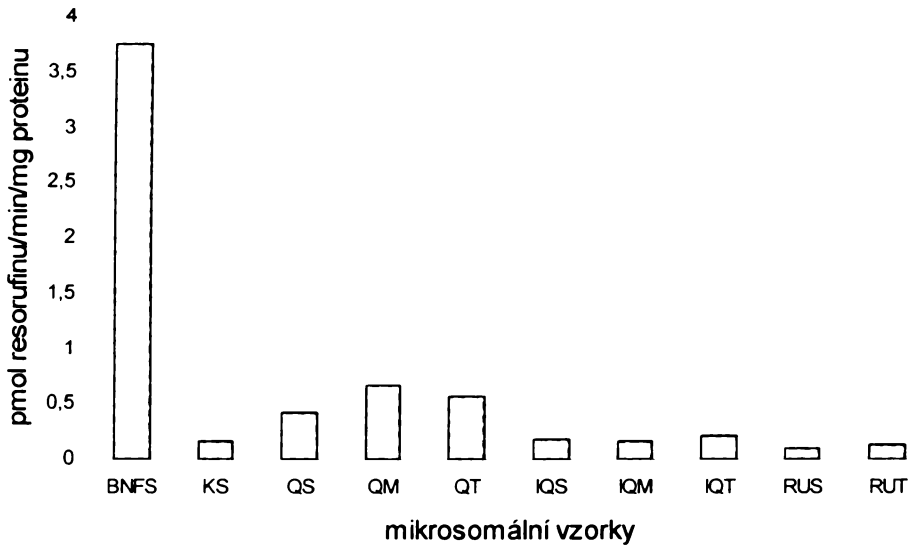
Obr.16 *Efekt vybraných flavonoidů na EROD aktivitu CYP1A1/2 v střevních mikrosomálních vzorcích*

legenda: viz seznam zkratek str.6-7.



Obr.17 *Efekt vybraných flavonoidů na MROD aktivitu CYP1A2 v střevních mikrosomálních vzorcích*

legenda: viz seznam zkratek str.6-7.



Obr.18 *Efekt vybraných flavonoidů na PROD aktivitu CYP2B1/2 ve střevních mikrosomálních vzorcích*

Vzorky: viz seznam zkratek str.6-7.

Z výsledků získaných ze střevních mikrosomálních vzorků lze zjistit, že na zvýšení EROD a MROD aktivity příslušných CYP se v menší či větší míře podílely všechny zkoumané flavonoidy. U PROD aktivity CYP 1B1/2 již tomu tak nebylo.

5. DISKUSE

Vzhledem k tomu, že flavonoidy jsou látky rostlinného původu, není na ně většinou nahlíženo jako na látky nebezpečné. Tyto látky se často z rostlinného materiálu izolují pro výrobu potravinových doplňků a léků. Významnými faktory, které určují jejich široké užívání jsou, jednak že tyto fytochemikálie mají prokázané mnohé prospěšné účinky na zdraví a jednak že jsou běžně dostupné v obchodech. Tyto doplňky se často využívají od léčebných účelů až po podporu tvorby svalové hmoty či k ovlivnění hmotnosti. Je ale nutné se zamyslet nad tím zda koncentrované flavonoidové výrobky a přírodní zdroje flavonoidů (tj. zelenina, ovoce, čaj...) mají stejné účinky. Z rozdílů obou forem konzumovaných flavonoidů, je odlišná koncentrace, tedy dávka, ve které jsou látky organismem přijímány a která ovlivňuje účinek těchto sloučenin. U flavonoidů bylo prokázáno, že mají schopnost modulovat aktivitu enzymů metabolizujících xenobiotika a že se tímto způsobem podílejí na ovlivnění metabolismu léků. Flavonoidy mohou výrazně ovlivnit biologickou dostupnost léků po perorálním použití. Tato nežádoucí interakce může způsobit buď předávkování nebo nedostatečný terapeutický účinek. Významnost tohoto ovlivnění je závislá na konkrétním případu, na citlivosti jedince a na druhu a množství flavonoidu, které je organismem přijímáno. Byly již popsány mnohé z těchto interakcí [56,57].

Gastrointestinální trakt je místo, kde se flavonoidy mohou metabolizovat, přesto je málo studií, které by zkoumaly vliv flavonoidů na obsah CYP ve střevní tkáni. Právě nedostatek validních informací z pokusů *in vivo* v této oblasti výzkumu je jeden z důvodů, proč se předkládaná práce touto problematikou zabývá.

V této práci je dokázán vliv vybraných flavonoidů jako induktorů CYP v experimentálním modelu potkana. Práce je zaměřená na zjišťování vlivu vybraných flavonoidů na modulaci isoforem cytochromu P450, důležitých pro metabolismus xenobiotik a aktivaci karcinogenů.

Každá tkáň má jedinečný CYP profil a tím i citlivost na přijatá xenobiotika. Tato skutečnost vede ke tkáňově specifické reakci na chemickou expozici. Mnohé z extrahepatálních CYP jsou v játrech také přítomny, ale často ve vyšších

koncentracích. V tenkém střevě je obsažen např. CYP1A1/2 [58], jehož přítomnost a indukce byla v předkládané práci prokázána.

Jak ukazují výsledky elektroforetického dělení ***Obr.8*** (str.44) a fluorimetrická stanovení aktivity CYP, ve střevních mikrosomálních vzorcích ***Obr.16-18*** (str.50,51) byl v souladu s literaturou obsah CYP menší než v jaterních vzorcích ***Obr.13-15*** (str.48,49)

Při zjišťování specifického obsahu CYP v různých mikrosomálních vzorcích bylo zjištěno, že po podání isoquercitrinu a v jaterních mikrosomálních vzorcích vzrostl celkový obsah CYP ***Tab.3*** (str.41). Tato skutečnost, že tento flavonoid je významným induktorem CYP, byla potvrzena i metodou Western blot ***Obr.9,10*** (str.45). Zde bylo ale zjištěno, že IQ indukuje CYP1A1/2 více než R a u CYP2B1/2 je jejich účinek srovnatelný. Fluorimetrické stanovení EROD, MROD, PROD ***Obr.13-15*** (srov.48,49)koreluje s výsledky imunodetekce. U quercetinu, flavonoidu, který oproti ostatním použitým nemá sacharidovou složku, byly pozorovány jiné výsledky. Specifický obsah CYP byl po aplikaci tohoto flavonoidu v jaterních mikrosomech dokonce nižší. Imunodetekce neprokázala u jaterních mikrosomů výrazné ovlivnění ani jedné isoformy CYP. Z fluorimetrických stanoveních EROD byla aktivita srovnatelná s kontrolou. Tyto výsledky ukazují na skutečnost, že Q není induktorem isoformy CYP1A1 a CYP2B1/2.

Důvod proč se pozorují u specifických obsahů odlišné výsledky, je skutečnost, že při tomto stanovení se měří koncentrace všech přítomných CYP a výsledný obsah je souhrn všech jeho modulací , ke kterým po podání flavonoidu došlo. Některé CYP mohly být vybraným flavonoidem indukovány, jiné inhibovány.

U střevních mikrosomálních vzorků je již na gelu po elektroforetickém dělení ***Obr.8*** (str.44) patrné, že obsah CYP je v těchto vzorcích menší než v jaterních. K tomu mohla přispět i skutečnost, že trávicí trakt obsahuje peptidasy, které mohly snížit obsah nativního CYP degradací např. během izolace. Výsledky EROD a MROD aktivity ***Obr.16-18*** (str.50,51) vykazují stejný trend jako

imunodetekce., opět největší nárůst aktivity ve střední části, a v ostatních částech srovnatelný. Střevní peptidasy jsou i důvodem proč na imonoblotu se pozoruje indukce, ale ke zvýšení aktivity proteinu nedošlo. Tato situace nastala při indukci CYP2B1/2 u vorku IQM a RUS, kde na imunoblotu ***Obr.12*** (str.47) je patrná indukce ale aktivita PROD ***Obr.18*** (str.51) s těmito výsledky nekoreluje. Imunodetekce CYP1A1/2 ***Obr.11*** (str.46) vzorku R ukazuje silnou indukci v proximální části , která zřetelně koreluje s až dvounásobným zvýšením EROD aktivity ***Obr.16*** (str.50). U MROD aktivity ***Obr.17*** (str.50) takové zvýšení v proximální části nepozorujeme. Tento fakt zřejmě znamená, že za EROD aktivitu v proximální části může z významné části CYP1A1. Střevní vzorek Q imunodetekcí CYP1A1/2 ***Obr.11*** (str.46) nevykazoval žádnou indukci, ale u MROD a PROD aktivity zvyšoval aktivitu a to nejvíce ve střední a distální části ***Obr.16,17*** (str.50). U PROD.aktivity ***Obr.18*** (str.51) byl quercetin jako jediný flavonoid, který se výrazně podílel na zvýšení aktivity CYP2B1/2 ve střevních mikrosomálních vzorcích.

Jak je patrné z předkládané práce místo vstřebání a druh a forma flavonoidů jsou jistě faktory, které ovlivňují indukci cytochromu P450 a tím se mohou podílet na změně metabolismu léčiv a karcinogenů. Dále lze poukázat na to, že glykosylované flavonoidy jako isoquercitrin a rutin jsou účinnějšími induktory CYP1A1/2 i CYP1B1/2 v jaterních mikrosomálních vzorcích a CYP1A1/2 v střevních mikrosomálních vzorcích, oproti quercetinu, který glykosylovou složku nemá. Isoquercitrin nejvíce indukoval CYP1A1/2 ve střední části střeva ***obr.11*** (str.46), a to by mohl být ten okamžik kdy je degradován střevními mikroorganismy na formu (předpokládá se, že na aglykon) která je této indukce schopna. Důvodem proč takto nepůsobí v této části i quercetin je zřejmě jeho dřívější degradace peptidasami.

6. Závěr

- Jako modelové sloučeniny byly vybrány přírodní flavonoidy, které se přidávají do potravinových doplňků a to: quercetin-neglykosylovaný flavonoid, isoquercitrin a rutin-glykosylované flavonoidy.

- Jako experimentální model, byl vybrán samec potkana. Potkani byly premedikovánany perorálně vybranými flavonoidy a byla z nich odebrána jaterní a střevní tkáň.

- Indukce isoforem CYP1A1/2 a CYP2B1/2 byla zjištěna pomocí imunodetece s použitím specifických slepičích protilátek. Modulace aktivity byla zjištěná pomocí EROD, MROD a PROD aktivity.

- V jaterních mikrosomálních vzorcích byla pozorována indukce všemi vybranými flavonoidy. Jako nejúčinnější induktor CYP1A1/2 i CYP2B1/2 byl ve všech případech isoquercitrin.

- Ve střevních mikrosomálních vzorcích byla také zjištěna indukce CYP. U CYP1A1/2 byl nejúčinnější induktore rutin a isoquercitrin. Isoquercitrin, zvyšoval významně i aktivitu MROD CYP1A2. Oba účinky na aktivitu i obsah CYP1A1/2 isoquercitrinu byly nejintenzivnější ve střední části střeva. U CYP2B1/2 imunodetekcí se ukázal být jako induktor quercetin, v přední a střední časti střeva a tato skutečnost byla znatelná i ze zvýšení PROD aktivity. Imunodetekcí byl zjištěn i induktor isoquercitrin a to nejvíce ve střední části, avšak u tohoto vzorku ke zvýšení PROD aktivity nedošlo. Dále byl imunodetekcí indukční vliv na proteinové úrovni prokázán též po aplikaci rutinu a nejvíce v přední části střeva, tento efekt ale nekoreloval s naměřenou PROD aktivitou.

7. Seznam použité literatury

[1] Stiborová, M.: Biochemie jako teoretický základ biomedicíny, Přednáška na PřF UK, Praha, katedra biochemie (2009)

[2] Doll, R., Peto, R., J. Natl. Cancer Inst. 66, 1191, (1981)

[3] Klener, P.: v Protinádorová chemoterapie, Galén, Praha (1996)

[4] Schulz, W.A.: v Molecular Biology of Human Cancer, Springer Science& Business Media, Dordrecht (2005)

[5] Stiborová, M., Mikšanová, M.: Živa, 4, 146, (1999)

[6] Bartůňková, J., Hořejší, V.: v Základy imunologie, Triton, Praha, (2005)

[7] http://www.czso.cz staženo dne 17.7.2009

[8] Phillips, D.H.: Mut. Res. 577, 284 (2005)

[9] Klouda, P.: v Základy biochemie, nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2005

[10] Nesměrák, K.: Toxikologie, Přednáška na PřF UK Praha, katedra analytické chemie (2007)

[11] Josephy, P.D., Guengerich F.P., Miners, J.O.: Drug. Metab. Rev. 37, 575 (2005)

[12] Spatzenegger, M., Jaeger, W.: Drug Metab. Rev. 27, 397 (1995)

[13] Rendic, S., DiCarlo, F.J.: Drug Metab. Rev. 29, 413 (1997)

[14] Gonzales, F.J.: Mut.Res, 569, 100 (2005)

[15] Garfinkel, D.: Arch. Biochem. Biophys. 77, 493 (1958)

[16] Klingenberg, M.: Arch. Biochem. Biophys. 75, 376 (1958)

[17] Omura, T. Biochem. Biophys. Res. Comm. 266, 690 (1999)

[18] Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Rudakov Yu.O., Kuznetsova G.P.,Samenkova, N.F., Lisitsa, A.V., Karuzina, I.I., Archakov, A.I. : J. Biomed. Chem., 101, 859 (2007)

[19] Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: Chem. listy , 93, 229 (1999)

[20] Omura, T.: Chem. Biol. Interact. 163, 86 (2006)

[21] Dawson, J.H., Anderson, L.A.,Sono, M.: J. Biol. Chem. 257, 3606 (1982)

[22] Hodgson, E.: v A textbook of modern toxikology, 3. vydání, John Wiley and Sons inc. (2004)

[23] Stiborová, M.: Biochemie II, Přednáška na PřF UK, Praha, katedra biochemie (2009)

[24] Nebert, D.W., Nelson, D.R., Adesnik, M., Coon, M.J.,Esrabrook, R.W., Gonzales, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C, Johnson, E.F., Kemper, B., Levin, W., Phillips, J.R., Sáto, R., Waterman, M.R.: DNA, 8, 1 (1989)

[25] Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J, Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W.: Pharmacogenetics, 6, 1 (1996)

[26] Nebert, D.W., McKinnon, R.A.: Prog. Liver. Dis., 12, 63 (1994)

[27] http://drnelson.utmem.edu/P450lect.htm, staženo dne 1.8.2009

[28] Eaton, D.L., Gallagher, E.P., Bammler, T.K., Kunze, K.L.: Pharmacogenetics 5, 259 (1995)

[29] Stoilov, I., Nurten, A., Sarfarazi, A., Sarfarazi, M.: Hum. Mol. Gen. 6, 641 (1997)

[30] Trattier, E., Belzil, A., Stoltz, C., Anderson, A.: Gene, 158, 263 (1995)

[31] Nelson, D.R.: Arch. Biochem. Biophys., 409, 18 (2003)

[32] Yan, Z., Caldwell, G.W.: Cur. Top. Med. Chem., 1, 403 (2001)

[33] Hollenberg, P.F.: Drug Metab. Rev., 34, 17 (2002)

[34] Nebert, D.W., Nelson, D.R., Feyereisen, R.: Xenobiotica, 19, 1149 (1989)

[35] Watkins, P.B., Wrighton, S.A., Maurel, P., Schuetz, E.G., Mendez-Picon, G., Parker, G.A., Guzelian, P.S.: Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 6310 (1985)

[36] Pelkonen, O., Turpienen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., Raunio, H.: Arch. Toxicol., 82, 667 (2008)

[37] Greenwald, P., Kelloff, G., Burch-Whitman, C., Kramer, B.S.: CA Cancer J. Clin., 45, 31 (1995)

[38] Hong, W.K., Sporn, M.B.: Rec. Adv. Chem. Car., 278, 1073 (1997)

[39] Wattenberg, L.W.: Cancer Res., 45, 1 (1985)

[40] Surh, Y.J.: Nat. Rev. Cancer., 3, 768 (2003)

[41] Hodek, P., Křížková, J., Burdová, K., Šulc, M., Kizek, R., Hudeček, J., Stiborová, M.: Chem. Biol. Interact., 180, 1 (2009)

[42] Birt, D.F., Hendrich, S., Wang, W.: Pharm. Ther., 90, 157 (2001)

[43] Fomica, J.V., Regelson, W.: Chem. Toxicol., 33, 1061 (1995)

[44] Galati, G., O´Brien, P.J.: Free Rad. Biol. Med., 37, 287 (2004)

[45] Aula, A.M., O´Leary, K.A., Williamson, G., Ojala, M., Bailey, M., Pimmia-Pupponen, R., Nuutila, A.M., Oksman-Caldentey, K.M., Poutanen, K.: J. Agric. Food Chem., 50, 1725 (2002)

[46] Skibola, CH.F., Smith, M.T.: Free Rad. Biol. Med., 29, 375 (2000)

[47] Hollman, P., Katan, M.: The Am. J. Clin. Nut., 62, 1276 (1995)

[48] Van der Hoeven, T.A., Coon, M.J.: J. Biol. Chem., 249, 6302 (1974)

[49] Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Maliia, A.K, Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C.: Anal. Biochem. 150, 76 (1985)

[50] Laemmli, U.K.: Nature, 227, 680 (1970)

[51] Krajhanzl, A., Hladík, J., a kol.: v Biochemické metody, Karolinum Praha, (1991)

[52] Hudeček, J.: Metody biochemie, Přednáška na PřF UK, Praha, katedra biochemie (2009)

[53] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 4350 (1979)

[54] Burke, M.D., Mayer, R.T.: Drug Metab. Dispos., 2, 583 (1974)

[55] Omura, T., Sato, R.: J. Biol. Chem., 239, 2379 (1964)

[56] Bailey, D.G., Malcolm, J., Spence, D.A., Spence, J.D.: Br. J. Clin. Pharmacol, 46, 101 (1998)

[57] Fuhr, U.: Drug Saf., 18, 251 (1998)

[58] Ding, X., Kaminsky, L.S.: Anual Rev. Pharmacol. Toxic., 43, 149 (2003)

Svoluji se zapůjčením této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka