

UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

FLAVONOIDY A KARCINOGENEZE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Jana Osecká

HRADEC KRÁLOVÉ 2009

VEDOUCÍ PRÁCE: Doc. RNDr. Lenka Skálová, Ph. D.

Poděkování:

Ráda bych poděkovala paní Doc.RNDr. Lence Skálové, Ph.D., za odborné vedení práce, mnoho podnětů a cenných rad a za pomoc při vyhledávání a zpracovávání potřebné literatury.

Prohlašuji, že předkládaná bakalářská práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové dne
4.5.2009

.....

JANA OSECKÁ

1	ÚVOD:	4
2	CÍL PRÁCE	4
3	FLAVONOIDY	5
3.1	ZÁKLADNÍ DĚLENÍ A STRUKTURY	5
3.2	METABOLISMUS FLAVONOIDŮ	8
3.3	BIOLOGICKÁ AKTIVITA FLAVONOIDŮ	9
4	KARCINOGENEZE	10
5	VLIV FLAVONOIDŮ NA KARCINOGENEZI	11
5.1	MODULACE ENZYMOVÉ AKTIVITY	11
5.1.1	<i>Význam cytochromů P450</i>	11
5.1.2	<i>Zásah cytochromů P450 do procesu karcinogeneze</i>	12
5.1.3	<i>Flavonoidy a cytochromy P 450</i>	13
5.2	ANTIOXIDAČNÍ ÚČINKY	14
5.2.1	<i>Oxidační stres</i>	14
5.2.2	<i>Flavonoidy jako antioxidanty a prooxidanty</i>	15
5.3	ZÁSTAVA BUNĚČNÉHO CYKLU A NAVOZENÍ A POPTÓZY	19
5.4	ANTIPROLIFERATIVNÍ ČINNOST	20
5.5	ESTROGENNÍ AKTIVITA	21
6	FLAVONY	22
6.1	APIGENIN	22
6.1.1	<i>APIGENIN A JEHO VLIV NA HEPATOCELULÁRNÍ KARCINOM</i>	23
6.1.1.1	<i>Inhibiční efekt apigeninu na buněčnou proliferaci buněk jaterního karcinomu</i>	23
6.1.1.2	<i>Apigenin a zástava buněčného cyklu</i>	25
6.1.1.3	<i>Apigenin a exprese proteinu p53 a p21</i>	25
7	SHRNUTÍ	26
8	ZÁVĚR	28
9	SEZNAM ZKRATEK	29
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	30

1 ÚVOD

Flavonoidy tvoří velmi početnou skupinu přírodních látek, obsažených v různých částech vyšších rostlin, zejména v listech, květech a plodech a dávají jim specifické zbarvení. Jejich přítomnost v rostlinné říši je známa botanikům a rostlinným fyziologům po dobu několika století, objev jejich chemické identity se datuje do prvé poloviny 19. století. Ke znalosti funkce a významu v rostlinném organismu se dospělo mnohem dříve, nežli bylo dosaženo vědeckého poznání jejich farmakologických účinků. Tím začal zajímavý a dramatický vývoj, který dosud nebyl ukončen. V 90. letech minulého století byl zájem o flavonoidy znovu oživen v souvislosti s rozšířením hypotézy oxidačního stresu, oxidačního poškození lidského organismu vedoucího ke vzniku a rozvoji závažných a velmi rozšířených nemocí a anitoxidační ochrany zprostředkované enzymovými systémy, endogenními antioxidačními sloučeninami i exogenními, z potravin získanými antioxidanty. Flavonoidy upoutávají hlavní pozornost při hledání faktorů, které jsou nositeli zdravotně prospěšných účinků ovoce, zeleniny, cereálií, luštěnin a révových vín, zejména v prevenci srdečně cévních, nádorových a neurodegenerativních nemocí. Flavonoidy, zejména ty, které jsou nositeli určitých charakteristických strukturních znaků (flavony, flavonoly, substituované hydroxylovými skupinami), byly mnohokrát aplikovány v pokusech se zvířaty, v klinických studiích a v intervenčních epidemiologických projektech s cílem prověřit jejich předpokládanou biologickou aktivitu a schopnost ovlivňovat příznivě zdravotní stav. Účinky těchto látek na zdraví byly spontánně využívány po staletí ve formě bylinných čajů a jinými praktikami lidového léčitelství. Flavonoidy hrají mezi účinnými látkami přední roli, neboť jsou z přírodních sloučenin nejrozšířenější, nejpočetnější a vyskytují se ve všech rostlinách (internet 1).

2 CÍL PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce, bylo vyhledat dostupné informace o:

- obecném působení flavonoidů v organismu
- metabolismu a biologické aktivitě flavonoidů
- mechanismech působení flavonoidů v procesu karcinogeneze
- působení konkrétního flavonoidu apigeninu v lidském organismu a jeho vlivu na hepatocelulární karcinom.

3 FLAVONOIDY

Flavonoidy tvoří širokou skupinu polyfenolických sloučenin, vyskytujících se v rostlinách jako sekundární metabolita (Ren W. et al., 2003). V současné době je známo asi 5000 různých flavonoidů. Původně do této skupiny byly zařazovány molekuly, které obsahovaly flavonovou konfiguraci 2-fenyl-chromon, nyní se však do této skupiny zahrnují látky rostlinného původu, obsahující větší počet fenolových jader označujících se jako polyfenoly (PF) (internet 2). Etiologie slova pochází z latinského slova flavus, což znamená žlutý (internet 13). Přírodní flavonoidy mají nejčastěji podobu o - glykosidů, jejich molekula má cukernou a necukernou část – aglykon (internet 3). Flavonoidy patří do skupiny fenolických látek společně s fenolickými kyselinami, stilbeny a lignany (Internet 4). Tvoří strukturně rozmanitou skupinu látek, které mají různé příznivé účinky na organismus. Byla u nich zjištěna protirakovinná, antibakteriální, antivirová aktivita, také protizánětlivý, anti-angionický, protialergický, hepatoprotektivní účinek a cytostatické, apoptické, estrogení a anti-estrogení vlastnosti. Některé flavonoidy naopak mají ale také i mutagenní nebo-li prooxidační účinky (Hodek et al.2002). Flavonoidy jsou převážně látky s velkým antioxidačním účinkem přítomné v potravě. Nachází se hojně v ovoci, zelenině, v červeném víně a zeleném čaji (Kondrová E. et al., 2006). Jejich hodnota v denním příjmu je zaznamenána ve vědecké literatuře různě od 1-1000 mg/den a jsou syntetizované z cinnamoyl-CoA (Dewick 2002, převzato z Boušová I., 2006). Jsou produkovány ve velkém množství různými rostlinami, u kterých všeobecně existují jako glykosylované a sulfátové deriváty (Hodek et al., 2002). Jejich funkce v rostlinách spočívá v regulaci vlivu železa při fosforylačních procesech a mají také insekticidní účinek. Chrání rostlinné buňky proti škodlivému vlivu volných kyslíkových radikálů, chrání snadno oxidovatelné složky biologických systémů, například kyselinu askorbovou, před oxidací a působí protektivně při účinku UV záření a účastní se procesu fotosyntézy (Internet 2). U lidí vytvářejí s ionty vápenatými komplexní soli a brání tím srážení krve a zadržují vápník v těle. Také potencují účinek vitamínu C a mají zásadní roli v prevenci degenerativních chorob jako je rakovina a kardiovaskulární choroby (Manach et al., 2004).

3.1 ZÁKLADNÍ DĚLENÍ A STRUKTURY

Flavonoidy zahrnují velkou skupinu fenolických látek, které obsahují ve své

molekule dvě benzenová jádra A a B spojené trojúhelníkovým řetězcem. U většiny flavonoidů je tento řetězec součástí heterocyklu odvozeného od pyranu (C). Jádro B je spojeno heterocyklem v poloze C-2 (katechiny, leukoantokyaniny, flavony, flavanonoly, flavony, flavonoly, antokianiny), v poloze C – 3 (izoflavonoidy) anebo v poloze C – 4 (neoflavonoidy), (internet14).

Jejich struktura je podobná steroidním hormonům a částečně i estrogenům (Zand R. S. R. et al., 2002). Jednotlivé flavonoidy se navzájem liší počtem a polohou hydroxylových skupin na obou aromatických kruzích a napojením cukrů nebo organických kyselin (Hubík J. et al., 1989). Strukturální obměna uvnitř kruhů rozděluje flavonoidy do 6 hlavních skupin. (Atherne et al., 2002; Pietta 2002, převzato z Boušová I., 2006).

6 hlavních skupin přírodních flavonoidů a několik příkladů z každé skupiny:

FLAVONY:

Apigenin, Baicalein, Chrysin, Luteolin,

FLAVONOLY:

Galangin, Kaempferol, Myricetin, , Rutin , Quercetin

FLAVANONY:

Hesperitin, Naringenin, Taxifolin, Eriodictyol

FLAVANOLY:

Catechin, Gallocatechin

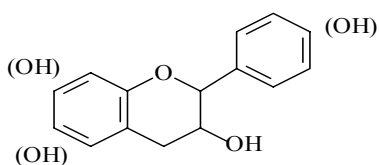
ISOFLAVONY:

Daidzein, Genistein, Glycitein, Formononetin

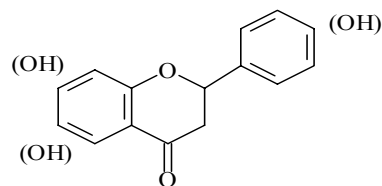
ANTHOCYANIDINY:

Pelargonidin, Cyanidin, Delphinidin

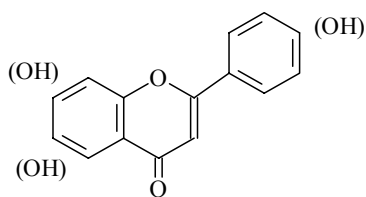
(Birt et al., 2001).



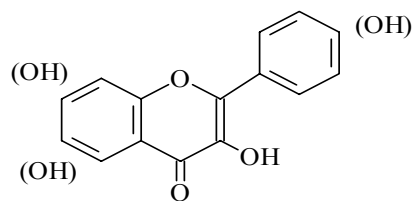
flavanoly



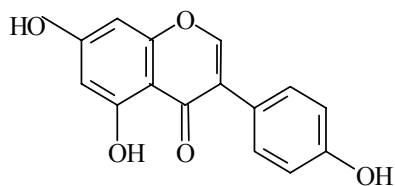
flavanony



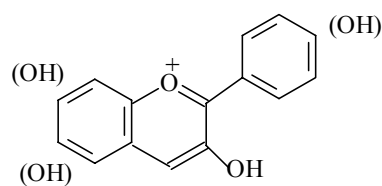
flavony



flavonoly



izoflavony



antokyanidiny

(Birt et al., 2001)

Tabulka: 1

Hlavní zdroje flavonoidů (Internet 2):

Flavony	petržel, tymián
Flavonoly	kapusta, brokolice, jablka, třešně, bobuloviny, čaj, červené víno
Flavanony	citrony
Izoflavony	sójové boby, zelenina
Katechiny	jablka, čaj
Anthokyanidiny	třešně, hroznové víno

Velká část flavonoidů je glykosylována. Navázaný cukr bývá glukosa, rhamnosa, méně často galaktosa, arabinosa, xylosa, glukuronová kyselina a další cukry. Obvykle je navázána jedna cukerná jednotka, ale mohou být i dvě, tři či více. Cukry mohou být dále substituovány např. malonylovou skupinou (Internet 4).

3.2 METABOLISMUS FLAVONOIDŮ

U člověka jsou dvě hlavní místa metabolismu flavonoidů - střeva a játra. Pro pochopení účinku flavonoidů je velmi významné znát mechanismus absorpce. Metabolismus PF probíhá přirozenou cestou, avšak nejvíce PF ve stravě je přítomno ve formě esterů, glykosidů nebo polymerů, které nemohou být absorbovány přirozenou cestou. Tyto látky musejí být proto hydrolyzovány střevními enzymy nebo střevní mikroflórou ještě před jejich absorpcí. Flavonoidy se tedy v tenkém střevě vstřebávají z potravy jak ve formě aglykonu (po odštěpení cukerné složky) tak i bez předchozího štěpení glykosidické vazby (Hodek et al., 2002).

Během absorpce jsou PF konjugovány nejdříve v tenkém střevě a později v játrech. Tento metabolický, detoxikační proces je běžný u xenobiotik a díky němu jsou omezeny jejich toxické účinky a usnadní se jejich vylučování močí a žlučí tím, že zvýší jejich hydrofilitu. Proces zahrnuje 3 hlavní mechanismy: metylaci, sulfataci a glukuronidaci. Po konjugaci se aglykony strávené z nutriční dávky nacházejí v krvi jen v nízkých koncentracích nebo se nenacházejí vůbec (Manach et al., 2004). Absorbované flavonoidy se v krevním oběhu vyskytují ve formě konjugovaných derivátů a vážou se na bílkoviny krevního séra albumin, tvořený v játrech (Hodek et al., 2002). Z krevního oběhu jsou biotransformovány v játrech, kde v první fázi dochází ke vzniku polárních molekul s větším počtem hydroxylových skupin. Metabolity a konjugáty flavonoidů jsou vylučovány žlučí do duodena, kde jsou vystaveny účinku bakteriálních enzymů, zvláště β -glukuronidasy, v distálních částech. Z něho se část vstřebává opět do organismu a zahájí se enterohepatální cyklus (Manach et al., 2004).

Střevní mikroflóra flavonoidy přeměňuje na fenolické kyseliny. Metabolismus bioflavonoidů ve střevě je zahájen štěpením heterocyklického jádra přes laktony a kyselinu propionovou až na CO_2 a H_2O . Účinnost flavonoidů je velmi závislá na jejich biologické dostupnosti (Hodek et al. 2002). PF jsou schopny prostupovat tkáněmi, zvláště těmi, ve kterých jsou samy metabolizovány (Manach et al., 2004).

Prakticky všechny PF, které se dostávají do oběhu jsou glukuronidovány nebo sulfatovány. V plazmě se tedy nenacházejí žádné volné aglykony s výjimkou zvláštních flavonoidů jako je floretin, který byl v plazmě potkana nalezen v obou formách – konjugovaný i nekonjugovaný. Konjugace s glukuronovou a sulfátovou skupinou vysvětluje jejich rychlé vylučování z těla (Scalbert A. et al., 2002).

Ukázalo se, že sulfátové estery a glukuronidy udržují část jejich antioxidačních

vlastností a zároveň zdržují oxidaci lipoproteinů o nízké hustotě (Scalbert A. et al., 2002).

Flavonoidové glykosidy jako rutin nejsou absorbovány v horní části střevního traktu, jsou hydrolysovány mikroflórou a aglykon se dále absorbuje (Scalbert A., et al., 2002). Flavonoidový glukuronid je vylučován žlučí, může být hydrolyzován mikroflórou a výsledný aglykon je reabsorbován a tak vstupuje do enterohepatálního cyklu (Scalbert et al., 2002).

3.3 BIOLOGICKÁ AKTIVITA FLAVONOIDŮ

V roce 1930 získal Albert Szent-Gyorgyi Nobelovu cenu za objevení antioxidační aktivity flavonoidů. Flavonoidy vykazují velmi rozmanité biologické účinky. Jejich schopnost deaktivovat OH radikály, peroxidový aniont a peroxidy lipidů, ukazují na jejich zdraví prospěšný účinek v organismu, který je důležitý pro prevenci chorob spojených s oxidačním poškozením membránových proteinů a DNA. Při těchto reakcích flavonoidy poskytují vodík a samy se přitom většinou přeměňují na málo reaktivní fenoxylový radikál (F1-O) nebo neradikálové chinoidní struktury (Internet 4). Mají schopnost redukovat výskyt srdečních a jaterních chorob a také rakovinu. Vykazují antioxidační, antihypertenzní účinek a některé jsou schopné chelatace bivalentních kovů Fe, Cu a tím projevovat inhibiční schopnost proti nežádoucím procesům (Hodek et al., 2002).

Kromě toho mají vysoce specifický účinek na významné regulační enzymy a váží se na určité receptory v organismech (Hodek et al., 2002).

Některé flavonoidy jsou silné inhibitory enzymů biosyntézy prostaglandinů a to lipoxygenasy, fosfolipasy a cyklooxygenasy. Mimo to inhibují fosfodiesterasu účastníci se specifické aktivace buněk, zodpovědné za zprostředkování adheze leukocytů na stranu poškození (Hodek et al. 2002).

Proteinkinasy jsou další třída enzymů, které jsou ovlivněny flavonoidy. Flavonoidy inhibují tyto enzymy soutěžící s ATP o vazbu na katalyzátor. Tento způsob inhibice poskytuje vysvětlení protizánětlivého účinku flavonoidů na molekulárním základě. Flavonoidy mohou rovněž dramaticky ovlivňovat plazmové koncentrace farmaceutických léků, mohou způsobit nadměrné zvýšení léčebného účinku nebo jeho ztrátu (Hodek et al., 2002).

4 KARCINOGENEZE

Karcinogeneze je postupný, dlouhodobý mnohastupňový proces, při kterém dochází ke kumulaci mutací určitých genů, které následně vedou k poruše proteinů, které jsou jimi kódovány. Tyto proteiny se podílejí převážně na regulaci dělení a diferenciaci buněk. Nejzávažnější jsou poruchy genů pro proteiny podílející se hlavně na přenosu signálu a správnosti replikace DNA. Vzniklé poškození v určitých genech může následně vést k maligní transformaci buněk (Internet 5). K maligní transformaci buňky dojde však pouze tehdy, nastane-li současně s genetickými poruchami v protoonkogenech, genetická porucha antionkogenů (Krejsek J., Kopecký O., 2004) Je-li porucha genů vrozená, karcinogeneze může být významně urychlena (Internet 5). Protoonkogeny jsou geny, které kódují proteiny podílející se na přenosu růstových a diferenciacních signálů z povrchu buňky do cytoplazmy a jádra. Některé základní mechanismy se podílejí na přeměně těchto protoonkogenů na abnormální onkogeny, jejichž produkty (př: abnormální receptory pro růstové faktory) se účastní maligní transformace buňky. Přítomnost samotných protoonkogenů nepůsobí nádorovou transformaci (Krejsek J., Kopecký O., 2004).

Tumor suprimující geny - antionkogeny: jsou geny, které pokud jsou blokovány nebo inaktivovány nebo dojde k jejich ztrátě, mají za následek buněčnou transformaci. Jejich produkty jsou bílkoviny podílející se na kontrole buněčného růstu a diferenciaci buňky. Proto ztráta jejich funkce je odpovědná za nádorové bujení. Nejvýznamnějším zástupcem je antionkogen, transkripční faktor p53. Funkce tohoto proteinu je především kontrola normálního průběhu buněčného cyklu regulací transkripce a replikace DNA. Protein p53 se nachází v jádře a váže se na specifické sekvence DNA. Poškození DNA vede k akumulaci proteinu p53, který je schopen rozpoznat poškozenou část genomu a je schopen katalyzovat renaturaci DNA. Pokud se odhalí závažné změny, zvýší se jeho exprese a uplatní se jeho funkce transkripčního faktoru a v buňce jsou pak zvýšené hladiny jím produkováných transkriptů- proteinu p21, což je blokátor cyklin dependentní kinázy, která funguje jako hlavní regulátor buněčného cyklu, tak že fosforyluje bílkoviny přenosem fosfátové skupiny z ATP. Protein p53 působí tedy jako transaktivátor genů nesoucí specifické vazebné sekvence. Stimulovaná exprese genů pak buď zastavuje buněčný cyklus v pozdní fázi G1 buněčného cyklu nebo stimuluje apoptózu buňky. Abnormální gen pro protein p53 je nalezen u více než poloviny případů lidských nádorů. Tento gen je umístěn na 17 chromosomu a je negativním

regulátorem přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu. Protein p21, zastavuje buněčný cyklus tím, že inhibuje cyklin-dependentní kinázy. Prostřednictvím tohoto proteinu je zablokována buňka před vstupem do S fáze. Tím je buňce poskytnut čas na reparaci DNA, pokud je poškození rozsáhlé, pak protein p53 stimuluje apoptózu (Krejsek J., Kopecký O., 2004).

5 VLIV FLAVONOIDŮ NA KARCINOGENEZI

Bylo identifikováno několik mechanismů, kterými flavonoidy mohou zasahovat do procesu karcinogeneze.

Základní obecné flavonoidové mechanismy inhibice rakoviny:

1. Modulace enzymové aktivity
2. Antioxidační účinky
3. Schopnost zástavy buněčného cyklu a navození apoptózy
4. Antiproliferativní činnost
5. Estrogenní a antiestrogenní aktivita

5.1 MODULACE ENZYMOVÉ AKTIVITY

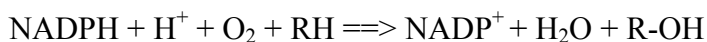
5.1.1 Význam cytochromů P450

Souhrnný název cytochrom P-450 (CYP) v sobě skrývá velkou skupinu enzymů obsahujících hem, které jsou lokalizovány ve vnitřní membráně mitochondrií nebo na membráně endoplazmatického retikula buněk. Nejvyšší koncentrace CYP se nacházejí v játrech a tenkém střevě, ale průkazný je také např. v ledvinách, plicích nebo mozkové tkáni. V lidském genomu se doposud podařilo identifikovat 57 genů pro různé izoformy CYP. Nomenklatura CYP byla ustanovena hierarchicky a je členěna na "rodiny" a podrodiny. Od roku 1993 se rozlišuje 12 rodin enzymů společných pro všechny savce. U člověka jsou nejvýznamnější rodiny CYP 1, CYP 2 a CYP 3, které obsahují více než 70 % CYP vzorků z jaterní tkáně (Internet 6).

CYP patří mezi klíčové enzymy metabolismu cizorodých látek (xenobiotik). Substráty biotransformují za vzniku polárnějších produktů, které pak mohou být vyloučeny a nedochází tak k bioakumulaci příslušných xenobiotik. Vedle detoxikace těchto sloučenin může docházet i ke vzniku derivátů, které jsou biologicky aktivnější

(např. aktivní formy některých léčiv), jiné mohou být toxické, mutagenní či karcinogenní (Stiborová M. et al., 1999). CYP katalyzují různé reakce zahrnující epoxidaci, hydroxylaci, deaminaci, N- dealkylaci, S-oxidaci a N oxidaci.

CYP katalyzuje hlavně monooxigenační reakce:



(Stiborová M. et al.,1999).

5.1.2 Zásah cytochromů P450 do procesu karcinogeneze

Proces karcinogeneze sestává ze tří fází: iniciační, promoční a progresní.

Iniciační fáze:

V iniciační fázi dochází ke změně genetické informace zdravých buněk, které vedou k tvorbě prekarcinogenní léze vyvolaná především rozličnými modifikacemi molekul DNA, což je považováno za kritický krok karcinogeneze. Z modifikací DNA je nejvýznamnější tvorba kovalentních aduktů DNA (kovalentní vazba karcinogenu na báze či deoxyribosu DNA). Dále tvorba hydroxyderivátů bází DNA (oxidativní léze tvořené radikálovými formami kyslíku), tvorba cyklických aduktů , tvořených z bifunkčních genotoxických činidel, poškození DNA vyvolané radiací, tvorba pyrimidinových dimerů, apurinace a apyrimidinace DNA a tvorba interkalátů (Stiborová M. et al.,1999).

Cytochromy P450 jsou jedny z nejvýznamnějších enzymů aktivujících prokarcinogeny na reaktivní formy, které tvoří kovalentní adukty. Tyto enzymy se podílejí i na reakcích, při nichž se uvolňují aktivní formy kyslíku za tvorby oxidačních lézí v DNA, kdy nejvýznamnější je tvorba 8-hydroxyguaninu v DNA. V průběhu reakcí katalyzovaných cytochromy P450 je tvorba kyslíkových radikálů součástí reakčního mechanismu. Z izoenzymů CYP je to především P450 2E1, který aktivní formy kyslíku v průběhu reakcí snadněji uvolňuje (Stiborová M. et al.,1999).

Apurinace a apyrimidinace DNA jsou přirozené procesy, ke kterým dochází, jsou-li báze DNA nějakým způsobem pozměněny. Kovalentní modifikace DNA bází vedou k rychlé apurinaci a apyrimidinaci a jsou podstatným faktorem v procesu karcinogeneze. Za vznik těchto kovalentních modifikací DNA jsou zodpovědné právě CYP (Stiborová M. et al., 1999).

Tvorba interkalátů v DNA je rovněž proces nezávislý na enzymové katalýze, ale

řada interkalačních činidel je efektivnější až jako metabolity vzniklé v biotransformačních reakcích katalyzovaných CYP (Stiborová M. et al., 1999).

Promoční fáze:

V promoční fázi jsou klíčovými faktory především aktivity proteinkinasy a fosfatasy a jejich regulace. Růst nádorů ovlivňují i další faktory, zejména produkty onkogenů, uvolňované po aktivaci onkogenů buď onkogenním virem, nebo jinými karcinogenním podnětem, kterým mohou být právě oxidativní změny DNA, způsobené radikálovými formami kyslíku, jejichž vznik je podmíněn aktivitami některých CYP a dalších hemových enzymů – peroxidasy (Stiborová M. et al., 1999).

Progresní fáze:

Poslední progresní fázi karcinogeneze můžeme přirovnat k iniciační fázi. Modifikace DNA jsou v této fázi ještě efektivnější. Dochází zde k tvorbě buněk již totálně maligně pozměněných (Stiborová M. et al., 1999).

5.1.3 Flavonoidy a cytochromy P 450

CYP hrají klíčovou roli v metabolismu hydrofóbních endogenních substrátů (sterolů, prostaglandinů a mastných kyselin). Ačkoliv přeměňují xenobiotika na méně toxické produkty, někdy se mohou při těchto reakcích vytvářet volné radikály způsobující toxicitu. Pro pochopení metabolismu flavonoidů je proto důležité znát jejich účinek na CYP. Flavonoidy modulují enzymovou aktivitu CYP isoenzymů. Mohou zvyšovat kapacitu CYP a tím zprostředkovat karcinogenní aktivaci. Navíc některé metabolity flavonoidů jsou schopny vázat se kovalentně s DNA nebo proteiny (Hodek et al., 2002).

Na druhé straně flavonoidy mohou inhibovat CYP a zhaset reaktivní formy-volné radikály a tímto se projevit jejich prospěšný účinek (Hodek et al., 2002).

Působení PF proti mutagenezi spočívá tedy v inhibici aktivity řady CYP, které aktivují promutageny a prokarcinogeny na vlastní účinné metabolity.

Inhibiční kapacita flavonoidů k aktivitě CYP byla rozsáhle studována díky schopnosti blokovat iniciační fázi karcinogeneze. Syntetické i přírodní flavonoidy jsou účinné inhibitory čtyř CYP: CYP1A1, 1A2, 1B1 a 3A4 a jednoho steroidogenního CYP CP19 (Hodek et al., 2002).

CYP představují nezbytnou součást obranných mechanismů téměř všech žijících organismů včetně člověka. Bez jejich přítomnosti bychom nebyli

schopni odolat toxickému působení různých chemikálií. Ukazuje se však, že přes svůj ochranný význam, může činnost těchto enzymů vést i k poškození vlastního organismu.

5.2 ANTIOXIDAČNÍ ÚČINKY

5.2.1 Oxidační stres

Základem oxidačního stresu jsou volné kyslíkové radikály a další reaktivní formy kyslíku, které vznikají během běžných metabolických procesů v lidském těle, ale také díky působení vnějších zdrojů, jako je znečištěné ovzduší, záření, cigaretový kouř, chemické látky a léky. Na jedné straně jsou vysoce reaktivní formy kyslíku důležité pro naši antimikrobiální ochranu, kdy pomáhají usmrcovat mikroorganismy během fagocytózy, na druhé straně jde o oxidační stres, který se podílí na poškození bílkovin, lipidů a nukleových kyselin, na akceleraci aterosklerózy, degenerativních onemocnění a karcinogeneze. Radikálem je molekula, která má ve valenční sféře jeden nebo více nepárových elektronů. Příčinou nádorového onemocnění je multifaktoriální proces spočívající v oxidaci LDL a poškození DNA vlivem oxidace (Internet 7).

Během první fáze karcinogeneze jsou volné radikály z organismu odstraňovány několika způsoby. Prvním způsobem je pomocí antioxidantů, které výrazně zpomalují radikálové reakce. Druhým mechanismem je zachycování volných radikálů jinými molekulami a tím jsou zneškodňovány. Posledním mechanismem, který není zcela prozkoumán, je reakce dvou volných radikálů, které spolu zanikají (Internet 7).

Antioxidační aktivita flavonoidů je velice významná v potlačení oxidačního stresu a tedy v prevenci chronických chorob jako je například ischemická choroba srdeční, diabetes a také vzniku rakoviny (Murota K., Terao J., 2003). Jejich antioxidační aktivita závisí na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule a také na jejich glykosylaci. Optimální vlastnosti byly nalezeny u flavonolů (Internet 3).

Flavonoidy jsou přirozené fenolické antioxidanty. Tvoří strukturně rozmanitou skupinu látek. Přisuzují se jim příznivé účinky na organismus a tak na nižší výskyt aterosklerózy u lidí ve středomoří při pití červeného vína a stravě bohaté na zeleninu. Působí také proti bakteriím, virům a mají protizánětlivé účinky (Kondrová E. et.al, 2006). Flavonoidy jsou neenzymatické, fyziologické zhašecí systémy (Internet 7). Jejich působení proti aterogenním procesům a vznik rakoviny se vysvětluje hlavně jejich antioxidačními účinky proti LP a zhašením ROS (reaktivní formy kyslíku), především OH radikálů.

Lipoperoxidace (LP):

LP je oxidační poškození buněčných lipidů provázené tvorbou peroxidů lipidů. Je důsledkem působení xenobiotik pracovního a životního prostředí - benzen, tetrachlormethan. PF brání iniciaci lipoperoxidace a následným řetězovým radikálovým reakcím tím, že redukuje radikály peroxidů lipidů a také tím, že chelatují ionty přechodných kovů (Fe, Cu), které se na iniciaci LP i řetězových reakcí podílejí (Kondrová E. et.al, 2006). PF také regenerují antioxidační vitamíny C a E a inhibují aktivitu cyklooxygenázy a lipooxygenázy, které tvoří radikály lipidů enzymaticky (Kondrová E.et.al, 2006).

Reaktivní formy kyslíku:

ROS poškozují DNA a působí toxicky na proteiny a tím se podílejí na iniciaci rakoviny. Hrají tedy významnou roli při vzniku nádorů. Nadměrná tvorba těchto ROS může být vyvolána radioaktivním zářením, xenobiotiky nebo CYP. PF působí proti ateroskleróze a rakovině potlačením ROS, především OH radikálů (Kondrová E.et.al, 2006).

5.2.2 Flavonoidy jako antioxidyanty a prooxydanty

Antioxidační a prooxidační aktivita proti LP byla studována in vitro jak v enzymatickém systému s NADPH, tak v mikrosomech s Fe^{2+} ionty, Fe^{2+} ionty s askorbátem, Fe^{3+} ionty, Fe^{3+} ionty s doxorubicinem a NADPH s DOX. Jaterní mikrosomy pro tuto metodu byly získány z potkanů (Kondrová E. et al., 2006).

Antioxidační účinky:

Antioxidační účinnost PF byla hodnocena pomocí IC_{50} , což je jejich koncentrace, která snižuje buněčnou proliferaci (LP nebo OH·radikály) na 50% (Kondrová E. et al., 2006).

V organismu in vitro na LP se antioxidační účinky PF projeví v enzymatických reakcích s účastí NADPH intracelulárně, ale i v extracelulárním systému s Fe^{2+} ionty. Antioxidant askorbát (AA) přítomný běžně v organismu v séru snížil tyto antioxidační vlastnosti zvýšením prooxidační aktivity Fe^{2+} iontů, proto lze usuzovat na to, že antioxidačně účinné koncentrace PF lze dosáhnout jen stěží. Ionty Fe^{2+} jsou vázány převážně na hemoglobin, případně na myoglobin cytochromů (Kondrová E.et.al, 2006). Volné Fe^{3+} ionty přítomny v krvi a tkáních jsou do značné míry vázány fosfátem

na špatně rozpustnou sloučeninu, čímž je snížen jejich prooxidační vliv (Kondrová E.et.al, 2006).

Doxorubicin (DOX) a PF v enzymatickém systému mikrosomů s NADPH a PF vzájemně posílily antioxidační účinky, takže podmínky pro antioxidační účinnost PF se intracelulárně jeví příznivé a vhodné pro účinky proti nežádoucím prooxidačním účinkům DOX například v buňkách srdečního svalu (Kondrová E.et.al, 2006).

Kvercetin vyvolal nejúčinnější snížení LP v mikrosomech v NADPH systému a tím antioxidační účinky, méně ale také silně antioxidačně působily i jiné flavonoidy (fisetin, myricetin, resveratrol a morin) (Kondrová E. et al., 2006).

Dále flavonoly (kvercetin) inhibovaly nejvíce LP stanovenou reakcí s thiobarbiturovou kyselinou (TBARS) v NADPH systému. Inhibice LP v Fe^{2+} systému byla většinou o řád silnější než v systému s Fe^{2+} s AA. DOX snižoval LP v mikrosomech s NADPH. V kombinaci s DOX byly všechny PF výrazně účinnější, jejich IC_{50} byly výrazně nižší a tedy antioxidační účinky větší. DOX a PF tedy vzájemně potencují svůj účinek.

Tvorba $OH\cdot$ radikálů v NADPH systému byla snížena kvercetinem ale také myricetinem, fisetinem a tím se opět projevil antioxidační účinek kvercetinu a jiných PF (Kondrová E., et al., 2006).

Tvorba komplexů PF s Fe^{2+} či Fe^{3+} systémem nekorelovala s inhibicí LP vlivem PF v Fe^{2+} systému, takže inhibice LP nebyla dána chelatací Fe, ale korelovala s LP v NADPH systému, což ukázalo významnou roli chelatace hemového Fe P450 pro jejich antioxidační účinek (Kondrová E., et al., 2006).

Prooxidační účinky:

V rozporu s antioxidačními vlastnostmi, flavonoidy obsahující fenolový B kruh se ukázaly být prooxidanty spotřebovávající NADH a vytvářející $NAD\cdot$ radikály, které jsou metabolizovány peroxidásou in vitro (Hodek et al. 2002).

PF v systému s Fe^{3+} ionty působil DOX prooxidačně, zřejmě svým chelatačním účinkem, a dokonce vyvolal i prooxidační škodlivé účinky některých známých antioxidantů, i když byly vázány jen na určité koncentrace těchto PF, ale v koncentracích, které se reálně v organismu mohou vytvořit (Kondrová E.et.al, 2006).

Interakce Fe^{3+} s DOX a metabolitem doxorubicinolem je hlavní mechanismus poškození myokardu při terapii anthracykliny.

Další prooxidační účinky jsou vyvolány, když volné Fe^{2+} ionty reagují s AA.

Tvorba OH· radikálů v NADPH systému byla zvýšena kaempferolem, morinem a resveratrollem, což ukazuje na jejich prooxidační účinek (Kondrová E.et.al, 2006).

Žádný PF až do 40 μM koncentrace nezhasel OH radikály v systému Fe²⁺ s AA (Kondrová E. et.al, 2006).

Zde uvádím tabulku výsledků z pokusů dle Kondrové E., et al., 2006, kde lze porovnat kvercetin a jiné flavonoidy oproti jiným flavonoidům v jejich antioxidačních vlastnostech.

Tabulka 1 : Struktury, IC₅₀, chelatace iontů Fe a vliv doxorubicinu:

atioxidant	Sloučenina	OH substituce	Inhibice LP IC ₅₀ (μM)				zhášení ·OH IC ₅₀ (μM) nebo zvýšení (%)		Chelatace (+/-) či oxidace (ox)		
			ADPH- systém	NADPH/ DOX	Fe ²⁺ - systém	Fe ²⁺ ~AA systém	Fe ³⁺ / DOX	NADPH- systém	Fe ²⁺ ~AA systém	Fe ²⁺	Fe ³⁺
Flavonoly	Myricetin	3,5,7, 3',4', 5'	7.5	4	4.2	43,4	↑5x-8x 4 -8μM	9.9	>40	+(2)	ox(8)
	kvercetin	3,5,7, 3',4'	1.7	1,5	4.8	29.5	↑3x 15-35μM	24,1	>40	+(1)	ox(2)
	Rutin	5,7, 3',4'	> 30	10		>40	↑ 2x 2-6μM	> 40	> 40	+(6)	+(4)
	Fisetin	3,7, 3',4'	6,9	1	5.5	61.1	slabá inhibice	22.1	> 40	+(3)	+(1)
	Kaempferol	3,5, 7,4'	13,9	1	3,4	5,3	neúčinný	145,0 %	>40	+(5)	+
	Morin	3,5,7, 2',4'	8.8	1	7,5	13,4	neúčinný	74.7 %	>40	+(4)	+(3)
Flavanony	Naringenin	5,7, 4'	> 30	1,5	>40	37,2	neúčinný	>40	>40	+	+
lavanoly	(+) FF Katechin	- 3,5,7, 3',4',	22.2	3,5	3.0	16,8	slabá inhibice	>40	>40	+	+
	(-)-Epikate- chin	3,5,7, 3',4'	5,9	3,5	1,6	12,5	slabá inhibice	>40	>40	+	+
Stilben	T rans- resve- ratrol	3,5,4'	6.1	1	3.6	2,9	neúčinný	131.5 %	>40	-	-
Deriváty yselin	kK Gallová kys.	3,4,5	>40	2	6.7	>80	↑ 2.5x 5-15μM	>40	>40	+	+(6)
	Gentisová kys.	2,5	>30	.st.		>80	n.st.	>40	>40	-	ox

	Kávová kys.	3.4	>30	n.st.	4.5	51,4	n.st.	>40	>40	.st.	+(5)
	p-Kumarová kys.	4	>25	n.st.		>80	n.st.	>40	>40	n.st.	+(7)
Vitaminsy	α -Tokofol	-	3.9	n.st.	> 12	> 20	n.st.	>40	>40	n.st.	n.st.
	Ascorbová kys.	-	>40	n.st.		-	n.st.	>40	-	n.st.	n.st.

LP - lipoperoxidace, $\cdot\text{OH}$ - OH radikály

IC_{50} (μM) - koncentrace polyfenolů působící 50% inhibici lipoperoxidace nebo koncentrace $\cdot\text{OH}$

n.st. - nebylo stanoveno, *DOX* - doxorubicin.

Čísla v závorkách v kolonkách chelatace určují pořadí účinnosti chelatace iontů Fe

(+/-) znamená, zda látka chelatovala Fe ionty nebo ne

Z tabulky lze vyčíst:

pořadí síly chelatace:

u Fe^{2+} : kvercetin > myricetin > fisetin > morin > kaempferol > rutin

u Fe^{3+} : fisetin > kvercetin > morin > rutin > kys.kávová > gallová > kumarová > myricetin

Nejzajímavější vlastnosti se zdají být u kvercetinu. Má největší schopnost chelatace Fe^{2+} a tím pravděpodobně antioxidační vlastnosti, inhibici iniciace LP v mikrosomech v NADPH systému, podílející se na inhibici vzniku karcinogeneze a aterogenních procesů.

Vlivem Fe^{3+} byl kvercetin oxidován a tyto jeho oxidované formy by mohly působit i jeho prooxidační účinky na LP.

Koncentrace PF pro zhášení $\cdot\text{OH}$ radikálů byly mnohem vyšší než pro účinnou inhibici LP, proto v těchto systémech hráli ROS v iniciaci řetězových reakcí LP méně významnou roli.

Žádný PF až do 40 μM koncentrace nezchášel OH radikály v systému Fe^{2+} s AA (Kondrová E. et.al, 2006).

5.3 ZÁSTAVA BUNĚČNÉHO CYKLU A NAVOZENÍ A POPTÓZY

Zástava buněčného cyklu:

Buněčný cyklus se skládá z interfáze a mitózy. Interfáze je období mezi dvěma mitózami a skládá se z G₀, G₁, S, a G₂ fází po sobě následujících. G₀ fáze je fáze klidová, kde nedochází ke změnám DNA a buňka plní své normální, nezbytné a specializované funkce. V G₁ fázi se buňka připravuje na syntézu DNA. V následující S fázi dochází k replikaci DNA a duplikaci chromozomů. Jako poslední fáze interfáze je fáze G₂, která je důležitá pro reparaci chyb vzniklých během duplikace DNA a buňka se připravuje na budoucí mitózu, tato fáze je charakteristická dalším růstem a proteosyntézou. Syntéza DNA v S fázi a separace dvou dceřinných geneticky identických buněk v M fázi (mitotická fáze) jsou hlavními znaky progresu buněčného cyklu. (Ren W. et al., 2003)

Regulace buněčného cyklu je řízena dvěma skupinami bílkovin: cyklin-dependentní kinázy (CDK), které fosforylují regulační proteiny na serinových a threoninových zbytcích. Druhou skupinou regulačních proteinů jsou cykliny, ty se váží na molekulu kinázy a vytváří se tím komplex schopný fosforylace bílkovin (Krejsek J., Kopecký O., 2004). CDK byly tedy rozpoznány jako klíčové regulátory progresu buněčného cyklu. Změna a deregulace CDK aktivity je patogenní známkou tvorby nádoru. Velký počet rakovin je spojen s hyperaktivitou CDK jako výsledek mutace CDK genů nebo inhibitorů CDK genů. (Ren W. et al., 2003).

Mitogenní signály buněk zasahující do regulačních kroků řídicích buněčný cyklus tak způsobují jeho přerušení. Tato odchylka v progresi buněčného cyklu může vysvětlovat antikarcinogenní efekt flavonoidů, které jsou schopny tyto CDK inhibovat a tím zastavovat buněčný cyklus a zamezovat vzniku nádoru (Ren W. et al., 2003).

Genistein v koncentraci 5-20 µg/ml vyvolává zástavu buněčného cyklu ve fázích G₁/S a G₂/M u lidské myelogenní leukemické linie HL60 a lymfatické leukemie a pozastavuje růst rakovinných buněk žaludku ve fázi G₂/M (Ren W. et al., 2003).

Indukce apoptozy:

Apoptóza je forma aktivní, programované buněčné smrti. Hraje hlavní roli v procesu karcinogeneze, protože ničí poškozené buňky. Je vysoce regulována geny,

kteře buď podporují apoptózu nebo přežití buňky a je zprostředkována přes organizovanou síť proteáz a jejich inhibitorů, jako odpověď na škodlivé stimuly z vnějšího nebo vnitřního prostředí buňky. Dysregulace apoptózy může hrát rozhodující roli v onkogenezi. Nedávné studie ukázali, že ne všechny chemoterapeutické agents vykazují tumoricidní efekt navozením apoptózy u cílových buněk. (Ren W. et al., 2003).

Bylo zjištěno, že flavonoidy způsobují apoptosu u některých linií rakovinných buněk. Hlavními mechanismy, kterými flavonoidy indukují apoptózu jsou inhibice aktivity DNA topoisomeras I/II, inhibice ROS, regulace exprese HSP (heat shock proteins), modulace signálních drah, uvolnění CYP C s následující aktivací kaspázy 9 a kaspázy 3, regulace snižující expresi genu Bcl-2 a Bcl-X a zvyšující expresi Bax a Bak geny a aktivace endonukleás (Ren W. et al., 2003).

5.4 ANTIPROLIFERATIVNÍ ČINNOST

Dysregulace proliferace je známkou zvýšené náchylnosti k neoplazii. Prevence rakoviny je spojena s inhibicí, reversí nebo retardací buněčné proliferace. Je známo, že flavonoidy a isoflavonoidy se chovají jako hlavní inhibitory buněčného růstu. Přestože je většina flavonoidů a isoflavonoidů netoxická u lidí i zvířat, byla u nich zjištěna schopnost inhibice proliferace u mnoha typů lidských rakovinných buněčných linií (Birt D.F. et al., 1996). Molekulární mechanismy antiproliferativní aktivity flavonoidů se týká inhibice prooxidačních procesů způsobujících tumorový růst (Ren W. et al., 2003). Antiproliferativní efekt mají citrusové flavonoidy např. kvercetin, taxifolin, tangeretin (Birt D.F. et al., 1996). Piantelli et al., 1993 převzato z Birt D.F. et al., 1996, demonstroval antiproliferativní aktivitu kvercetinu na buňky meningiomu. Dále Kuo, 1996 převzato z Birt D.F. et al., 1996, poukázal na antiproliferativní potenciál některých flavonoidů a isoflavonoidů na karcinom tlustého střeva. Dále byl prokázán inhibiční efekt flavonoidů na leukemické buňky HL-60 (Hirano et al., 1994 převzato z Birt D.F. et al., 1996) a účinek genisteinu byl prokázán ve vysokých koncentracích na prsní rakovinu MCF-7 (Birt D.F. et al., 1996).

5.5 ESTROGENNÍ AKTIVITA

Estrogenní efekt flavonoidů byl poprvé popsán v r.1940 (Birt D.F. et al., 1996) u australských infertilních ovcí, které konzumovaly jetel luční, jehož listy obsahovaly asi 5% sušiny sojových isoflavonů (biochanin A a formononetin). Flavonoidy jsou látky velmi studované pro svou estrogení a antiestrogení aktivitu (Zand R. S. R. et al., 2002). Jde především o isoflavon genistein, flavonol kvercetin a flavon apigenin a jiné flavonoidy odvozené od dalších rostlin (Birt DF, et al., 1996). Jejich PF struktura kruhu je podobná steroidnímu jádru 17- β estradiolu. Toto dává důvod k pochopení jejich vazby k estrogenového receptoru II. typu, dochází ke kompetici PF s estradiolem o vazbu na estrogenový receptor. Relativní vazebná afinita těchto sloučenin pro estrogenový receptor je 0,05-1% vazebné afinity 17- β estradiolu (Birt D.F, et al., 1996).

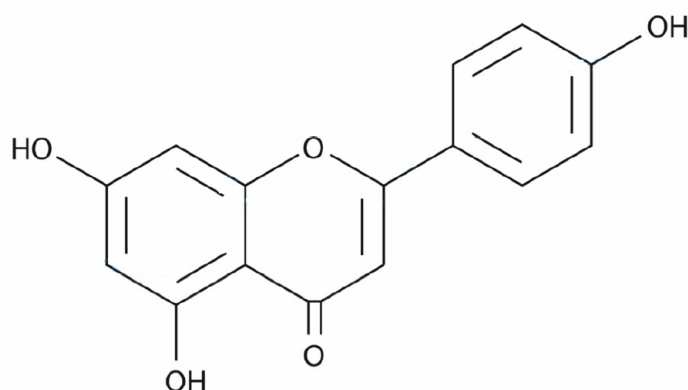
Dle Miksicek, 1995 převzato z Birt DF. et al., 1996 byla stanovena estrogenicita flavonoidů a isoflavonoidů sestupně takto: genistein > kampherol > naringenin > apigenin > daidzein > biochanin A > formononetin > luteolin > fisetin > catechin > hesperetin. Jsou schopny podobně jako estrogeny inhibovat schopnost oxidace lipidů, agregaci destiček, expresi cytokinů a adhezivních molekul a navíc podporují vazodilataci.

Studie zabývající se tímto výzkumem podporují použití těchto sloučenin a jídla ve kterém jsou obsaženy pro prevenci rakoviny prostaty (Zand R. S. R. et al., 2002), pro prevenci osteoporózy (Anderson, 1999 převzato z Birt D.F, et al., 1996), pro zmírnění menopuasálních příznaků (Brzezinski et al., 1997 převzato z Birt D.F, et al., 1996) a snižování hladiny cholesterolu (Lichtenstein, 1998 převzato z Birt D.F, et al., 1996) . Kvercetin, luteolin, apigenin, kaempferol jsou inhibitory prsní rakoviny (Zand R. S. R. et al., 2002).

6 FLAVONY

Spolu s flavonoly patří k nejrozšířenějším žlutým rostlinným pigmentům. V listech stromu ginkgo biloba je obsažen flavon amentoflavon (internet 14).

6.1 APIGENIN



(Internet 10).

Apigenin- 4,5,7- trihydroxyflavon je jeden z nejběžnějších, nemutagenních flavonoidů, který se hojně vyskytuje v ovoci, zelenině a bylinách (Czernik M., al., 2008). Tento aglykon byl prvně izolován z petržele a celeru. Dále se nachází v mnoha bylinách jako je tymián, máta a heřmánek (internet 8).

Bylo zjištěno, že apigenin inhibuje oxidační stres, nádorový růst a má chemopreventivní účinek. Je schopen zastavovat buněčný cyklus a navozovat apoptózu. Jeho ochranná role byla zkoušena proti NDEA (N - nitrosodiethylaminu) a PB (phenobarbital), způsobujícím oxidační stres. Apigenin navozuje poškození těchto látek a tedy následně inhibuje oxidační stres (Jeyabal PVS, et al., 2005). V procesu tumorového růstu blokuje hlavní kontrolní body v regulaci buněčného cyklu. Inhibuje CDK a redukuje transkripční faktory (Birt DF, et al., 1996). Je schopen inhibovat enzym CYP 2C9 (internet 8).

Apigenin inhibuje expresi cévního endoteliální růstové faktoru VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) a také HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) v lidských ovariálních rakovinných buňkách při rakovině vaječníku, která je jednou z nejběžnějších rakovin způsobujících smrt u žen (Internet 9).

Dále apigenin selektivně inhibuje kaseinovou kinasu II (CK2). Inhibuje její aktivitu v ledvinové kůře s hodnotou IC_{50} 30 μ M a zlepšuje renální funkce u potkaního modelu glomerulonefritidy (Internet 10).

Redukuje oxidativní poškození DNA a inhibuje růst lidských leukemických buněk (Internet 11) a také zastavuje buněčný cyklus a navozuje apoptózu buněk karcinomu prostaty.

6.1.1 APIGENIN A JEHO VLIV NA HEPATOCELULÁRNÍ KARCINOM

Hepatoceleulární karcinom (HCC) je jedním ze 4 nejvíce převládajících zhoubných nemocí v Číně, Taiwanu, Koree a Afriky (L.C. Chiang et al.,2006). Ve světovém měřítku tvoří asi 5 % všech maligních onemocnění. Hlavní příčina HCC je známa jako výsledek nákazy virové hepatitidy typu B (HBV). Vyznačuje se velkou úmrtností, většina nemocných se nedožije 1 roku (Internet 12) a šance na uzdravení je velmi nízká. V současné době jsou k dispozici obvyklé a modifikované terapie, které jsou jen zřídka kdy prospěšné. Vědci však dále pokračují ve výzkumu pro získání více účinnější léčby a méně vedlejších účinků pro léčbu HCC (L.C. Chiang et al.,2006).

6.1.1.1 Inhibiční efekt apigeninu na buněčnou proliferaci buněk jaterního karcinomu

Při studiu lidského karcinomu se ukázalo, že apigenin je schopen vyvolávat inhibici růstu, zástavu buněčného cyklu a vyvolávat apoptózu. Inhibuje růst lidského hepatomu buněčné linie Hep G2. V dnešní době jsou zatím informace o jeho antitumorové aktivitě a buněčných mechanismů omezené. Přesto lze objasnit jeho antihepatomální aktivitu na buňky Hep G2, Hep 3B, PLC/PRF/5 a na buňky normálních myších jater BNL CL. 2. Antihepatomální aktivita proti Hep G2 buněk HCC byla tak aktivní jako u komerčního antihepatomálního agents 5- fluoroacil (5 FU) (L. C. Chiang et al., 2006).

Výsledky z výzkumu o účinku apigeninu na buňky HCC byly zhodnoceny z různých koncentrací apigeninu na buňky Hep G2, Hep 3B a PLC/PRF/5. Po 48 hodinové léčbě, apigenin vykazoval anti-proliferativní účinek na všechny testované buněčné linie. Hodnota $IC_{50} = 8.02 \pm 1.30 \mu\text{g/ml}$ pro Hep G2, $22.16 \pm 0.67 \mu\text{g/ml}$ pro Hep 3B a $22.73 \pm 1.97 \mu\text{g/ml}$ pro PLC/PRF/5. Nejnižší hodnoty IC_{50} při léčbě apigeninem byly vykazovány u buněčné linie Hep G2. Zajímavé bylo zjištění růstu inhibičního účinku apigeninu na normální myší jaterní buňky (BNL CL. 2), která nebyla

tak významná jako na nádorových buňkách ve stejné koncentraci (L.C. Chiang et al., 2006).

Selektivní efekt na rakovinné buňky se vyjadřuje jako hodnota SI- selektivní index. Agents s vysokou hodnotou SI jsou považovány za nadějně chemopreventivní a chemoterapeutické agents proti rakovině (L. C. Chiang et al.,2006).

Tabulka 2: cytotoxicita apigeninu na lidské buňky jaterního karcinomu

Lék	Buněčná linie						
	BNL CL.2	Hep G2		Hep 3B		PLC/PRF/5	
	CC ₅₀	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI
5-FU	16.56	6.75±0,48	2.45	15.72±2.47	1.05	17.84±1.29	0.93
Apigenin	293.40	7.63±1.29	38.45	22.16±0.67	13.24	22.55±1.42	13.01

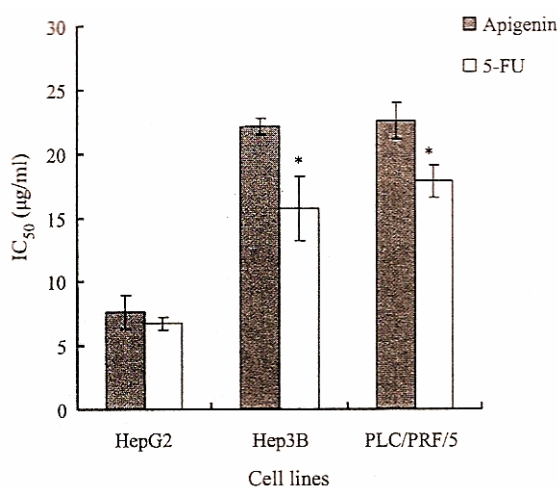
IC₅₀ – léková koncentrace, která udává 50 % snížení životnosti buněk jaterního karcinomu

CC₅₀ – léková koncentrace, která udává 50 % snížení životnosti normálních myších jaterních buněk

SI-index selektivity = CC₅₀/IC₅₀

(L. C. Chiang et al., 2006).

Graf 1. antiproliferativní efekt apigeninu na buňky jaterního karcinomu



5FU.. pozitivní kontrola

Hodnoty IC₅₀ jsou vyjádřeny jako směrodatná odchylka ± SD třech nezávislých experimentů

* ukazuje na významný rozdíl mezi léčbou 5-FU a apigeninem

6.1.1.2 Apigenin a zástava buněčného cyklu

Apigenin zastavuje buněčný cyklus. K hodnocení této funkce byla použita průtoková cytometrie.

Tabulka č. 2 ukazuje na akumulaci buněk v G₂/M fázi buněčného cyklu, způsobená apigeninem po dobu léčby 48 h. Bylo nalezeno, že zvýšení buněčné populace v G₂/M fázi buněčného cyklu je doprovázeno zvýšením úbytku počtu buněk v G₀/G₁ fázi buněčného cyklu (L.C. Chiang et al.,2006).

léčba	Fáze buněčného cyklu		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
kontrola(0.1% DMSO)	62.63 ± 0.61	23.20 ± 0.59	14.17 ± 0.96
Apigenin (4µg/ml)	52.26 ± 0.46	27.47 ± 1.66	20.27 ± 1.17
Apigenin (8 µg/ml)	29.96 ± 0.45	16.75 ± 1.88	53.29 ± 0.79

6.1.1.3 Apigenin a exprese proteinu p53 a p21

Apigenin je schopen zvyšovat expresi proteinů p53 a p21 a tím se podílet na inhibici procesu karcinogeneze a má tedy vliv na buňky HCC.

Jaterní buňky Hep G2 p53 pozitivní byly inkubovány s 8 µg/ml apigeninu po dobu 6, 12, 24 a 48 h. Výsledek ukázal zřetelně zvýšenou expresi proteinu p53 po 6 hodinách inkubace, což se zdá být jako velice pozitivní výsledek. Pokud se odhalí závažné změny v buňkách, protein p53 zvýší svou expresi a uplatní se jeho funkce transkripčního faktoru a v buňce jsou pak zvýšené hladiny jím produkovaných transkriptů- p21, což jsou blokátory CDK. Tím dojde k zástavě buněčného cyklu v pozdní fázi G1 nebo stimuluje apoptózu buňky. Tato vysoká hodnota exprese p53 byla udržena od 6 do 12 hodin. Pro určení zda exprese p21 po léčbě apigeninem byla závislá nebo nezávislá na p53, byla stanovena hladina proteinu p21 v buňkách Hep G2 s použitím metody WAF1 ELISA. Výsledek ukázal na zvýšení proteinu p21 v buňkách Hep G2 za 12 h. Tím bylo poukázáno na schopnost apigeninu zprostředkovávat apoptosu, což se děje přes cestu aktivace proteinu p21, jehož funkce je propojena s funkcí p53 (L.C. Chiang et al.,2006).

7 SHRNUÍ

Cílem mé bakalářské práce bylo vyhledat a shrnout informace o základních mechanismech působení flavonoidů v procesu karcinogeneze a uvést konkrétní flavonoid a jeho vztah k vybranému typu rakoviny. Já jsem se zaměřila na apigenin a jeho vliv na HCC.

Flavonoidy jsou řazeny mezi fenolické látky. Vyskytují se téměř ve všech rostlinách, v ovoci, zelenině, cereáliích, luštěninách a révových vín. V dnešní době jsou velmi studované pro svou důležitost zejména v prevenci srdečně cévních, nádorových a neurodegenerativních nemocí. Tvoří strukturně heterogenní soubor a rozdělují se do 6 nejznámějších tříd: flavonoly, flavony, flavanony, flavanoly, antocyanidiny, chalkony a isoflavonoidy. Obsahují ve své molekule dvě benzenová jádra A a B spojené trojuhlíkovým řetězcem. Navzájem se liší polohou a počtem hydroxylových skupin a zapojením cukrů nebo organických kyselin. Metabolismus flavonoidů se zdá být poměrně složitým mechanismem, máme dvě hlavní místa metabolismu- střeva a játra, některé flavonoidy jsou vstřebávány v tenkém střevě, jiné procházejí až do tlustého střeva, kde podléhají vlivu bakteriální mikroflóry, která je schopná flavonoidy štěpit. V organismu se mohou vyskytovat buď jako samostatné aglykony nebo ve formě glykosylované.

Flavonoidy se podílejí v procesu karcinogeneze 5 velmi důležitými mechanismy: modulací enzymové aktivity, antioxidačními účinky, schopností zastavit buněčný cyklus a navodit apoptózu, antiproliferativní činností a poslední estrogení aktivitou. Základem jejich prospěšné biologické aktivity v procesu karcinogeneze je deaktivace OH radikálů, peroxidového aniontu a peroxidů lipidů. Modulují enzymovou aktivitu isoenzymů CYP, zvláště CYP 1A1, 1A2, 1B1, 3A4 a podílejí se tak na zhášení volných radikálů způsobujících oxidativní stres. Také inhibují CDK a tím se vysvětluje jejich protizánětlivý účinek. Jsou to charakteristické, fyziologické zhášecí systémy LP a ROS podílející se na redukci vzniku karcinogenního procesu. Kvercetin vyvolal nejúčinnější snížení LP v mikrosomech v NADPH systému, inhiboval nejvíce LP stanovenou reakcí s TBARS v NADPH systému a inhiboval také nejúčinněji tvorbu OH· radikálů. V kombinaci s DOX byly všechny PF výrazně účinnější, jejich IC₅₀ byly výrazně nižší a tedy antioxidační účinky větší. DOX a PF vzájemně potencovaly svůj účinek. Jejich antiproliferativní účinnost se projevuje ve zpomalení buněčné proliferace, což se zdá být výsledkem zřejmě jejich vazby k estrogenovému receptoru.

Bylo zjištěno, že apigenin inhibuje oxidativní stres, nádorový růst, zastavuje buněčný cyklus a navozuje apoptózu. Inhibuje rakovinu vaječníků u žen, leukemické buňky a buňky karcinomu prostaty.

Z výzkumu zabývajícího se HCC byl zjištěn jeho kladný vliv. Jeho efekt na HCC byl popsán ze tří úhlů, které jsou navzájem propojené. Inhibuje proliferaci buněk, zastavuje buněčný cyklus a zvyšuje expresi proteinů p53 a p21. Ukázalo se, že má antiproliferativní efekt na 3 rozdílné buněčné linie HCC a to Hep G2, Hep 3B a PLC/PRF/5. Nejnižší hodnoty IC_{50} při léčbě apigeninem vykazovala buněčná linie Hep G2. Hodnoty SI větší než 12,91 indikují na to, že apigenin je schopen inhibovat buněčný růst u buněk HCC, ale neinhibuje buněčný růst u normálních myších jaterních buněk BNL CL.2.

Buněčný cyklus je u buněk HCC zastavován apigeninem po dobu jeho léčby v G_2/M fázi a následně dochází k akumulaci buněk v tomto místě, doprovázené úbytkem počtu buněk v G_0/G_1 fázi.

Dále je apigenin u HCC schopen navození apoptózy. Apoptický mechanismus apigeninu je zprostředkovaný přes cestu proteinu p53 a indukci exprese proteinu p 21.

8 ZÁVĚR

Flavonoidy tvoří nejpočetnější skupinu chemoprotektivních přírodních látek. Někteří jejich zástupci jsou proto nadějnými prostředky proti rozvoji některých nádorových chorob. Jejich antioxidační aktivita je závislá na počtu a poloze OH skupin a proto je také nelze považovat za zcela obecné a za všech situací příznivé antioxidanty. Pravidelná konzumace potravin s vysokým obsahem flavonoidů je velice dobrou a prokázanou prevencí proti rakovině, důležité je si však uvědomit také jejich nebezpečný vliv při jejich konzumaci ve vysokých dávkách ve formě potravinových doplňků.

9 SEZNAM ZKRATEK

DNA	deoxyribonukleová kyselina
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
PF	polyfenoly
LP	lipoperoxidace
ROS	reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen species)
DOX	doxorubicin
TBARS	thiobarbiturová kyselina
NDEA	N- nitrosodiethylaminu
PB	phenobarbital
AA	askorbát
HCC	hepatocelulární karcinom
HBV	virová hepatitida typu B
5- FU	5 fluorouracil (pozitivní kontrola)
SI	selektivní index
DMSO	dimethyl sulfoxide
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
HIF-1	hypoxia-inducible factor 1
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
CYP	Izoforma cytochromu P450
p21	Inhibitor cyklindependentní kinasy 1A
p53	Transkripční faktor (protein 53)
HL-60	lidské promyelocytové leukemické buňky
CDK	cyklin dependentní kináza
HSP	heat shock protein
Hep G2, Hep 3B	buňky jaterního karcinomu
BNL CL. 2.	buňky normálních myších jater
PLC/PRF/5	lidská hepatocelulární rakovinná buněčná linie (human hepatocellular carcinoma cell line)
CK2	kaseinová kinasa II

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Birt D. F., Hendrich S., Wang W., Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids, *Pharmacology & Therapeutics*, 90, 2001, s.157-177.
- Birt D.F., Pelling J.C, Nair S. et al.: Diet intervention for modifying cancer risk, vol. 395, 1996, s. 223-234.
- Boušová I. : Natural compounds with potential antioxidant activity, in vitro study in model of protein glycooxidation, *Disertační práce*, 2006, s.24-28.
- Chiang L.C., Ng L.T., Lin I., Kuo P.L. Lin C.C.: Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human Hep G2 cells, *Cancer Letters*, 237, 2006, s.207-214.
- Czernik M., Sroka J., Madeja Z. et al.: Apigenin inhibits growth and motility but increases gap junctional coupling intensity in rat prostate carcinoma (MAT-LyLu) cell populations, vol. 13, 2008, s.327-338.
- Harborne J. B., Williams C. A.: Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry* , 55, 2000, s.481-504.
- Hodek P., Trefil P., Stiborová M.: Flavonoids - potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P 450, *Chemico-Biological Interactions*, 139, 2002, s.1-21.
- Hubík J., Dušek J., Spilková Jiřina, et al. :*Obecná Farmakognosie II. Sekundární látky*, II. vydání. Praha, Státní pedagogické nakladatelství Praha 1, 1986, 275 s., ISBN 17-144-86.
- Jeyabal PVS, Syed MB, Venkataraman M , et al.: Apigenin inhibits oxidative stress-induced macromolecular damage in N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatocellular carcinogenesis in Wistar albino rats, vol.:44, Is.1, 2005, s. 11-20.
- Kondrová E., Ozgová Š., Gut I. : Přirozené fenolické látky jako antioxidanty a prooxidanty a mechanismy jejich působení, *České pracovní lékařství*, 4, 2006, s.195-200.
- Krejsek J., Kopecký O., *Klinická imunologie*, I. vydání, Hradec Králové, Nucleus, 2004, 968 s., ISBN 80-86225-50-X. Kapitola 26: Imunita a nádorové bujení, s. 541-570.
- Manach C., Scalbert A.,Morand C., Rémésy C., Jiménez L.: Polyphenols: food sources and bioavailability, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 2004, s.727-47.

- Murota K., Terao J., Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism, Archives of Biochemistry and Biophysics, 417, 2003, s.12-17.
- Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhang L.: Flavonoids: Promising anticancer agents, 23, 2003, s.519-534.
- Scalbert A., Morand C., Manach C., Rémésy C.: Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health, Biomed Pharmacother 56, 2002, s.276-282.
- Skibola C.F, Smith M.T., Potential Health impacts of excessive flavonoid intake, Free Radical Biology & Medicine 29, 2000, s.375-383.
- Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví, Chemické listy ,93, 1999, s.229-237.
- Zand R. S. R., Jenkins D.J.A., Diamandis E.P., Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers, Journal of Chromatography B, 777, 2002, s.219 – 232.

- **Internetové zdroje:**

Internet 1:

http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/l/L_08AC.doc (8.4.09)

Internet 2:

http://nova.medicina.cz/odborne/clanek.dss?s_id=3378 (14.4.09)

Internet 3:

<http://medicina.ronnie.cz/c-330-flavonoidy.html> (14.4.09)

Internet 4:

<http://www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf> (14.4.09)

Internet 5:

http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_07_02.pdf (18.4.09)

Internet 6:

<http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/P450.htm> (14.4.09)

Internet 7:

http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xbcr/zc/INT2006_02_08.pdf (17.4.09)

Internet 8:

<http://www.raysahelian.com/cancer.html> (14.4.09)

Internet 9:

<http://carcin.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/28/4/858> (14.4.09)

Internet 10:

<http://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/10010275/a/z>
(14.4.09)

Internet 11:

http://www.lef.org/abstracts/codex/apigenin_index.htm (14.4.09)

Internet:12:

http://books.google.cz/books?id=v2izg7OV72gC&pg=PA108&lpg=PA108&dq=hepatocelul%C3%A1rn%C3%AD+karcinom+a+jeho+v%C3%BDskyt&source=bl&ots=rBEDQI7cT7&sig=NA9pkrTeMW_R8bPX5ZT6L6Q0vaw&hl=cs&ei=IoTnScP-Cs6KsAbX2cyRBw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=3#PPA108,M1
(16.4.09)

Internet 13:

<http://firesnake.pise.cz/106273-bioflavonoidy.html> (2.5.09)

Internet 14:

http://home.zf.jcu.cz/public/departments/koz/vyz/pred_05b.pdf (2.5.09)