

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE**



**ROSTLINNÝ ALKALOID SANGUINARIN A JEHO
DERIVÁTY**

PLANT ALKALOID SANGUINARINE AND ITS DERIVATIVES

Bakalářská práce

Lucie Tůmová

Školitel : Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2010

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 1. června 2010

Lucie Tůmová

Poděkování:

Děkuji své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za laskavý přístup, neocenitelnou pomoc, hodnotné a inspirující rady a všestranný zájem, který mi poskytla během vypracování této práce.

Práce byla vypracována jako součást řešení grantů GAČR (P301/10/0356) a MŠMT ČR (MSM 0021620808).

OBSAH

Seznam zkratk	5
Abstrakt	6
Abstract	7
1. Úvod	8
2. Cíl práce	10
3. Sanguinarin a příbuzné látky jako rostlinné produkty	11
4. Biologické (fyziologické) účinky kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů	13
4.1. Vliv kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů na apoptosu ..	15
4.2. Interakce kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů s DNA a proteiny	17
4.3. Antihypertenzní účinky kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů	19
5. Metabolismus kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů	20
5.1. Biosyntéza sanguinarinu	23
5.2. Metody určení struktury metabolitů benzo[c]fenantridinových alkaloidů	23
6. Metabolismus cizorodých látek	24
6.1 Enzymy metabolizující cizorodé látky	25
6.1.1 Mikrosomální monooxygenasový systém	25
6.1.1.1 Cytochrom P450	26
6.1.1.2 NADPH:cytochrom P450 reduktasa	29
6.1.1.3 Membránové lipidy	30
6.2. Enzymy metabolizující kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy	30
7. Závěr	32
Seznam použité literatury	34

Seznam zkratek

AT_(1, 2, 1A, 1B)	angiotensinový receptor (1, 2, 1A, 1B)
ATP	adenosintrifosfát
Bax	proapoptotický onkoprotein
Bcl-2	antiapoptotický onkoprotein
CYP	cytochrom P450
CYP1A1	cytochrom P450 1A1
CYP1A2	cytochrom P450 1A2
δ	delta
DHSA	dihydrosanguinarin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
GC	guanin-cytosin
GIT	gastrointestinální trakt
CHE	chelerythrin
IκBα	inhibiční podjednotka jaderného faktoru kappa B (NF-κB)
IR	infračervená spektroskopie
M	mol/l
MS	hmotnostní spektrometrie
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NF-κB	jaderný faktor kappa B
NMR	nukleární magnetická rezonance
QBA	kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy
RAS	renin-angiotensinový systém
SA	sanguinarin

Abstrakt

Práce sumarizuje dosavadní poznatky o sanguinarinu a kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidech. Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy se nachází v kořenech rostlin *Sanguinaria canadensis* a *Macleaya cordata*. Od dávných dob jsou extrakty z těchto rostlin využívány v tradiční čínské medicíně pro své antimykotické, antibakteriální a protizánětlivé účinky. Vzhledem ke schopnosti kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů přivodit apoptosu jsou zkoumány jako potenciální agens využitelné v managementu rakoviny. Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy interagují s DNA a proteiny. Jsou schopny interkalovat do DNA. Lze je využívat jako fluorescenční DNA sondy. Metabolismus sanguinarinu a dalších kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů dosud není plně objasněn. První krok detoxikace sanguinarinu je přeměna na méně toxický dihydrosanguinarin. Oxidace sanguinarinu se účastní cytochrom P450 1A1.

Klíčová slova:

Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy, sanguinarin, apoptosa, interkalace, cizorodé látky, enzymy, cytochrom P450

Abstract

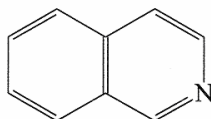
This work is summarizing actual knowledge about sanguinarine and quaternary benzo[c]fenanthridine alkaloids. The quaternary benzo[c]fenanthridine alkaloids were found in roots plants *Sanguinaria canadensis* and *Macleaya cordata*. This plants are used in traditional Chinese medicine for its antimycotic, antibacterial and anti-inflammatory activities since antiquity. Regarding to possibility quaternary benzo[c]fenanthridine alkaloids to induce apoptosis these investigated such as possible agents for cancer treatment. The quaternary benzo[c]fenanthridine alkaloids interact with DNA and proteins. They are able to intercalate to the DNA. The alkaloids can be used like fluorescence DNA probe. Metabolism by sanguinarine and next quaternary benzo[c]fenanthridine alkaloids has not yet completely determined. The first step sanguinarine detoxication is its conversion to less toxic dihydrosanguinarine. Sanguinarine oxidation is mediated by cytochrome P450 1A1.

Key words:

Quaternary benzo[c]fenanthridine alkaloids, sanguinarine, apoptosis, intercalate, heterogenous substances, enzymes, cytochrom P450

1. Úvod

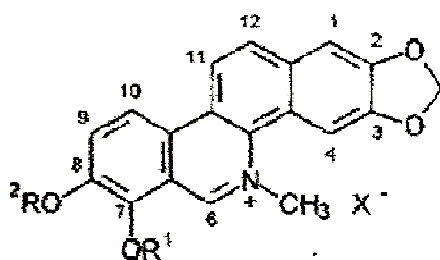
Alkaloidy jsou slabě bazické dusíkaté sloučeniny rostlinného původu, dříve označované jako rostlinné alkálie a od tohoto byl odvozen i jejich název (McMurry, 2007). Kvartérní benzo[c]fenantridinové (benzo[c]fenanthrenové) alkaloidy patří do skupiny isochinolinových alkaloidů (Slaninová et al., 2008). Jejich hlavní jednotkou je isochinolin (Obr. 1, převzato z McMurry, 2007), jak název napovídá.



Obr. 1 Chemická struktura isochinolinu (převzato z McMurry, 2007)

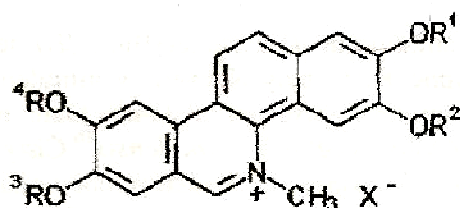
Geometrické uspořádání aromatických kruhů je přibližně stejné u všech kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů a jejich struktura není úplně planární. Poruchu planarity zřejmě způsobuje interakce methylové skupiny vázané na dusíku s vodíkem na atomu uhlíku C4. Planární rozložení atomů ruší orientace substituentů na atomech uhlíků 2,3 a 7,8. Ty většinou leží v rovině aromatického kruhu, pouze methoxylový substituent na uhlíku C7 je orientován ve směru kolmém k tomuto uhlíku. Methoxy skupina interaguje s vodíkem na atomu C6 se skupinou na atomu C8. Z těchto poznatků lze usuzovat, že alkaloidy obsahující methoxy skupinu na atomu uhlíku C7 mají nižší schopnost interkalovat do DNA (interkalace viz. odstavec 2.2.) (Slaninová et al., 2008). Základem kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů je tetracyklický skelet s navázanými methyldioxidovými, methoxylovými nebo hydroxylovými skupinami. Podle typu substituce základního skeletu se kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy třídí do čtyř skupin (Dostál & Slavík, 2000):

- 1) 2,3,7,8-tetrasubstituované, kam patří například sanguinarin a chelerythrin (Obr. 2, str. 9, převzato z Dostál & Slavík, 2000)
- 2) 2,3,8,9-tetrasubstituované, kam řadíme nitidin a fagaronin (Obr. 3, str.9, převzato z Dostál & Slavík, 2000)
- 3) pentasubstituované, kam řadíme sanguilutin a chelilutin (Obr. 4, str. 9, převzato z Dostál & Slavík, 2000)
- 4) hexasubstituované alkaloidy, například makarpin (Obr. 5, str. 9, převzato z Dostál & Slavík, 2000)



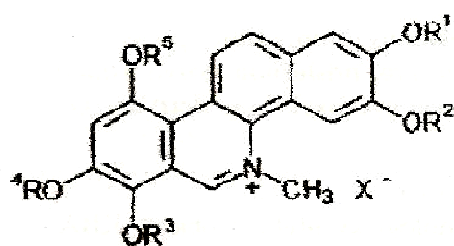
Sanguinarin $R^1 + R^2 = CH_2$
Chelerythrin $R^1 = R^2 = CH_3$

Obr. 2 Struktura 2,3,7,8-tetrasubstituovaných kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů (převzato z Dostál & Slavík, 2000)



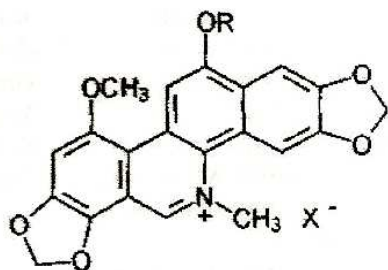
Nitidin $R^1 + R^2 = CH_2, R^3 = R^4 = CH_3$
Fagaronin $R^1 = H, R^2 = R^3 = R^4 = CH_3$

Obr. 3 Struktura 2,3,8,9-tetrasubstituovaných kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů (převzato z Dostál & Slavík, 2000)



Sanguilutin $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = CH_3$
Chelilutin $R^1 + R^2 = CH_2, R^3 = R^4 = R^5 = CH_3$

Obr. 4 Struktura pentasubstituovaných kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů (převzato z Dostál & Slavík, 2000)



Makarpin $R = CH_3$

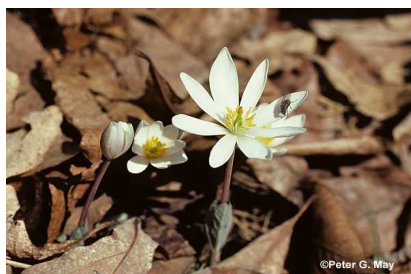
Obr. 5 Struktura hexasubstituovaných kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů (převzato z Dostál & Slavík, 2000)

2. Cíl práce

Cílem této práce je sumarizovat doposud publikované poznatky o sanguinarinu a dalších kvartérních benzo[c]fenantridinových (benzo[c]fenanthrenových) alkaloidech (rešerže) za účelem poukázat na doposud méně prozkoumané oblasti, například metabolismus kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů.

3. Sanguinarin a příbuzné látky jako rostlinné produkty

Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy (QBA) jsou obsaženy v rostlinných druzích *Macleaya cordata*, *Sanguinaria canadensis* a *Chelidonium majus*, které patří do rostlinných čeledí mákovitých (*Papaveraceae*), zemědýmovitých (*Fumariaceae*) a routovitých (*Rutaceae*). Sanguinarin (SA) a chelerythrin (CHE) jsou typickými reprezentanty kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů. V rostlinách jsou často doprovázeny menším množstvím dalších zástupců kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů jako jsou chelidonin, chelilutin, sanguilutin, berberin, nitidin, chelirubin, sanguirubin, fagaronin, protopin, makarpin a další (Dostál & Slavík, 2000; Vespalec et al., 2003; Dvořák et al., 2006; Zdařilová et al., 2006; Suchomelová et al., 2007; Slaninová et al., 2008; Stiborová et al., 2008). Největším producentem kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů je pravděpodobně *Sanguinaria canadensis* L. (Obr. 6, převzato z www.botaniliberec.cz/foto/detail/?f=173, www.vilcakul.estranky.cz/fotoalbum/lecive-rostliny/lecive-rostliny/26, staženo 21.3.2010) vyskytující se nejvíce v oblastech severní Ameriky. Sanguinarin a chelerythrin se také v hojném množství nachází v rostlině

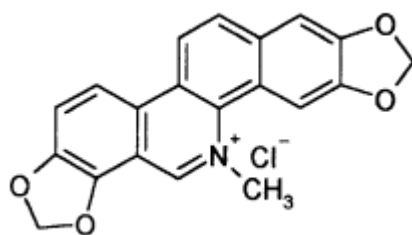


Obr. 6 *Sanguinaria canadensis* L. z čeledi *Papaveraceae* (převzato z www.botaniliberec.cz/foto/detail/?f=173, www.vilcakul.estranky.cz/fotoalbum/lecive-rostliny/lecive-rostliny/26, staženo 21.3.2010)

Dicranostigma lactucoides HOOK. f. et THOMS pocházející ze subtropického regionu východního Himalájského pohoří. Další neméně významné rostliny obsahující alkaloidy jsou dva druhy rodu *Macleaya*, a to *Macleaya microcarpa* a *Macleaya cordata*, které se vyskytují převážně v Číně a okolních státech a dále rostliny rodu *Bocconiaze* (např.

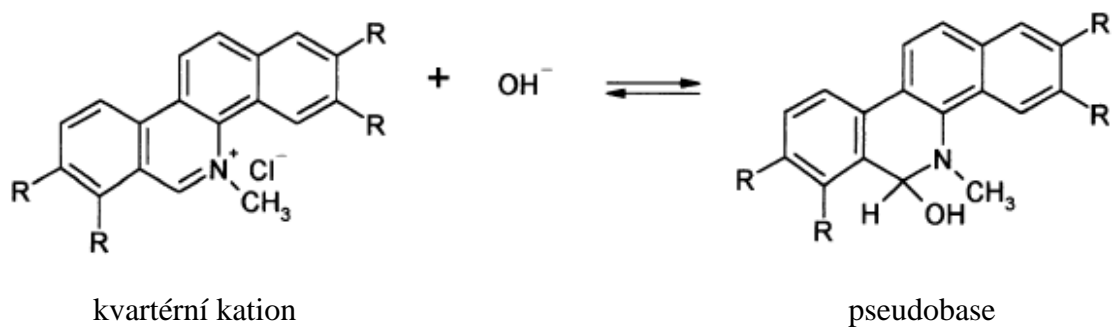
Bocconia frutescens), vyskytující se v Jižní a Střední Americe. Nejen u nás, ale i v celé Evropě, je jediným zdrojem produkujícím sanguinarin ve větším množství bylina *Chelidonium majus* L., známá jako vlaštovičník větší. Je zajímavé, že zpravidla v kořenech rostliny je obsaženo více kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů než v nadzemních částech rostliny, a to i několikanásobně (Dostál & Slavík, 2000; Suchomelová et al., 2007).

Sanguinarin (Obr. 7, převzato z Vespalec et al., 2003) spolu s dalšími kvartérními benzo[c]fenantridinovými alkaloidy jsou pokládány za sekundární metabolity, tzv. fytoalexiny. Rostliny reagují produkcí kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů, jako je sanguinarin, chelerythrin, makarpin a další, na stres a chrání se tak před mikrobiálními patogeny nebo houbami (Pšotová et al., 2006 a; Zdařilová et al., 2006; Vrba et al., 2009). Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy jsou výrazně zbarvené. Jejich barva je způsobená kvartérním kationtem a kondenzovanými aromatickými jádry s navázanými elektron-donorovými substituenty obsahujícími kyslík. Nejen díky konjugovaným dvojným vazbám má sanguinarin červenou a chelerythrin žlutou barvu (Vespalec et al., 2003).



Obr. 7 *Struktura kvartérní soli sanguinarinu (převzato z Vespalec et al., 2003)*

Zda se kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy vyskytují ve formě polárního barevného kvartérního kationtu nebo ve formě tzv. pseudobáze (6-hydroxydihydroderivát) (Obr. 8, str. 13, převzato z Vespalec et al., 2003), která je nepolární, bezbarvá a nerozpustná ve vodě, rozhoduje pH prostředí (Dostál & Slavík, 2000; Vespalec et al., 2003; Zdařilová et al., 2006; Slaninová et al., 2008). „Za fyziologického pH (7,2-7,4) procházejí alkaloidy buněčnou membránou ve formě 6-hydroxydihydroderivátu, který je v cytoplasmě v rovnováze s kvartérním kationtem“ (Zdařilová et al., 2006)



Obr. 8 *Schema interakce kvartérního kationtu s hydroxylem*
(převzato z *Vespalec et al., 2003*)

Iminiová vazba kvartérního kationtu je polární a vnímavá k nukleofilnímu ataku, hraje stěžejní roli v inhibici SH-proteinů a je redukována pomocí NADH nebo NADPH (Vespalec et al., 2003; Psotová et al., 2006 a; Mackraj et al., 2008).

4. Biologické (fyziologické) účinky kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů

Výtažky z rostliny *Macleaya cordata* (Obr. 9, str. 14, převzato z [www.rostliny.net/roslina/ Macleaya Cordata](http://www.rostliny.net/roslina/Macleaya_Cordata), staženo 21.3.2010) obsahující kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy, hlavně sanguinarin a chelerythrin, jsou již od dávných dob používány v tradiční čínské medicíně pro své antimikrobilání, protizánětlivé a antimykotické účinky (Kosina et al., 2004, Stiborová et al., 2008).



Obr. 9. *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. (převzato z [www.rostliny.net/rostlina/Macleaya Cordata](http://www.rostliny.net/rostlina/Macleaya_Cordata), staženo 21.3.2010)

Díky těmto vlastnostem se sanguinarin a/nebo chelerythrin používá do zubních past a ústních vod proti zubnímu plaku a zánětu dásní nebo se přidávají jako aditivum do krmiva pro domácí zvířata (Hu et al., 2001; Dvořák et al., 2006; Stiborová et al., 2008; Vrublová et al., 2008). Vzhledem k mnohým biologickým účinkům a aktivitám kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů, jako jsou již zmíněné antimikrobiální, protizánětlivé, antimykotické a dále protinádorové, antivirové a lokálně anestetické účinky, je o kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy a zejména o sanguinarin a chelerythrin projevován stále větší zájem především z hlediska farmakologie a toxikologie (Dvořák et al., 2006; Malíková et al., 2006; Zdařilová et al., 2006; Philchenkov et al., 2008). V některých případech se sanguinarin používá k homeopatické léčbě například proti kašli nebo nachlazení, k léčbě oběhového systému nebo na křečové žíly (Jeng et al., 2007).

Některé vědecké práce uvádějí, že sanguinarin a chelerythrin a jejich dihydroderiváty pravděpodobně způsobují toxicitu hořčičného oleje kontaminovaného alkaloidy ze semen rostliny *Argemone mexicana*. Po jeho požití dochází u lidí k otravě nechvalně známé jako „epidemic dropsy syndrom“, která je popsána otokem nohou, vznikem zeleného očního zákalu, selháním ledvin a srdce a poškozením dalších životně důležitých orgánů. Také bylo navrženo, že k otravě přispívá singletový kyslík a hydroxylový radikál (Hu et al., 2001; Kosina et al., 2004; Malíková et al., 2006; Psotová et al., 2006 b; Zdařilová et al., 2006; Vrba et al., 2009). Zatím nebylo prokázáno, zda toxický efekt Argemonového oleje způsobuje opravdu sanguinarin. Má se za to, že genotoxicitu

způsobují jiné složky Argemonového oleje (Mackraj et al., 2008). Nejen díky této skutečnosti je vynakládáno velké úsilí, aby se zjistilo více informací o vlastnostech, metabolismu či efektech kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů, a to především sanguinarinu a chelerythrinu, které jsou známy a používány již od 19. stol. (Slaninová et al., 2008).

Kromě výše zmíněných biologických vlastností bylo zjištěno, že sanguinarin ovlivňuje funkci řady enzymů jako cholinesterasu, lipoxygenasu, Na^+/K^+ ATPasu, proteinkinasy C, potlačuje aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B, inhibuje topoisomerasu I a II a blokuje respirační řetězec (Weerasinghe et al., 2001 a; Hu et al., 2001; Vrba et al., 2009).

4.1. Vliv kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů na apoptosu

Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy inhibují proliferaci a podporují apoptosu a nekrosu. Jsou proto zkoumány z hlediska vhodných kandidátů pro léčbu rakoviny. Nádorové buňky jsou schopny vyhnout se apoptose, což hraje podstatnou roli v jejich rezistenci k tradičnímu protirakovinnému ošetření. Sanguinarin a chelerythrin byly označeny za inhibitory buněčného růstu působící přes indukci apoptosu v různých rakovinných buňkách (Malíková et al., 2006). Doposud bylo provedeno mnoho studií, ve kterých se zkoumaly mnohé normální i rakovinné buněčné linie. V těchto studiích alkaloidy, především sanguinarin a chelerythrin, vykazovaly toxicitu závislou na čase a koncentraci. Sanguinarin vykazoval vyšší toxicitu než chelerythrin, ale jinak u těchto alkaloidů nebyl nalezen výrazný rozdíl v efektu na normální a nádorovou buňku (Zdařilová et al., 2006).

Dihydrosanguinarin je méně toxický než sanguinarin a nezpůsobuje inhibici proteinkinasy C, ale stejně jako sanguinarin je schopen přivodit apoptosu a nekrosu buněk v závislosti na jeho množství (Vrba et al., 2009).

Apoptosa, jinak nazývaná jako „naprogramovaná“ buněčná smrt, je nejvíce zkoumaný typ buněčné smrti. Je popisována změnou propustnosti buněčné membrány, rozptýlením jaderného obsahu a kondenzací jaderné DNA s nebo bez její fragmentace, smrštěním buňky a rozpadem buněčné membrány vedoucí ke vzniku apoptotických váčků,

kteře jsou fagocytovány bez zánětlivé reakce (Weerasinghe et al., 2001 a; Malíková et al., 2006; Zdařilová et al., 2006; Jeng et al., 2009; Vrba et al., 2009).

Nekrosa je způsobená nevratným poškozením buněčné membrány souvisejícím s vyčerpáním energie v podobě ATP. Buněčný obsah se dostane k okolním buňkám, kde způsobí zánětlivou reakci a totální rozpad buňky (Zdařilová et al., 2006; Vrba et al., 2009).

Apoptosa zprostředkovaná pomocí sanguinarinu byla zjištěna v lidských buněčných liniích rakoviny prostaty, rakoviny prsu, adenokarcinomu tlustého střeva, rakoviny plic, buněk melanomu a děložního čípku a ještě v dalších rakovinných buněčných liniích. Chelerythrinem způsobená apoptosa byla pozorována v buněčných liniích lidské rakoviny prsu, rakoviny střeva a v potkaních neonatálních srdečních myocytech (Malíková et al., 2006; Zdařilová et al., 2006).

Mezi regulátory apoptosu se řadí proteiny rodiny Bcl-2. Členové rodiny proteinů Bcl-2 ovlivňují apoptosu buď pozitivně nebo negativně. V této souvislosti byly zkoumány proapoptotický protein Bax, antiapoptotický protein Bcl-2 a též transkripční faktor NF- κ B. Bax je člen rodiny proteinů Bcl-2. Bax může s Bcl-2 tvořit heterodimer, a tím potlačovat proapoptotické účinky. Výsledkem působení proteinů Bcl-2 rodiny na „naprogramovanou“ buněčnou smrt je aktivace specifických proteolytických enzymů kaspas. Proteiny Bcl-2 rodiny jsou schopny řídit uvolňování cytochromu *c* z mitochondrií do cytosolu. (Weerasinghe et al., 2001 b; Malíková et al., 2006; Zdařilová et al., 2006).

Účinky sanguinarinu a chelerythrinu na lidské leukemické linie buněk a buněk nádorů děložního čípku byly závislé na jejich koncentraci. Buňky ošetřené koncentrací alkaloidů 2-10 μ M vykazovaly apoptosu doprovázenou zvýšením exprese Bax, aktivací kaspasy-3 a snížením proteinu NF- κ B. Koncentrace v rozmezí 8-17 μ M navodila onkosu. Onkosa se projevuje otokem, zpuchýřkovatěním, vakuolizací a zvýšenou propustností cytoplasmatické membrány. Nedošlo k aktivaci kaspasy-3, ale vyšší koncentrace sanguinarinu způsobila snížení exprese Bax a zvýšení proteinu NF- κ B. A konečně při vystavení buněk koncentraci alkaloidů okolo 20 μ M byla jako dominantní pozorována nekrosa. Apoptotickou odezvu na působení sanguinarinu způsobilo zřejmě předčasné vyčerpání redukovaného glutathionu a aktivaci kaspasy-3/7 (Malíková et al., 2006; Zdařilová et al., 2006).

V apoptose hraje důležitou roli i již zmíněný jaderný transkripční faktor NF- κ B, považovaný za antiapoptotický regulátor. Mechanismus, kterým NF- κ B blokuje apoptosu zatím není úplně objasněn. NF- κ B je obvykle udržován v inaktivní formě volně

v cytoplasmě. NF- κ B reguluje expresi velkého množství genů zapojených v apoptose, buněčné proliferaci, zánětu, aterosklerose, virové replikaci a v mnoha dalších autoimunitních nemocích (Weerasinghe et al., 2001 a; Malíková et al., 2006; Zdařilová et al., 2006). „Jednou z možností, jak sanguinarin brání aktivaci NF- κ B, by mohla být inhibice fosforylace a degradace I κ B α inhibiční podjednotky NF- κ B“ (Zdařilová et al., 2006).

Mechanismus vlivu sanguinarinu a chelerythrinu na apoptosu zatím není úplně znám. Objasnění jejich působení by přispělo k potenciálnímu terapeutickému použití kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů (Zdařilová et al., 2006).

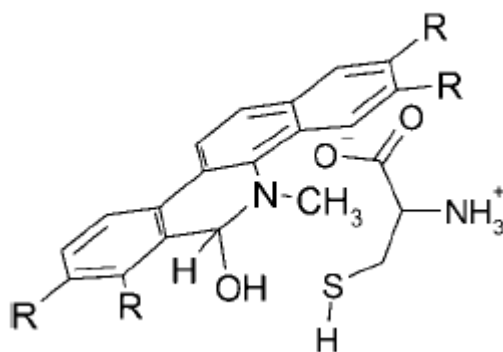
4.2. Interakce kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů s DNA a proteiny

Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy mají schopnost interagovat s proteiny a DNA. Sanguinarin prokázal schopnost vazby k potkanímu tubulinu a inhibici mikrotubulární polymerace. Vykazuje i schopnost interkalace do DNA, kde způsobuje jednořetězcové zlomy (Deroussent et al., 2010). Schopnost interkalace sanguinarinu do DNA je pokládána za důvod jeho mutagenity. Vedle sanguinarinu se má vázat do DNA i chelerythrin, a to lépe než sanguinarin. Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy interagují s DNA především v místech bohatých na GC báze (Slaninová et al., 2008).

Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy jsou svoji strukturou příbuzné fenantridinům, které se nejčastěji používají jako fluorochromy ke značení jádra mechanismem interkalace. Informace uvedené dříve (viz. 3. Sanguinarin a příbuzné látky jako rostlinné produkty) poukazují na to, že chelilutin a sanguilutin do jádra vůbec nepronikají a chelerythrin interkaluje do jaderné DNA jen výjimečně. Jeho fluorescence je slabá a nestálá, zatímco markapin, chelirubin a sanguinarin zobrazují DNA jader velmi dobře. Navíc makarpin působí v mnohem nižších koncentracích než ostatní alkaloidy. Vzhledem ke schopnosti alkaloidů pronikat do živých impermeabilizovaných buněk a schopnosti emitovat světelné záření se mohou alkaloidy využívat jako fluorescenční DNA sondy. Sondy umožňují pozorování struktury jádra a jadérka a rozlišují buňky jaderné od bezjaderných. Některé sondy jsou schopny se na DNA vázat stechiometricky, a tím rozliší množství DNA v jednotlivých buňkách a fázi buněčného cyklu, ve které se buňka právě

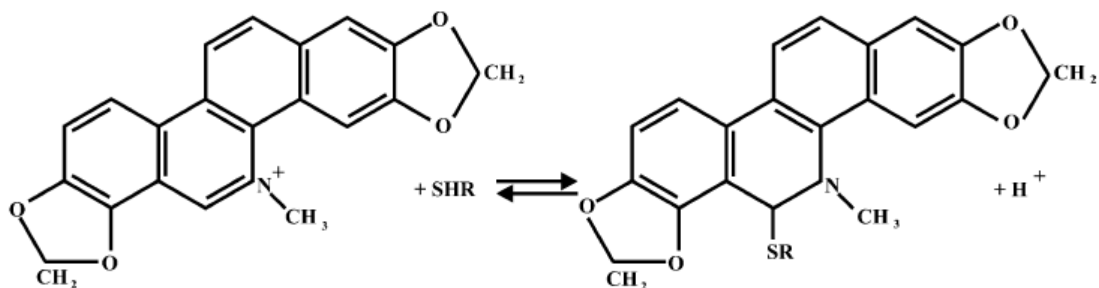
nachází. Těchto sond se značně využívá ke studu proliferační aktivity dané populace buněk (Slaninová et al., 2008).

Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy reagují s jednoduchými látkami obsahujícími SH-skupinu vratnou interakcí (Obr. 10, převzato z Barták et al., 2003) (Barták et al., 2003; Zdařilová et al., 2006). Při interakci alkaloidu s cysteinem nebo merkapt ethanolom vzniká kineticky poměrně nestabilní komplex. Předpokládá se, že alkaloid a jednoduchá merkaptosloučenina reagují v poměru 1:1. Stabilita vazby je ovlivněna molekulovou hmotností a složitostí ligandu obsahujícího merkapto skupinu. S jednoduchými sloučeninami obsahujícími merkapto skupinu interagují pravděpodobně jen alkaloidy ve formě 6-hydroxydihydroderivátu (pseudobase) (Barták et al., 2003; Vespalec et al., 2003)



Obr. 10 Interakce kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů s cysteinem (převzato z Barták et al., 2003)

K rozdílnému vazebnému produktu dochází při reakci alkaloidů se složitými merkaptosloučeninami. V reakci vystupuje alkaloid ve formě kvartérního kationtu a výsledkem reakce je kovalentní produkt (Obr. 11, str. 19, převzato z Belyaeva et al., 2003) (Belyaeva et al., 2003; Vespalec et al., 2003).



Obr. 11 Vznik kovalentního produktu při reakci sanguinarinu s merkapto sloučeninou (převzato z Belyaeva et al., 2003)

Alkaloidy díky reakci s merkaptosloučeninami ovlivňují funkce řady proteinů a enzymů. Například díky blokaci merkapto skupiny inhibují funkci Na^+/K^+ ATPasy, Ca^{2+} ATPasy nebo proteinkinasy C (Belyaeva et al., 2003).

4.3. Antihypertenzní účinky kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů

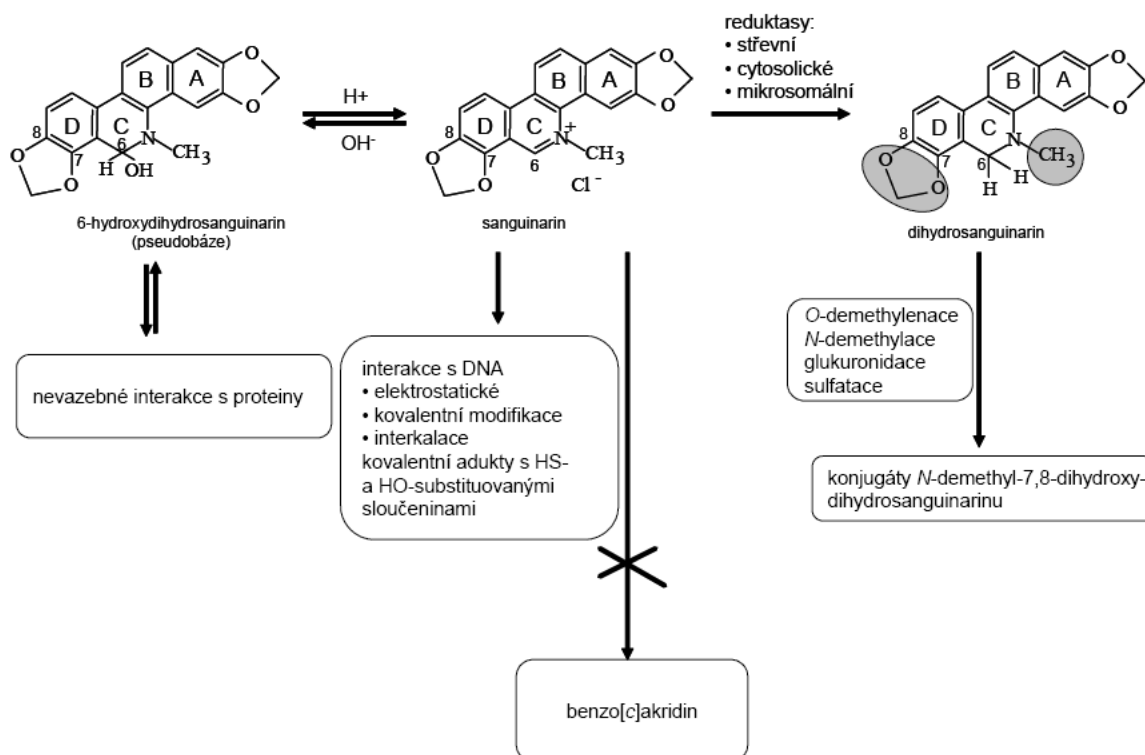
Sanguinarin může ovlivnit propustnost membrán, rozrušovat mikrotubulární shluky a způsobovat dilataci kapilár (García et al., 2006; Mackraj et al., 2008). Provedená studia *in vitro* ukázala, že sanguinarin může mít sklon k ovlivnění různých buněčných a molekulových cílů, které mají přímý dopad na kardiovaskulární systém. Mikromolární množství sanguinarinu by mohlo inhibovat například adrenergní receptory, které hrají stěžejní roli v kardiovaskulární funkci. Jedním z nejdůležitějších regulátorů krevního tlaku je renin-angiotensinový systém (RAS). Jeho účinky jsou zprostředkovány přes dva receptory, a to AT_1 a AT_2 . U hlodavců se AT_1 ještě dělí na dva receptory, AT_{1A} a AT_{1B} . Receptor AT_1 hraje klíčovou roli ve zpětném vstřebávání sodíku, ve vazokonstrikci a v uvolnění aldosteronu, a tím má dopad na regulaci krevního tlaku. Použitím vysoce specifického a selektivního antagonisty byla zkoumána vazba sanguinarinu a chelerythrinu na receptor AT_1 . Bylo zjištěno, že tyto alkaloidy působí na uvedený receptor téměř nevratnou nekompetitivní inhibicí. V experimentu *in vivo*, provedeném na hypertenzních potkanech, sanguinarin a chelerythrin snižovaly úroveň aldosteronu, zvyšovaly vylučování moči a

sodíku a snižovaly renální genovou expresi receptoru AT_{1A}. Z těchto zjištění vyplývá, že schopnost sanguinarinu blokovat receptor AT₁ podává logický výklad pro užívání extraktu z kořenů rostlin obsahujících kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy v tradiční medicíně proti vysokému krevnímu tlaku (Mackraj et al., 2008).

5. Metabolismus kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů

Osud kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů v savčím těle zatím není úplně znám. Jestliže je sanguinarin vpraven do živého organismu, může být absorbován, distribuován, zadržen a/nebo metabolizován buď jako kvartérní kation nebo jako pseudobase (Psotová et al., 2006 a). Hodně studií uvádělo, že jediným metabolitem kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů je benzo[c]akridin. Byla to však chybná informace, která zřejmě vyplynula z faktu, že dříve byly používány méně specifické a citlivé techniky než ty, které se používají v současné době (Malíková et al., 2006; Zdařilová et al., 2006; Mackraj et al., 2008). Tvorbu benzo[c]akridin vyvrátili Psotová et al. (2006 a) ve své práci, ve které analyzovali vzorky jater a plazmy potkanů na obsah metabolitů sanguinarinu, kterým podali jednu perorální dávku sanguinarinu. Naopak, Psotová et al. (2006 a) uvádí jako první krok transformace sanguinarinu přeměnu na méně toxický dihydrosanguinarin (Psotová et al., 2006 a; Zdařilová et al., 2006; Vrba et al., 2009). V jiné studii po orálním podání alkaloidů bylo zjištěno, že asi 98% z celkového množství stanovovaných alkaloidů bylo vylučováno výkaly a jen malý podíl byl absorbován (Kosina et al., 2004; Zdařilová et al., 2006). Pokud šlo o jednorázové intraperitoneální podání sanguinarinu, jeho obsah byl stanoven v játrech a plazmě spolu s dihydrosanguinarinem, který se vyskytoval ve vzorcích vždy ve větším množství než sanguinarin. V moči se sanguinarin a dihydrosanguinarin nevyskytovaly (Zdařilová et al., 2006). Doposud bylo zjištěno, že první krok detoxikace sanguinarinu u potkanů začíná v trávicím traktu zejména mikrobiálními reduktasami, přičemž dochází k redukci iminiové vazby sanguinarinu a vzniká dihydrosanguinarin. Ten je pak přeměněn v polární konjugáty (Obr. 12, str. 21, převzato z Zdařilová et al. 2006), které jsou vylučovány močí (Psotová et al. 2006 a; Zdařilová et al., 2006). Oba zmíněné alkaloidy, sanguinarin a dihydrosanguinarin, se úplně vyloučily z plazmy a jater po 24 hodinách (Vrublová et al., 2008).

V důsledku strukturální podobnosti sanguinarinu a jiných alkaloidů s vícecyklickými aromatickými uhlovodíky by mohly kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy působit jako potenciální prokarcinogeny (Deroussent et al., 2010).

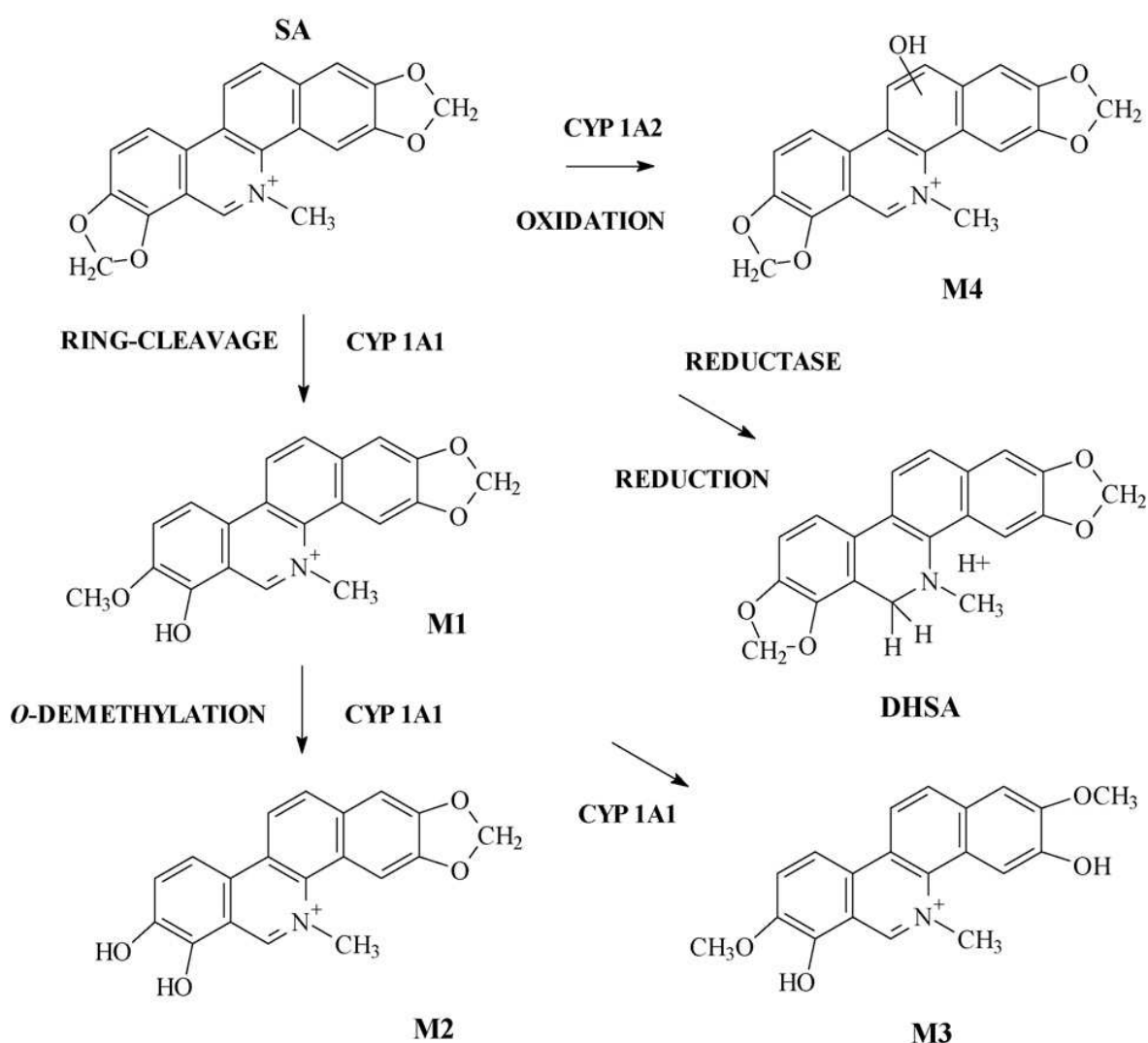


Obr. 12 Přeměna sanguinarinu u živočichů (převzato od Zdařilová et al., 2006)

Nedávné studie *in vitro* a *in vivo* sledující metabolismus sanguinarinu v organismu ukázaly, že do metabolismu sanguinarinu jsou zapojeny cytochromy P450 1A1 (CYP1A1) a P450 1A2 (CYP1A2). Několik studií prokázalo, že sanguinarin má za následek významné snížení jaterního glutathionu a enzymové aktivity CYP. Cytotoxicita sanguinarinu je pravděpodobně způsobená rychlou apoptotickou odpovědí navozenou účinkem vyčerpání glutathionu (Deroussent et al., 2010).

Deroussent et al. (2010) studovali metabolismus sanguinarinu pomocí osmi rekombinantních lidských cytochromů P450 (CYP). Úkolem bylo charakterizovat oxidační

metabolity sanguinarinu a nalézt nejefektivnější cytochromy P450, které tyto reakce katalyzují. Aktivitu vykazoval jen CYP1A1, který generoval až 3 metabolity (M1, M2, M3) a CYP1A2, který vygeneroval jen jeden metabolit hydroxysanguinarin (M4). Metabolity sanguinarinu jsou znázorněny na obr. 13 (Obr. 13 převzato z Deroussent et al., 2010). Metabolit M2 je vytvořen rozštěpením kruhu sanguinarinu s následnou *O*-demethylací. Produkt M4 je oxidován pomocí CYP1A2 v přítomnosti NADPH (Deroussent et al., 2010).



Obr. 13 Navrhovaná oxidační biotransformace sanguinarinu lidskými CYP1A1 a CYP1A2 (převzato z Deroussent et al., 2010)

5.1. Biosyntéza sanguinarinu

Sanguinarin je tvořen z aromatické aminokyseliny tyrosinu. Důležitým meziproduktem syntézy je protopin, který je hydroxylován pomocí enzymů spolupracujících s reduktasou využívající NADPH. Po hydroxylaci protopinu vzniká dihydrosanguinarin. Tato reakce je katalyzována mikrosomálním cytochromem P450. Dihydrosanguinarin je rychle přeměňován na sanguinarin pomocí dosud neidentifikované oxidasy (Psotová et al., 2006 a; Mackraj et al., 2008).

5.2. Metody určení struktury metabolitů kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů

Z hlediska organické chemie se dnes pro určení struktury organických látek nejčastěji využívá nukleární magnetická rezonance (NMR), hmotnostní spektrometrie (MS) a infračervená spektroskopie (IR). Metody méně využívané jsou například Ramanova spektroskopie, röntgenová strukturní analýza, mikrovlnná spektroskopie a další (Böhm & Voltrová, 2005)

Hmotnostní spektrometrie podává informace o sumárním složení a molekulové hmotnosti, infračervenou spektroskopií lze určit funkční skupiny a nukleární magnetická rezonance přináší informace o uhlíkatém skeletu a typu vodíkových vazeb. Kombinací těchto tří metod lze zjistit strukturu i velmi složitých organických sloučenin (Böhm & Voltrová, 2005; McMurry, 2007).

Nukleární magnetická rezonance je v současnosti jednou z nejdůležitějších spektroskopických metod používaných při řešení struktury neznámé organické látky. Jedná se o nedestruktivní metodu, založenou na interakci vzorku s elektromagnetickým zářením. Frekvence elektromagnetického záření spadá do oblasti radiového vlnění. Jádra měřené látky se vkládají do vnějšího magnetického pole, a tím jsou spiny jader orientovány buď ve směru nebo v proti směru magnetického pole. Absorpce energie způsobí, že jádra změní orientaci spinů a přecházejí do vyššího energetického stavu. Absorpce elektromagnetického záření se deteguje, zesílí a zaznamená jako NMR spektrum. NMR spektra lze změřit jen pro látky, které mají lichý počet neutronů nebo protonů, a tudíž mají jádra se spinovým kvantovým číslem $I = \frac{1}{2}$ a mají vlastní magnetický moment. Nejčastější měření NMR

spekter se provádí pro atomy ^1H a ^{13}C , ale je možno měřit i atomy ^{15}N , ^{31}P nebo ^{19}F . Každé jádro s odlišným elektronovým okolím v molekule rezonuje při trochu rozdílné hodnotě indukce magnetického pole, a proto má každé jádro svůj vlastní signál. Signály jsou ve spektru umístěny podle svého chemického posunu. Elektronů vytvářejí vlastní slabé lokální magnetické pole, které stíní jádro proti působení vnějšího pole, a tím je způsoben chemický posun. Chemický posun se uvádí v miliontinách pracovní frekvence, neboli ve stupnici delta (δ). Jako standard se používá tetramethylsilan, kterému je přiřazena hodnota $\delta = 0$ (Böhm & Voltrová, 2005; McMurry, 2007).

Měření NMR spekter se provádí ve skleněné kyvetě umístěné v homogenním magnetickém poli. NMR spektra lze měřit jak v kapalných vzorcích, tak i v pevných látkách. To je však obtížnější a upřednostňuje se měření v kapalně fázi. Rozpouštědlo se volí tak, aby neobsahovalo atomy vodíku, tzn. musí být deuteriované (Böhm & Voltrová, 2005; McMurry, 2007).

6. Metabolismus cizorodých látek

Cizorodé látky (xenobiotika) vniknuvší do organismu podstupují biotransformaci. Cílem biotransformace xenobiotik je přeměna hydrofobní látky na látku polárnější, přičemž vznikající látka může mít toxičtější účinek než látka původní, pak dochází k aktivaci. Nebo je vznikající látka méně toxická, a pak dochází k detoxikaci. Přeměna probíhá ve dvou fázích. První fáze biotransformace je označovaná jako derivatizační, druhá jako konjugační. V první fázi biotransformace dochází ke zvýšení polaritu. Derivatizační fáze zahrnuje především oxidační, redukční nebo hydrolytické reakce. K oxidačním reakcím řadíme hydroxylace, epoxidace, N-oxidace, S-oxidace, deaminace, desulfatace a další (Leblová & Stiborová, 1988; Vodrážka, 1993; Marková, 2003; Levová, 2009).

Při konjugačních reakcích dochází ke konjugaci látek vzniklých při první fázi biotransformace s endogenními látkami jako jsou kyselina glukuronová, glutathion, taurin, glycin, cystein, aktivní sulfát, aktivní acetát atd. (Leblová & Stiborová, 1988; Vodrážka, 1993; Marková, 2003; Levová, 2009).

6.1 Enzymy metabolizující cizorodé látky

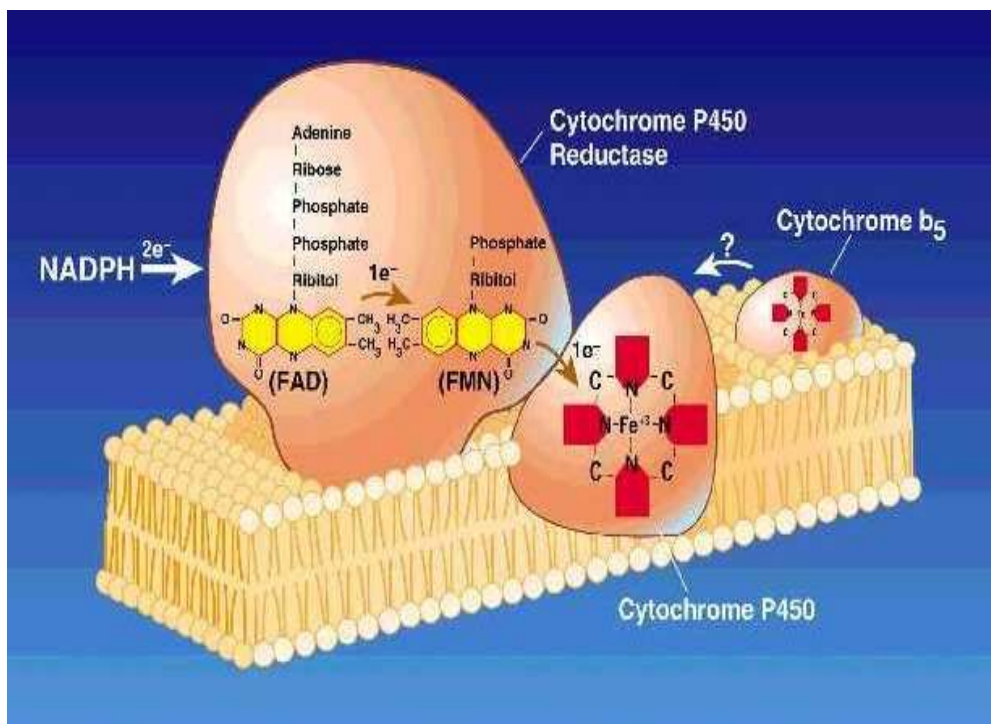
Většina enzymů metabolizujících cizorodé látky se nachází v membráně endoplazmatického retikula (např. mikrosomální monooxygenasový systém). Další biotransformační enzymy jsou lokalizovány v cytoplazmě (např. xanthinoxidasa, DT-diaforasa a některé peroxidasy), v Golgiho aparátu nebo i v extracelulárním prostoru (např. laktoperoxidasa v mléce) (Marková, 2003; Kotrbová, 2005; Mizerovská, 2006; Levová, 2009).

Enzym vyskytující se v cytoplazmě, xanthinoxidasa, katalyzuje oxidační hydroxylaci řady aromatických heterocyklických sloučenin a aldehydů. Xanthinoxidasa patří mezi flavoproteiny, stejně jako DT-diaforasa [NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa]. DT-diaforasa katalyzuje dvouelektronové redukce chinonů a chinoidních sloučenin. Donorem elektronů může být jak NADH tak NADPH (Marková, 2003).

Oxidaci xenobiotik většinou katalyzují nespecifické enzymy, oxygenasy a hydroxylasy. Oxygenasy zavádí do molekuly xenobiotika buď jeden nebo dva atomy kyslíku. Hydroxylasy (monooxygenasy) vnášejí do molekuly cizorodé látky jeden atom kyslíku a druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Deaminaci katalyzují aminooxidasy. Redukční reakce jsou katalyzovány například flavinovými nitroreduktasami, pyrimidinovými dehydrogenasami a/nebo flavoproteinovými azoreduktasami (Leblová & Stiborová, 1988; Vodrážka, 1993; Marková, 2003; Levová, 2009).

6.1.1 Mikrosomální monooxygenasový systém

Mikrosomální monooxygenasový systém (Obr. 14, str. 26, převzato z Kotrbová, 2008) je nejdůležitější systém enzymů katalyzujících řadu oxidačních, oxygenačních nebo redukčních reakcí. Skládá se alespoň ze tří složek, a to z cytochromů P450 (CYP), NADPH:cytochrom P450 reduktasy a membránových lipidů. Fakultativní složkou cytochromů P450 jsou cytochromy b₅ a jeho reduktasa. V lidském těle se nacházejí zejména v endoplazmatickém retikulu buněk jaterních, méně pak v endoplazmatickém retikulu buněk plic, ledvin, tenkého střeva, kůže, mozku nebo nadledvinek, a také se vyskytují v membráně mitochondrií (Marková, 2003; Levová, 2009).

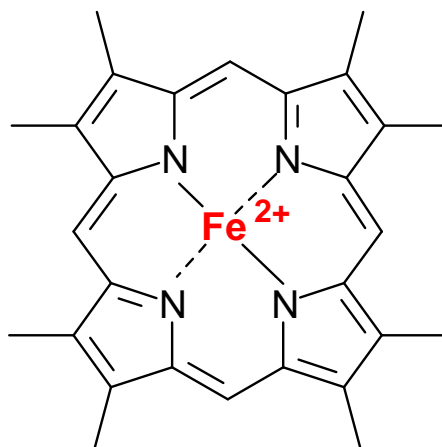


Obr. 14 Uspořádání mikrosomálního monooxygenasového systému v membráně endoplazmatického retikula (převzato z Kotrbová, 2008)

6.1.1.1 Cytochrom P450

Cytochromy P450 (CYP) hrají hlavní roli v metabolismu xenobiotik. Mají širokou substrátovou specifitu. Hydroxylojí například polycyklické aromatické uhlovodíky a nitrosloučeniny, aromatické i alifatické aminy, alifatické uhlovodíky, fenoly a mnoho druhů léčiv. CYP nejčastěji katalyzuje reakci, při které dochází k zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu a druhý atom kyslíku je redukován na vodu (Marková, 2003; Kotrbová, 2005; Mizerovská, 2006; Levová, 2009).

Cytochrom P450 je terminální oxidasa mikrosomálního monooxygenasového systému. Je tvořen z apoproteinu a z porfyrinového skeletu obsahujícího ion železa (hem). Apoprotein je proteinová část, kterou tvoří asi 490-520 aminokyselin. Hem (Obr. 15, str. 27) je vázán k apoproteinové části hydrofobními interakcemi, a také pomocí sulfhydrylové skupiny cysteinu, která se nachází v aktivním centru enzymu. Atom síry molekuly cysteinu je pátým ligandem železa v hemu. Cytochrom P450 je tedy hemothiolátový protein (Marková, 2003; Kotrbová, 2005; Mizerovská, 2006; Levová, 2009).



Obr. 15 Chemická struktura hemu

CYP existuje ve dvou formách označovaných jako nízkospinová a vysokospinová forma (Obr. 16, převzato z Moserová, 2007). Pokud je atom železa v hemu pentakoordinován, má tedy nespárované elektrony (spin $5/2$), jedná se o vysokospinovou formu CYP. Ion železa je tažen nad rovinu porfyrinového kruhu. Nízkospinovou formu tvoří hexakoordinovaný atom železa, který je umístěn v rovině kruhu a jeho valenční elektrony jsou kompletně spárovány (spin $1/2$). Šestáým ligandem železa je atom kyslíku molekuly vody nebo hydroxyskupina, karboxyskupina či aminoskupina postranních řetězců aminokyselin apoproteinu. Obě formy jsou v neaktivním stavu v rovnováze. Teprve když se do vazebného místa enzymu váže substrát, dochází k vytlačení šestého ligandu, a tedy k nárůstu hladiny vysokospinové formy (Kotrbová, 2005; Mizerovská, 2006; Levová, 2009).



Obr. 16 Vysokospinová (a) a nízkospinová (b) forma cytochromu P450 (převzato z Moserová, 2007)

Do současnosti bylo popsáno velké množství různých typů cytochromů P450. Lidské cytochromy P450 jsou rozděleny do 18 rodin, z nichž se metabolismu xenobiotik nejvýrazněji účastní rodiny CYP1, CYP2, CYP3 a v menší míře i CYP4 (Mizerovská, 2006).

V rodině cytochromů P450 1A jsou dva nejvýznamnější zástupci, a to CYP1A1 a CYP1A2. CYP1A1 je především extrahepatální. Vyskytuje se zejména v plicích, ledvinách, kůži, GIT, placentě a lymfocytech. Substrátem CYP1A1 jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, benzo-[a]-pyren, aminopyrin, tamoxifen, tabákově specifický nitrosamin [4]-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon, 7-ethoxykumarin a aflatoxiny. CYP1A1, stejně jako CYP1A2, je indukován β -naftoflavonem, fenothiazinem, benzo-[a]-pyrenem, 2-acetaminofluorem a dalšími látkami. CYP1A2 se vyskytuje převážně v játrech, v menší míře je zastoupen v plicích. Enzym metabolizuje tamoxifen, fenacetin, theofylin, antipyrin, kofein a aromatické a heterocyklické aminy vznikající při vysokoteplotní úpravě masa (Marková, 2003; Kotrbová, 2005; Mizerovská, 2006).

Z rodiny cytochromů P450 2B je v lidském organismu zastoupen hlavně CYP2B6, který se nachází především v játrech a plicích. U potkanů jsou zastoupeny formy cytochromů P450 2B1 a 2B2. Substrátem enzymu jsou nikotin, 7-ethoxykumarin, aflatoxiny, cyklofosfamid. Enzym je indukován barbituráty (fenobarbital) a dexamethazonem (Marková, 2003; Kotrbová, 2005; Mizerovská, 2006).

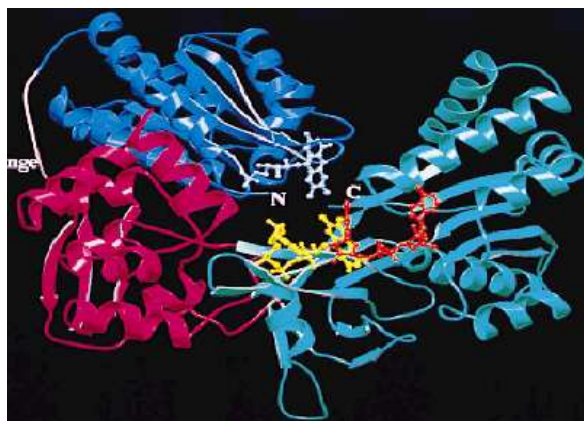


Obr. 17 Lidský CYP 3A4 (převzato z www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_10/Page5.htm, staženo 26.5.2010)

Izoforma cytochromu P450 3A4 (Obr. 17, str. 28, převzato z www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_10/Page5.htm, staženo 26.5.2010), patřící do rodiny cytochromů P450 3A, hraje u člověka v biotransformaci xenobiotik nejvýznamnější roli. Nejvíce je CYP3A4 zastoupen v játrech, dále pak v plicích a tenkém střevě. CYP3A4 má ze všech izoform cytochromů nejširší substrátovou specifitu. Metabolizuje látky steroidní povahy (kortisol, estradiol, testosteron), menší molekuly léčiv (cyklofosfamid a jiné) a také velkoobjemové substráty (erytromycin, cyklosporiny a další). Enzym indukuje rifampicin, metadon a některé steroidní látky (Marková, 2003; Kotrbová, 2005; Mizerovská, 2006).

6.1.1.2 NADPH:cytochrom P450 reduktasa

NADPH:cytochrom P450 reduktasa je membránově vázaný protein a patří mezi flavoproteiny. Katalyzuje přenos elektronů z NADPH na CYP. NADPH:cytochrom P450 reduktasa může být v systému oxidas se smíšenou funkcí za určité situace nahrazena NADH:cytochrom b₅ reduktasou, pro kterou je donorem elektronů NADH (Kotrbová, 2005; Mizerovská, 2009).



Obr. 18 C-terminální funkční doména NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy: Tmavě modře je zobrazena FMN-vazebná doména, světle modře FAD-vazebná doména, vínově je zobrazena spojovací oblast, bíle FMN, žlutě FAD, červeně NADPH (převzato z Wang, 1997)

NADPH:cytochrom P450 reduktasa sestává ze dvou domén (Obr. 18, str. 29, převzato z Wang, 1997). Z hydrofobní N-terminální domény ukotvené v membráně a z hydrofilní C-terminální katalytické domény. C-terminální doména se skládá ze dvou částí, z FMN- a FAD- vazebné strukturní domény. Struktura, která spojuje obě vazebné strukturní domény zodpovídá za správnou orientaci těchto domén (Kotrbová, 2005; Mizerovská, 2009).

6.1.1.3 Membránové lipidy

Membránové lipidy, hlavně fosfatidylcholin, jsou důležité pro správné fungování mikrosomálního monooxygenasového systému. Specificky interagují s cytochromem P450, a zvyšují tak afinitu cytochromu P450 k substrátu. Tvoří vesikulární útvary usnadňující interakce mezi cytochromem P450 a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou, a tím stimuluje vznik funkčně aktivního komplexu cytochrom P450 - NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa. Také tvoří zásobu substrátů pro cytochrom P450 (Marková, 2003; Kotrbová, 2005; Mizerovská, 2009).

6.2. Enzymy metabolizující kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy

Enzymy metabolizující kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy se dělí na oxidační a redukční. Mezi redukční enzymy patří sanguinarinreduktasa. Sanguinarinreduktasa (NAD(P)H: sanguinarinoxidoreduktasa) je rozpustný enzym získaný z rostliny *Eschscholzia californica*. Katalyzuje NAD(P)H-dependentní redukci kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů, přednostně sanguinarinu, na méně toxické odpovídající dihydroalkaloidy (Weiss et al., 2006; Vogel et al., 2010). Sanguinarinreduktasa sdílí vysokou strukturní podobnost s enzymy lidského a bakteriálního původu (NADH-dependentní epimerasa/dehydratasa mikroorganismu *Bacillus halodurans*, lidský biliverdin IX β reduktasa a lidský 17 β hydroxysteroid dehydrogenasa), které mají podobné funkce jako rostlinný homolog, ale mají nízkou podobnost v sekvenci aminokyselin (Vogel et al., 2010).

Cytochrom P450 katalyzuje v metabolismu kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů reakce oxidační. Nejvýznamnějším enzymem metabolizujícím kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy v savčím těle se zatím zdá být CYP1A1. Jeho pomocí může být sanguinarin *O*-demethylován. V menší míře se metabolismu kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů účastní i CYP1A2. Oxidační metabolická cesta sanguinarinu pomocí CYP1A2 resultuje ve tvorbu hydroxy-derivátu sanguinarinu s dosud neurčenou polohou hydroxylace (Obr. 13, str. 22, převzato z Deroussent et al., 2010) CYP1A2 je pravděpodobně schopen zmírňovat toxicitu sanguinarinu (Deroussent et al., 2010).

7. Závěr

Cílem předkládané bakalářské práce bylo shrnout dosavadní poznatky o sanguinarinu a dalších kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidech a poukázat na méně prozkoumané oblasti. Ze získaných informací z literárních zdrojů vyplývá následující:

Za nejvýznamnější zdroj kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů je považována rostlina *Sanguinaria canadensis* L. z čeledi *Papaveraceae*, ale nejvyužívanější rostlinou v tradiční čínské medicíně je *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.

Kvartérní benzo[c]fenantridinové (benzo[c]fenanthrenové) alkaloidy patří do skupiny isochinolinových alkaloidů. Tetracyklický skelet je základem kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů. Jednotlivé struktury alkaloidů se liší různými substituenty.

Alkaloidy se vyskytují buď ve formě kvartérního kationtu nebo ve formě 6-hydroxydihydroderivátu (pseudobase), což závisí na pH prostředí. Přes plazmatickou membránu má schopnost prostupovat pouze pseudobase. Za fyziologického pH jsou v cytoplazmě kvartérní kation a pseudobase v rovnováze.

Z hlediska cytotoxicity je za nejtoxičtější alkaloid považován sanguinarin. Všeobecně jsou dihydroderiváty alkaloidů méně toxické než kvartérní kationty.

Sanguinarin a chelerythrin ovlivňují signální cesty vedoucí k „naprogramované“ buněčné smrti.. Sanguinarin aktivuje proapoptotický protein Bax a inhibuje antiapoptotický protein Bcl-2 a jaderný transkripční faktor NF- κ B. Doposud nebyl prozkoumán celý mechanismus působení sanguinarinu a chelerythrinu na apoptosu. Vzhledem k této skutečnosti jsou sanguinarin a chelerythrin stále zkoumány jako potenciální agens pro léčbu rakoviny. Do budoucna by bylo vhodné objasnit mechanismus inhibice apoptosy prostřednictvím NF- κ B.

Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy interagují s proteiny a s DNA. Příčinou mutagenity alkaloidů je zřejmě schopnost interkalace do DNA. Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy lze využívat jako fluorescenční DNA sondy k určování buněčné proliferace nebo ke stanovení fáze buněčného cyklu, ve které se buňka právě nachází. Jadernou DNA nejefektivněji zobrazoval makarpin. Interakce alkaloidů s merkaptosloučeninami vede k inhibici funkce řady proteinů a enzymů.

Nejméně informací je známo o metabolismu alkaloidů v savčím těle. Tvorba karcinogenního benzo[c]akridinu jako metabolitu kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů byla vyloučena. Prvním krokem detoxikace sanguinarinu je přeměna na méně toxický dihydrosanguinarin. Do oxidačního metabolismu sanguinarinu nejvýznamněji zasahuje cytochrom P450 1A1. Informace o enzymech oxidujících i redukujících sanguinarin jsou však nedostatečné. Neúplné informace o dalších metabolických cestách studovaných alkaloidů jsou výzvou pro další výzkum. Například by bylo potřebné se zaměřit na určení struktury polárních konjugátů vznikajících při druhé fázi biotransformace.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Barták P., Šimánek V., Vlčková M., Ulrichová J., Vespapec R.: *Interaction of sanguinarine and chelerythrine with molecules containing a mercapto group*. J. Phys. Org. Chem. 16 (2003) 803–810
- Belyaeva T., Leontieva E., Shpakov A., Mozhenok T., Faddejewa M.: *Sensitivity of lysosomal enzymes to the plant alkaloid sanguinarine: comparison with other SH-specific agents*. Cell Biol. Int. 27 (2003) 887–895
- Böhm S., Voltrová S.: *Strukturní analýza organických sloučenin*. VŠCHT v Praze. (2005)
- Deroussent A., Ré M., Hoellinger H., Cresteil T.: *Metabolism of sanguinarine in human and in rat: Characterization of oxidative metabolites produced by human CYP1A1 and CYP1A2 and rat liver microsomes using liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. J. Pharm. Biomed. Anal. 52 (2010) 391–397
- Dostál J. & Slavík J.: *Novější poznatky o sanguinarinu a příbuzných alkaloidech*. Chem. Listy 94 (2000) 15–20
- Dvořák Z., Zdařilová A., Šperlíková L., Anzenbacherová E., Šimánek V., Ulrichová J.: *Cytotoxicity of sanguinarine in primary rat hepatocytes is attenuated by dioxin and phenobarbital*. Toxicol. Lett. 165 (2006) 282–288
- García V. P., Valdés F., Martín R., Luis J. C., Afonso A. M., Ayala J. H.: *Biosynthesis of Antitumoral and Bactericidal Sanguinarine*. J. Biomed. Biotechnol. 10 (2006) 1–6
- Hu C.M., Cheng H. W., Cheng Y. W., Kang J. J.: *Mechanism underlying the induction of vasorelaxation in rat thoracic aorta by sanguinarine*. Jpn. J. Pharmacol. 85 (2001) 47–53
- Jeng B. C., Park J. G., Song D. K., Baek W. K., Yoo S. K., Jung K. H., Park G. Y., Lee T. Y., Suh S. I.: *Sanguinarine induces apoptosis in A549 human lung cancer cells Primarily via cellular glutathione depletion*. Toxicol. in Vitro 23 (2009) 281–287
- Jeng J.-H., Wu H.-L., Lin B.-R., Lan W.-H., Chang H.-H., Ho Y.-S., Lee P.-H., Wang Y.-J., Wang J.-S., Chen Y.-J., Mei-Chi Chang M.-C.: *Antiplatelet effect of Sanguinarine is correlated to calcium mobilization, thromboxane and cAMP production*. Atherosclerosis 191 (2007) 250–258
- Kosina P., Walterová D., Ulrichová J., Lichnovský V., Stiborová M., Rýdlová H., Vičar J., Krečman V., Brabec M. J., Šimánek V.: *Sanguinarine and chelerythrine:*

- assessment of safety on pigs in ninety days feeding experiment.* Food Chem. Toxicol. 42 (2004) 85–91
- Kotrbová V.: *Identifikace mikrosomálních cytochromů P450 jater potkana a králíka oxidující ellipticin.* Diplomová práce PŘF UK Praha, Katedra biochemie (2005) 22-33
- Kotrbová V.: *Studium aktivačního a detoxikačního metabolismu protinádorového léčiva ellipticinu systémem cytochrom P450 in vitro a in vivo.* Doktorská disertační práce. PŘF UK Praha, Katedra biochemie (2008)
- Leblová S., Stiborová M.: *Biochemie pro posluchače oboru ochrana přírodního prostředí.* skriptum PŘF UK Praha (1988) 177-181
- Levová K.: *Metabolická detoxikace karcinogenních aristolochových kyselin cytochromy P450.* Diplomová práce PŘF UK Praha, Katedra biochemie (2009) 12-14
- Mackraj I., Govender T., Gathiram P.: *Sanguinarine.* Cardiovasc. Ther. 26 (2008) 75–83
- Malíková J., Zdařilová A., Hlobilková A.: *Effect of sanguinarine and chelerythrine on the cell cycle and apoptosis.* Boimed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. 152 (2006) 5-12
- Marková V.: *Studium vlivu aristolochových kyselin a Sudanu I na enzymy biotransformující xenobiotika v organismu potkana.* Diplomová práce PŘF UK Praha, Katedra biochemie (2003) 14-22
- McMurry J.: *Organická chemie.* Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VITIUM, Brno (2007)
- Mizerovská J.: *Studium metabolismu 3-aminobenzathronu, redukčního metabolitu karcinogenního 3-nitrobenzathronu.* Diplomová práce PŘF UK Praha (2006) 17-29
- Moserová M.: *Studium molekulárního mechanismu protinádorového léčiva ellipticinu.* Diplomová práce. PŘF UK Praha, Katedra biochemie (2007)
- Philchenkov A., Kaminsky V., Zavelevich M., Stoika R.: *Apoptogenic activity of two Benzophenanthridine alkaloids from Chelidonium majus L. does not correlate with their DNA damaging effects.* Toxicol. in Vitro 22 (2008) 287–295
- Psotová J., Klejdus B., Večeřa R., Kosina P., Kubáň V., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: *A liquid chromatographic–mass spectrometric evidence of dihydrosanguinarine as a first metabolite of sanguinarine transformation in rat.* J. Chromatogr. B 830 (2006) 165–172
- Psotová J., Večeřa R., Zdařilová A., Anzenbacherová E., Kosina P., Svobodová A., Hrbáč

- J., Jirovský D., Stiborová M., Lichnovský V., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: *Safety assessment of sanguiritrin, alkaloid fraction of *Macleaya cordata*, in rats.* Vet. Med. 51(4) (2006) 145-155
- Slaninová I., Slanina J., Táborská E.: *Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů a jejich využití jako supravitálních DNA sond.* Chem. Listy 102 (2008) 427-433
- Stiborová M., Vostalová J., Zdařilová A., Ulrichová J., Hudeček J., Tschirner K., Šimánek V.: *Macleaya cordata extrakt and Sangrovit® genotoxicity assesement in vivo.* Boimed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. 152 (2008) 35-39
- Suchomelová J., Bochořáková H., Paulová H., Musil P., Táborská E.: *HPLC quantification of seven quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids in six species of the family Papaveraceae.* J. Pharm. Biomed. Anal. 44 (2007) 283–287
- Ševčík J., Vičar J., Ulrichová J., Válka I., Lemr K., Šimánek V.: *Capillary electrophoretic determination of sanguinarine and chelerythrine in plant extracts and pharmaceutical preparations.* J. Chromatogr. A 866 (2000) 293–298
- Vespalec R., Barták P., Šimánek V., Vlčková M.: *Electrophoretic investigation of interactions of sanguinarine and chelerythrine with molecules containing mercapto group.* J. Chromatogr. B 797 (2003) 357-366
- Vodrážka Z.: *Biochemie, 3. díl.* Nakladatelství Akademie věd České republiky, VITIUM, Praha 1993,
- Vogel M., Lawson M., Sippl W., Conrad U., Roos W.: *Sanguinarine reductase – structure and mechanism of an enzyme of alkaloid detoxicaion.* Biochem. Mol. Biol., in press (2010)
- Vrba J., Doležel P., Vičar J., Ulrichová J.: *Cytotoxic activity of sanguinarine and dihydrosanguinarine in human promyelocytic leukemia HL-60 cells.* Toxicol. in vitro 23 (2009) 580-588
- Vrublová E., Vostalová J., Večeřa R., Klejdus B., Stejskal D., Kosina P., Zdařilová A., Svobodová A., Lichnovský V., Anzenbacher P., Dvořák Z., Vicar J., Šimánek V., Ulrichová J.: *The toxicity and pharmacokinetics of dihydrosanguinarine in rat: A pilot study.* Food Chem. Toxicol. 46 (2008) 2546-2553
- Wang M., Roberts D.L., Paschke R., Shea T.M., Masters B.S.S., Kim J.-J.: *Three-Dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD- containing enzymes.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (1997) 8411-8416

- Weerasinghe P., Hallock S., Liepins A.: *Bax, Bcl-2, and NF- κ B expression in sanguinarine induced bimodal cell death*. *Exp. Mol. Pathol.* 71 (2001) 89–98
- Weerasinghe P., Hallock S., Tang S.-C., Liepins A.: *Role of Bcl-2 family proteins and caspase-3 in sanguinarine-induced bimodal cell death*. *Cell Biol. Toxicol.* 17 (2001) 371-381
- Weiss D., Baumert A., Vogel M., Roos W.: *Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification*. *Plant, Cell Environ.* 29 (2006) 291–302
www.botaniliberec.cz/foto/detail/?f=173, staženo 21.3.2010
www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_10/Page5.htm, staženo 26.5.2010
www.rostliny.net/roslina/Macleaya_Cordata, staženo 21.3.2010
www.vilcakul.estranky.cz/fotoalbum/lecive-rostliny/lecive-rostliny/26, staženo 21.3.2010
- Zdařilová A., Malíková J., Dvořák Z., Ulrichová J., Šimánek V.: *Kvartérní isochinolinové alkaloidy sanguinarin a chelerythrin. Účinky in vitro a in vivo*. *Chem. Listy* 100 (2006) 30-41

