

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**Inhibiční studie lidské membránově vázané
karbonylreduktasy**

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Lucie Škarydová, Ph.D.

Hradec Králové 2011

Mgr. Linda Laštovková

„Prohlašuji, že tato 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.“

Hradec Králové 2011

Mgr. Linda Laštovková

.....

Děkuji prof. Ing. Vladimíru Wsólvi, Ph.D. za vedení, všestrannou pomoc a cenné rady. Také děkuji Mgr. Lucii Škarydové, Ph.D. a Mgr. Adamu Skarkovi za pomoc při zpracování a vyhodnocování naměřených dat a za praktické připomínky, které mi poskytovali v průběhu mé práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Mgr. Linda Laštovková

Školitel: prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Název práce: Inhibiční studie lidské membránově vázané karbonylreduktasy

Karbonylreduktasy jsou důležitou skupinou enzymů, které se podílí jak na metabolismu endogenních látek, tak xenobiotik. Jedním z takových xenobiotik je i potenciální protinádorové léčivo oracin, které je účinkem řady karbonylreduktas metabolizováno na dva enantiomery dihydrooracinu. Takovým enzymem je i nová lidská mikrosomální karbonylreduktasa, která byla v nedávné době purifikována na Katedře biochemických věd FaF UK. Cílem této práce bylo nalézt některé inhibitory tohoto enzymu a odlišit ho tak od jiné mikrosomální karbonylreduktasy 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1.

Flavonoidy jsou látky produkované rostlinami a na lidský organismus mají řadu jak pozitivních tak negativních účinků. Jedním z nich je i inhibice různých enzymů. Mezi tyto enzymy patří i karbonylreduktasy. Inhibice různými flavonoidy byla popsána pro řadu z nich.

Inhibiční studie nové lidské mikrosomální karbonylreduktasy byla provedena právě se souborem látek patřící mezi flavonoidy. Nejsilnějším inhibitorem z dané skupiny látek byl kvercetin následovaný apigeninem, silibininem, luteolinem, kyselinou chlorogenovou a rutinem. Byl také stanoven vliv kvercetinu a kyseliny 18 β -glycyrretinové (inhibitor 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy 1) na chirální biotransformaci oracinu v lidské jaterní mikrosomální frakci.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Mgr. Linda Laštovková

Supervisor: prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Title of thesis: Inhibition study of human membrane-bound carbonyl reductase.

Carbonyl reductases are an important group of enzymes that participate in metabolism of both endogenous substances also xenobiotics. Potential anticancer drug oracin is one of such xenobiotics that is metabolised by various carbonyl reductases to two enantiomers of dihydrooracin. The new human microsomal carbonyl reductase also takes part in biotransformation of oracin. This enzyme was recently purified on Department of biochemical sciences (Faculty of Pharmacy in Hradec Králové). The aim of this study was to find some inhibitors of the new enzyme and distinguish it in terms of inhibitors from another microsomal carbonyl reductase 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1.

Flavonoids are substances produced by plants, they have a different both positive and also negative effect on human organism. One of such effect is inhibition effect on diverse enzymes. Carbonyl reductases also fall in this group. It has been described inhibitory effect of different flavonoids on carbonyl reductases.

Inhibition study of the new human micorosomal carbonylreductase was made with a group of flavonoids. The strongest inhibitor from the group of substances was quercetin and further apigenin, silibinin, luteolin, chlorogenic acid and rutin. Effect of quercetin and also 18 β -glycyrrhetic acid (an inhibitor of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1) on biotransformation of oracin in whole human liver micorosomal fraction was also determined.

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1. ÚVOD..... | 8 |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST | 9 |
| 2.1 INHIBICE ENZYMŮ | 9 |
| 2.1.1 Kompetitivní inhibice | 9 |
| 2.1.2 Nekompetitivní inhibice..... | 10 |
| 2.1.3 Akompetitivní inhibice | 12 |
| 2.2 REDUKČNÍ ENZYMY | 13 |
| 2.2.1 Redukční metabolismus | 13 |
| 2.2.2 Zařazení reduktas v rámci metabolismu xenobiotik | 13 |
| 2.2.3 Redukce karbonylové skupiny | 14 |
| 2.2.3.1 Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR) ... | 16 |
| 2.2.3.2 Aldo-keto reduktasy (AKR)..... | 16 |
| 2.2.3.3 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) | 17 |
| 2.3 ORACIN | 19 |
| 2.3.1 Protinádorové působení | 19 |
| 2.3.2 Biotransformace oracinu | 19 |
| 2.4 FLAVONOIDY | 21 |
| 2.4.1 Vliv flavonoidů na enzymy I. fáze biotransformace..... | 24 |
| 2.4.1.1 Flavonoidy a cytochrom P450 | 24 |
| 2.4.1.2 Inhibiční účinek flavonoidů na některé enzymy ze skupiny karbonylreduktas | 27 |
| 2.4.1.3 Vliv flavonoidů na chinonreduktasu | 30 |
| 2.4.2 Vliv flavonoidů na enzymy II. fáze biotransformace | 30 |
| 2.4.2.1 UDP-glukuronyltransferasa (UGT) | 31 |
| 2.4.2.2 Glutathion-S-transferasa | 32 |
| 2.4.2.3 Sulfottransferasa..... | 32 |
| 2.4.3 Potenciální chemopreventivní a terapeutický účinek flavonoidů | 33 |
| 3. CÍL PRÁCE..... | 35 |
| 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 36 |
| 4.1 MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ..... | 36 |
| 4.1.1 Použitý materiál | 36 |
| 4.1.2 Připravované roztoky a pufrы..... | 37 |

| | |
|---|----|
| 4.1.3 Pomůcky a přístroje | 39 |
| 4.2 METODY..... | 40 |
| 4.2.2 Inkubace vzorků neznámé reductasy s oracinem pro stanovení redukční aktivity | 41 |
| 4.2.2.1 Inkubace vzorků pro stanovení enzymatické aktivity vůči oracinu. 41 | |
| 4.2.2.2 Zastavení inkubace a extrakce DHO..... | 41 |
| 4.2.2.3 Přehled účinku potenciálních inhibitorů na aktivitu nové mikrosomální karbonyl reductasy..... | 41 |
| 4.2.2.4 Stanovení IC ₅₀ vybraných inhibitorů | 42 |
| 4.2.3 Achirální analýza na HPLC | 42 |
| 4.2.3.1 Mobilní fáze | 42 |
| 4.2.3.2 Příprava vzorků k analýze..... | 43 |
| 4.2.3.3 Samotná achirální analýza | 43 |
| 4.2.4 Výpočet inhibiční konstanty IC ₅₀ | 43 |
| 4.2.5 Inkubace vzorků mikrosomů s oracinem pro stanovení enzymové stereospecifity | 43 |
| 4.2.5.1 Samotná inkubace mikrosomů s roztoky inhibitorů | 43 |
| 4.2.5.2 Zastavení inkubace a extrakce DHO..... | 44 |
| 4.2.6 Chirální analýza na HPLC | 44 |
| 4.2.6.1 Mobilní fáze | 44 |
| 4.2.6.2 Příprava vzorků k analýze..... | 44 |
| 4.2.6.3 Samotná chirální analýza | 45 |
| 5. VÝSLEDKY | 46 |
| 6. DISKUSE | 56 |
| 7. ZÁVĚR..... | 60 |
| 8. ZKRATKY | 61 |
| 9. LITERATURA | 62 |
| 10. PŘÍLOHY | 69 |

1. ÚVOD

Rakovina je druhou nejčastější příčinou úmrtí u dospělých hned po onemocnění srdce a cév a u dětí hned po úrazech. Je to onemocnění, při kterém dochází k nekontrolovatelnému růstu buněk. Velký důraz se klade na včasné zjištění onemocnění a následně na účinnou léčbu. S každým novým léčivem proto vyvstávají otázky možností ovlivnění jeho metabolismu. Proto je důležité hledat různé enzymy ovlivňující dané léčivo a následně zjistit i možnosti ovlivnění daného enzymu látkami např. běžně přítomnými v potravě. V poslední době se stále důležitějšími enzymy, které hrají roli v těchto onemocněních, stávají redukční enzymy, a proto jsou v popředí zájmu zkoumání.

2. TEORETICKÁ ČÁST

Enzymy jsou jednoduché či složené bílkoviny, které katalyzují chemické přeměny v živých organismech. Enzymy určují povahu i rychlost chemických reakcí a vytvářejí tak v živých organismech harmonickou souhru chemických funkcí. Aktivita enzymů, spočívající v ovlivnění rychlosti chemických reakcí snižováním jejich aktivační energie, je závislá zejména na koncentraci substrátu, teplotě, pH, aktivátorech a inhibítorech (Internet4).

2.1 INHIBICE ENZYMŮ

Aktivitu enzymů lze snížit případně zcela zničit destrukcí drastickými fyzikálními a chemickými faktory, které rozruší strukturu a vazby uvnitř proteinové molekuly, jako jsou var, silné hydroxidy a kyseliny, organická rozpouštědla, detergenty a koncentrované roztoky močoviny a guanidinu. Taková rozrušení struktury však k inhibici v užším slova smyslu nepočítáme. Stejně tak k inhibici neřadíme vliv těžkých kovů a jodoacetamidu, které se váží na SH-skupiny cysteinových zbytků a obsazují je, ani efekt diisopropylfluorofosfátu, který blokuje na povrchu enzymu nevratně a nespecificky OH-skupiny serinu. Faktory uvedené v tomto odstavci nejsou faktory biologickými a za normálních okolností nemají k enzymům žijícího organismu přístup.

Jako skutečný inhibitor označujeme látku, která snižuje aktivitu enzymu, aniž by jej destrukovala. Enzymy jsou specificky inhibovány mnohými molekulami, což představuje jednu z cest regulace metabolismu (Ledvina a kol. 2006).

Jednou z charakteristik inhibitorů je poloviční inhibiční koncentrace (IC_{50}), tj. koncentrace inhibitoru, při které za daných podmínek dochází k 50 % poklesu aktivity sledovaného enzymu.

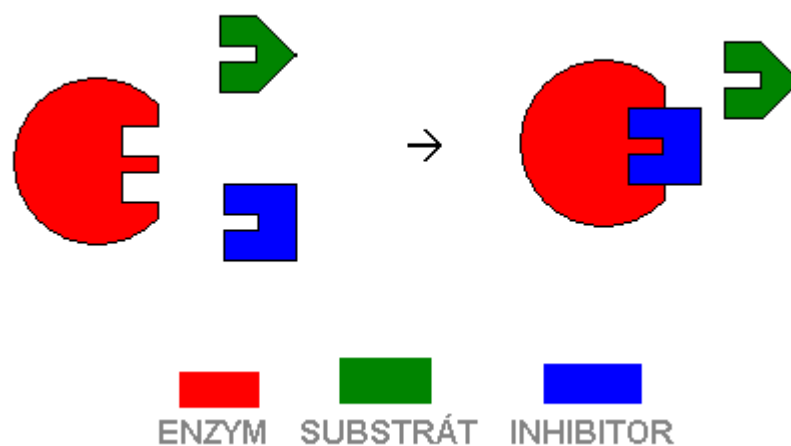
Specifické inhibice mohou být reverzibilní, nebo ireverzibilní. Rozdíl spočívá v síle vazby inhibitoru (I) na enzym (E) za vytvoření komplexu IE. Rozeznává se několik typů inhibice a jejich charakter se dá zjistit studiem kinetiky (Ledvina a kol. 2006).

2.1.1 Kompetitivní inhibice

Při tomto typu inhibice se substrát S a inhibitor I váží na stejné místo, tj. na aktivní místo, a o ně soutěží. Kompetitivní inhibitor se sice v závislosti na své koncentraci naváže na aktivní místo enzymu, ale není schopen se přeměnit na produkt.

Rozsah inhibice závisí na poměru koncentrací [S] a [I]. Čím více je molekul kompetitivního inhibitoru, tím větší je zábrana pro přístup přirozeného substrátu. To musí zpomalovat tvorbu produktu. V úvahu je třeba brát také afinitu substrátu a inhibitoru k danému enzymu.

Kompetitivní inhibice je reverzibilní. Lze ji prakticky úplně odstranit, jestliže koncentrace přirozeného substrátu silně vzroste. Pak už se inhibitor jako soutěžní partner neuplatní, nenajde prakticky žádné volné místo pro vazbu na molekule enzymu. Kompetitivní inhibitory jsou látky chemicky příbuzné přirozenému substrátu. Jen takové sloučeniny mají schopnost vázat se do aktivního místa. Jde často o členy téže homologické řady. Pak ovšem každý z inhibitorů vytváří komplex EI s jinou afinitou. Kompetitivní inhibitory se používají při výzkumu podstaty aktivního místa a v léčebné praxi může „nepřirozený“ analog substrátu blokovat účinek specifického enzymu. Například léčivo methotrexát je chemicky podobné kyselině dihydrolistové (dihydrofolátu) nutné pro syntézu tymidinu, a tím i DNA. Výsledkem podání methotrexátu je zástava růstu rychle se dělících rakovinných buněk (Ledvina a kol. 2006).



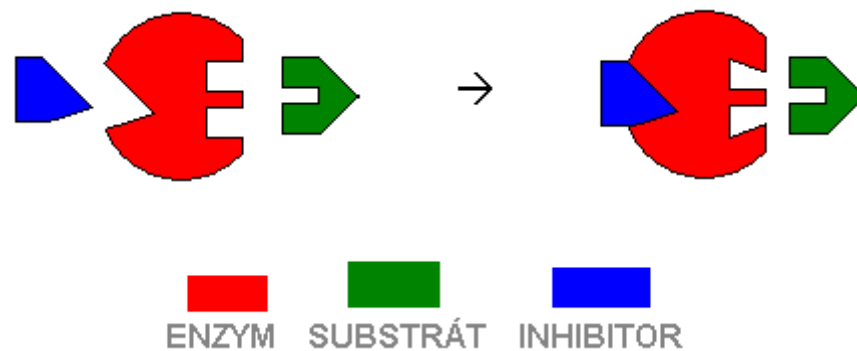
Obr. 1. Kompetitivní inhibice.

2.1.2 Nekompetitivní inhibice

Nekompetitivní inhibitor snižuje aktivitu enzymu tím, že „znetvoří“ jeho konformaci. Váže se na enzym na jiné místo, než je aktivní místo. Jestliže je vazba inhibitoru nekovalentní, je inhibice vratná (když se dodatečně sníží koncentrace

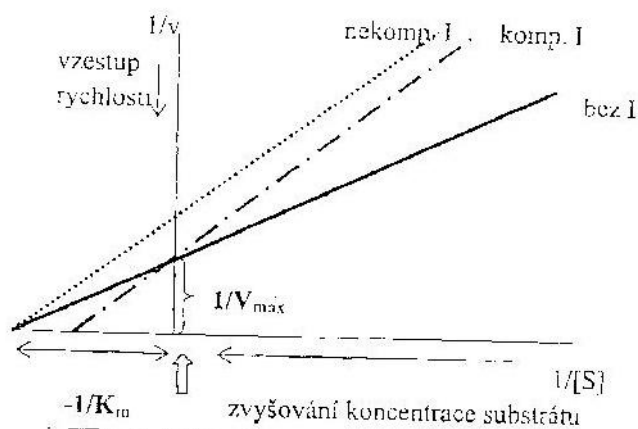
inhibitoru), ale při kovalentní vazbě je už inhibice nevratná, inhibitor nelze od enzymu odpoutat. Pak inhibitor vystupuje v úloze „enzymového jedu“.

Při nekompetitivní inhibici se na enzym váže současně substrát (do aktivního místa) i inhibitor, nenastává soutěž mezi substrátem a inhibitorem. Mírnou deformací molekuly v aktivním místě způsobenou vazbou inhibitoru se zpomalí tvorba produktu. Nekompetitivní inhibitor je obvykle látka, která se substrátem nemá žádnou podobnost. Tak např. na proteolytické enzymy působí látky z vaječného bílku a ze sojových bobů. Nevratně působí nervové jedy, jodacetamid a mnohé insekticidy.



Obr. 2. Nekompetitivní inhibice.

Všechny typy inhibice je možné rozeznat studiem kinetiky inhibovaného enzymu, a to podle křivek (přímek) závislosti koncentrace substrátu na rychlosti. Nejlépe se pro tento účel hodí dvojitě reciproké vynesení podle Lineweavera-Burka s užitím převrácených hodnot, tj. $1/v$ a $1/[S]$. Rozlišení kompetitivní inhibice od nekompetitivní ukazuje obr. 3.



Obr. 3. Vliv inhibitorů (I) na rychlost enzymové reakce (Ledvina a kol. 2006).

Při kompetitivní inhibici se mění hodnota K_m (zvyšuje se na zdánlivou K_m), protože tu je zábrana přístupu substrátu do aktivního místa. Naproti tomu velmi vysoké hodnoty koncentrace substrátu prakticky efekt inhibitoru eliminují, na ose y se přímka neinhibované a inhibované reakce protínají v jednom bodě.

Nekompetitivní inhibice poskytuje jiný obraz. Hodnota K_m zůstává beze změny bez ohledu na přítomnost inhibitoru (důkaz, že přístup substrátu do aktivního místa není omezen), avšak rychlost reakce je nižší za jakýchkoliv koncentrací substrátu, inhibici nelze nadbytkem substrátu odstranit.

Jsou prokázány také případy smíšené inhibice, která vykazuje současně prvky kompetitivní a nekompetitivní inhibice (Ledvina a kol. 2006).

2.1.3 Akompetitivní inhibice

Akompetitivní inhibice snižuje maximální rychlost i K_m , ale nemění jejich vzájemné poměry. Inhibice působí tím způsobem, že inhibitor se váže na komplex enzym - substrát a zabraňuje jeho přeměně na produkt a enzym (Internet2).

2.2 REDUKČNÍ ENZYMY

2.2.1 Redukční metabolismus

Až donedávna byly v popředí zájmu především oxidační reakce, v posledních letech se však pozornost obrací také k redukčnímu metabolismu. Oxidoreduktasy tvoří první třídu enzymů dle mezinárodní klasifikace enzymů (EC). Reduktasy jsou v rámci buňky většinou lokalizovány v cytosolu (rozpuštěné), v menší míře v mitochondriích a v membráně endoplasmatického retikula. Jako koenzymy vyžadují často NADPH či NADH. V metabolismu léčiva může mít redukční přeměna několik účinků, a to aktivační, deaktivující, toxikační nebo detoxikační (Wsól a kol. 2008).

Redukční přeměny xenobiotik zahrnují redukce karbonylových skupin, dvojných vazeb, N-oxidů, sulfoxidů, disulfidů, redukce aromatických nitro- a azo-sloučenin, redukční dehalogenaci, redukce hydroxámových kyselin. Některé redukční reakce v anaerobním prostředí jsou katalyzovány cytochromem P450. Ačkoliv je to enzym, který je součástí mikrosomálních monooxygenas, bylo zjištěno, že katalyzuje i redukční reakce jako např. redukci chloramfenikolu nebo p-nitrobenzoové kyseliny. Některé reduktasy katalyzují přeměny produktů, které vznikly jinými enzymy 1. fáze metabolismu (Kvasničková a kol. 1995).

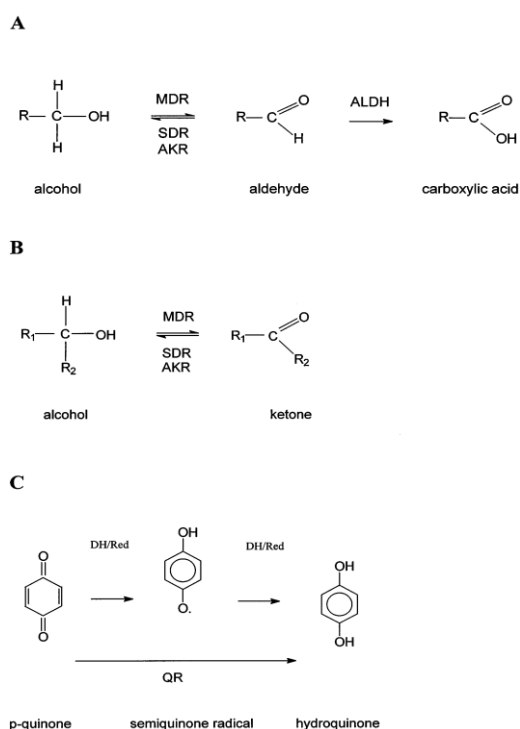
2.2.2 Zařazení reduktas v rámci metabolismu xenobiotik

Metabolismus xenobiotik je běžně rozdělován do tří fází. Při reakcích 1. fáze vzniká metabolit s vhodnou funkční skupinou a spadají sem reakce oxidační, redukční a hydrolytické. Reakce 2. fáze jsou reakce syntetické s endogenní sloučeninou za vzniku konjugátu. Třetí fáze zahrnuje transport substrátu a produktu přes cytoplasmatickou membránu.

Xenobiotika mohou být metabolizována mnoha způsoby. Mezi reakce I. fáze patří oxidace, redukce, hydrolýza, hydratace. Tyto pochody mohou ovlivňovat farmakologickou či toxikologickou aktivitu léčiva a proto jsou tyto reakce v popředí zájmu vědy (Skálová a kol. 2008).

2.2.3 Redukce karbonylové skupiny

V organismu probíhají redukční přeměny eobiotik i xenobiotik. Mezi redukční přeměny endogenních látek (eobiotik) patří zejména přeměny prostaglandinů, steroidů, jantarové kyseliny (meziprodukt metabolismu neurotransmiteru GABA), glukózy a produktů lipidové peroxidace (Barski a kol. 2009). Karbonylové redukci mohou podléhat aldehydy, ketony a chinony (viz Obr. 4). Vznikající alkohol je poté lehce konjugován a eliminován z organismu (Hoffman a Maser 2007).



Obr. 4. Metabolické přeměny sloučenin obsahující karbonylovou skupinu. A) Aldehydy jsou oxidovány na karboxylové kyseliny, což je realizováno pomocí aldehyddehydrogenas (ALDH), nebo jsou redukovány na primární alkoholy pomocí aldehydreduktas (patřících do SDR nebo AKR nadrodiny). Alkoholdehydrogenasy katalyzují reversní reakce (většinou enzymy z MDR nadrodiny, ale i z SDR nadrodiny). B) Reversibilní přeměna mezi ketony a sekundárními alkoholy je dosažena pomocí enzymů patřících do SDR, AKR a MDR nadrodiny. C) Stupňovitá jednoelektronová redukce chinonů různými reduktasami (DH/Red) vede k semichinonovému radikálu a poté k hydrochinonu. Dvouelektronová redukce vede rovnou k hydrochinonu bez meziproduktu semichinonu. Tuto reakci katalyzuje chinonreduktasa (QR) (Oppermann a Maser 2000).

Redukce karbonylové skupiny je významnou biotransformační přeměnou mnoha léčiv a hraje také významnou roli při deaktivaci některých farmakologicky významných substancí (Wsól a kol. 2008). Karbonylová skupina může ovlivnit terapeutickou účinnost, prodloužení farmakodynamického efektu nebo může být samotná aktivita léčiva zapříčiněná redukcí karbonylové skupiny. Z hlediska toxicity hraje redukce karbonylové skupiny důležitou roli v toxicitě léčiv doxorubicinu a daunorubicinu.

Redukci karbonylových sloučenin se nedostávalo takové pozornosti jako oxidačnímu systému cytochromu P450. Díky rozvoji molekulární biologie zabývající se redukcí karbonylových sloučenin, bylo identifikováno a charakterizováno několik karbonyl redukujících enzymů, včetně pluripotentních hydroxysteroiddehydrogenas (HSDs), které zahrnují kromě metabolismu xenobiotik s karbonylovou skupinou také katalýzu oxidoredukčních reakcí fyziologických steroidních substrátů.

Enzymy katalyzující redukci sloučenin s karbonylovou skupinou se vyskytují všude v přírodě, nejsou přítomny jen v organismech savců, ale i v rostlinách, bakteriích, kvasinkách, rybách a hmyzu. Tyto enzymy jsou důkladněji prozkoumány u savců, např. králíků, myší, opic, kuřat, prasat, psů a skotu.

Lidské karbonylreduktasy se vyskytují v mnoha rozdílných tkáních, jako jsou játra, plíce, srdce, ledviny, mozek, vaječníky a nadledviny a projevují širokou substrátovou specifitu jak pro xenobiotické aldehydy a ketony, tak pro fyziologické karbonylové sloučeniny, jako jsou biogenní aldehydy, prostaglandiny a steroidní hormony (Hoffman a Maser 2007).

Vědecká společnost vytvořila názvosloví pro enzymy, které je tvořeno tzv. EC číslem. Číslo EC (z anglického Enzyme Commission number) je numerické klasifikační schéma pro enzymy založené na chemických reakcích, které katalyzují. Kód každého enzymu je složen z písmen "EC" následovaných čtyřmi čísly oddělenými tečkami. Tato čísla reprezentují progresivně přesnější klasifikaci enzymu (Internet6). EC 1. je označení pro oxidoreduktasy. EC 1.1. označuje působení na CH-OH skupině (donor) (Internet7). EC 1.1.1. označuje přítomnost NAD nebo NADP (akceptor). A čtvrté číslo již označuje určitý enzym např. EC 1.1.1.1. je alkoholdehydrogenasa (Internet8).

Nyní se enzymy redukující karbonyl dělí do tří proteinových nadrodin. Jsou to dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR), dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) a aldoketoreduktasy (AKR) (Hoffman a Maser 2007).

2.2.3.1 Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)

MDR zahrnují cca 11000 enzymů rozdělených do 8 rodin na základě podobnosti sekvence. Mezi nejdůležitější rodiny patří alkoholdehydrogenasy, cinnamoldehydrogenasy, AcCoA reduktasy, threonindehydrogenasy, polyoldehydrogenasy a chinonoxidoreduktasy (Persson a kol. 2008).

2.2.3.2 Aldo-keto reduktasy (AKR)

AKR nadrodina zahrnuje enzymy, které se podílejí na biosyntéze, metabolismu a detoxifikačních reakcích v organismu (Barski a kol. 2009). AKR představuje NADP(H)-dependentní oxidoreduktasy. Tato proteinová nadrodina zahrnuje mimo jiné aldosoreduktasy (EC 1.1.1.21), aldehydreduktasy (EC 1.1.1.2) a některé HSDs (EC 1.1.1.x), z nichž některé byly dříve nazývány dihydrodioldehydrogenasy (EC 1.3.1.20). Tyto enzymy jsou monomerní proteiny obsahující $(\alpha/\beta)_8$ -soudek, mají okolo 320 aminokyselin a nemají Rossmannův záhyb. Aktivní místo enzymů AKR nadrodiny obsahuje konzervativní tetradu aminokyselin tyrosinu, histidinu, asparaginu a lysinu. Nacházejí se téměř v každém žijícím organismu. AKR enzymy se podílejí na metabolismu steroidů, cukrů, prostaglandinů, polycyklických aromatických uhlovodíků a velkého množství nesteroidních aldehydů a ketonů (Hoffman a Maser 2007).

Široká substrátová specifita AKR proteinů byla provázána nejasnostmi a velkým počtem synonym, proto byl ustanoven nový názvoslovný systém pro AKR proteinovou nadrodinu. Členové AKR nadrodiny se dělí na základě aminokyselinové sekvence do 15 rodin: AKR1 - AKR15. Savčí AKR jsou převážně zařazeny v AKR1 a AKR7, zatímco členové rodin AKR2 - AKR5 a AKR8 - AKR15 jsou součástí rostlin, kvasinek a bakterií. AKR6 rodina tvoří β -podjednotku napětově řízených draslíkových kanálů. Řada savčích AKR enzymů může být potenciálním terapeutickým cílem a na základě jejich struktury mohou být navržena léčiva s požadovanou specifitou a klinickou účinností (Hoffman, 2007). U člověka se nachází 15 enzymů z AKR nadrodiny (viz Tab. 1) (Internet5).

Tab. 1. Zástupci AKR nadrodiny, které se vyskytují u člověka.

| AKR | Enzym | Výskyt |
|------|--|---------------------|
| 1A1 | Aldehydreduktasa | Játra |
| 1B1 | Aldosoreduktasa | Placenta |
| 1B10 | Aldosareduktasa tenkého střeva | Tenké střevo, játra |
| 1B15 | Protein příbuzný aldosareduktase | |
| 1C1 | 20 α -HSD | Játra |
| 1C2 | 3 α -HSD typ 3 | Játra |
| 1C3 | 3 α -HSD typ 2, 17 β -HSD typ 5 | Játra |
| 1C4 | 3 α -HSD typ 1 | Játra |
| 1D1 | D4-3-ketosteroid-5 β -reduktasa | Játra |
| 1E2 | Protein charakteristický pro tkáň varlat | Varlata |
| 6A3 | β -podjednotka napěťově řízených draslíkových kanálů | |
| 6A5 | β -podjednotka napěťově řízených draslíkových kanálů | |
| 6A9 | β -podjednotka napěťově řízených draslíkových kanálů | |
| 7A2 | Aflatoxinaldehydreduktasa | Játra |
| 7A3 | Aflatoxinaldehydreduktasa | Játra |

2.2.3.3 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)

SDR představují jednu z nejrozsáhlejších enzymových nadrodin, která čítá přes 46000 členů. Z hlediska fylogenetického vývoje mají málo identických sekvencí. V lidském organismu bylo identifikováno přes 70 SDR genů. SDR se podílejí na metabolismu velkého množství sloučenin. Mezi ně patří např. steroidní hormony, prostaglandiny, retinoidy, lipidy a řada xenobiotik. SDR zahrnují nejstarší proteinové rodiny, které přispívají do nezbytných funkcí a interakcí všech forem života (Persson a kol. 2009).

Tyto enzymy se vyskytují jako rozpuštěné nebo v mnoha případech membránově vázané proteiny. Většinou jsou to homodimery nebo homotetramery.

Všechny SDR proteiny obsahují velmi konzervativní primární strukturní elementy, omezené jistými segmenty v sekvenci, které ukazují na aktivní místo, reakční mechanismus a oblast pro vazbu substrátu či kofaktoru. Analýza trojrozměrných struktur poukazuje na vazbu kofaktorů NAD(H) či NADP(H) na klasické $\beta\alpha\beta$ uskupení Rossmannova záhybu, což je charakteristické i pro mnoho dalších dehydrogenas. V závislosti na jejich převládající funkci dehydrogenasy nebo reduktasy, se používá jako koenzym buď NAD^+ nebo NADPH.

Jednou z nejdůležitějších fyziologických funkcí SDR enzymů se zdá být přeměna signálních molekul na aktivní nebo neaktivní formu (Hoffman a Maser 2007).

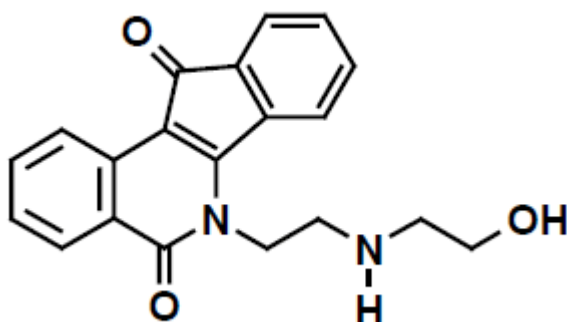
Mezi SDR proteiny patří např. 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typ 1 a typ 2 (Wsól a kol. 2008) a karbonylreduktasa 1, 3 a 4 (Persson a kol. 2009).

Tab. 2. Charakteristika jednotlivých nadrodin enzymů, které se podílejí na metabolismu karbonylových sloučenin (Oppermann a Maser 2000).

| Název nadrodiny | Funkce | Koenzym | Struktura | Aktivní místo |
|-----------------|---|-----------------|---|---|
| MDR | Alkoholová oxidace, chinonová redukce, endogenní dehydrogenasy/reduktasy | Většinou NAD(H) | Rossmannův záhyb, dvoudoménová struktura, závislá na Zn^{2+} | (Zn^{2+}), (většinou) His, Ser |
| AKR | Oxidace a redukce endogenních a exogenních karbonylových sloučenin, alkoholů a dvojně vazby C-C | NADP(H) | (α/β) ₈ -soudek, bez Rossmannova záhybu | Tyr, Asp, Lys, His, (Glu) |
| SDR | Oxidace a redukce endogenních a exogenních karbonylových sloučenin, lyasy a epimerasy | NAD(P)(H) | α/β záhyb, jednodoménový Rossmannův záhyb | Tyr, Lys, Ser |

2.3 ORACIN

Oracin, 6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5,11-dioxo-5,6-dihydro-11H-indeno[1,2-c]isochinolin, je potenciální cytostatické léčivo pro perorální užití. Jeho hlavní mechanismus působení je podobný jako u anthracyklinových cytostatik a spočívá v interkalaci do struktury DNA. Nicméně, široké spektrum nádorů, které jsou citlivé k oracinu, poukazuje na více mechanismů vedoucích k inhibici syntézy DNA a RNA a následnému snížení obsahu proteinů v nádorových buňkách. K těmto mechanismům patří inhibice topoizomerasy II (EC 5.99.1.3), stimulace aerobního využití glukózy, snížení obsahu laktátu v nádorových buňkách a indukce apoptózy (Wsól a kol. 2004).



Obr. 5. Molekula oracinu.

2.3.1 Protinádorové působení

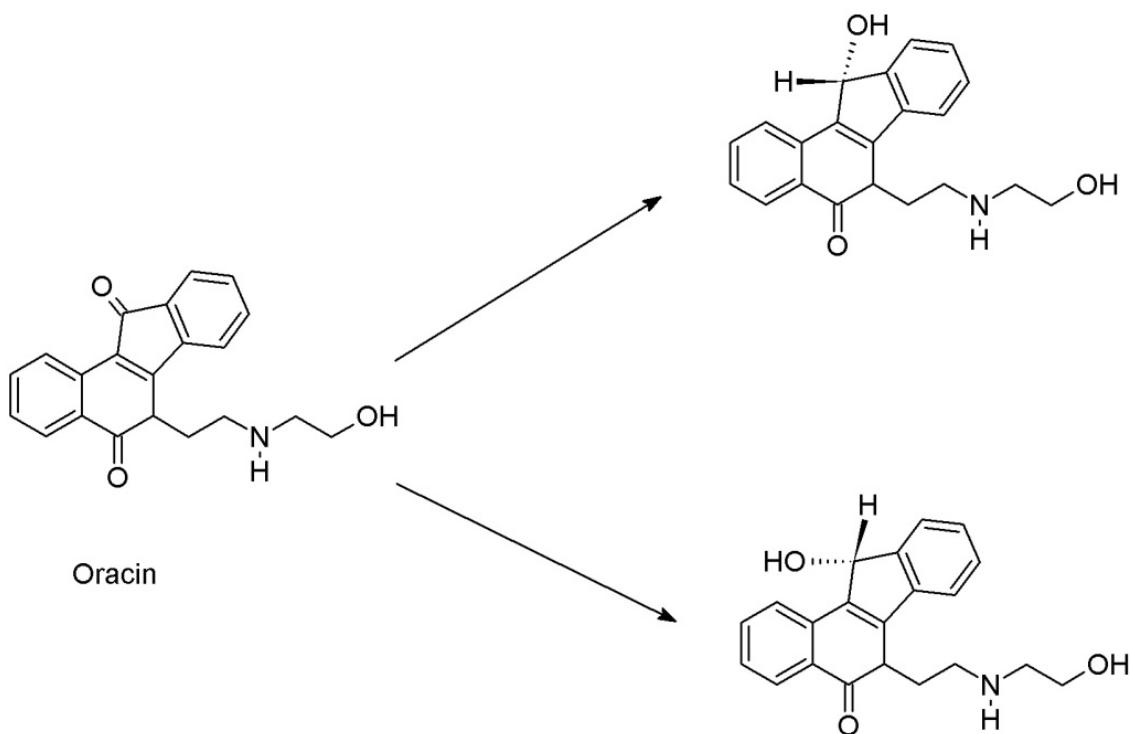
Protinádorové působení bylo studováno na myších a potkanech za použití deseti různých experimentálních nádorů při orálním i parenterálním užití. U šesti typů nádorů oracin prodlužoval průměrné přežití zvířat. V *in-vitro* experimentech bylo odhaleno přímé cytotoxické působení na pět druhů zvířecích nádorů. Tato studie byla provedena i s pěti lidskými nádory a u třech typů nádorů bylo prokázáno snížení nádorové tkáně.

Hlavní výhody tohoto nového cytostatika je možnost perorálního užití, kombinace různých mechanismů protinádorového působení, chybění kardiotoxicity, negativní výsledek Amesova testu mutagenicity, velmi nízká hepatotoxicita a příznivá farmakokinetika (Wsól a kol. 2004).

2.3.2 Biotransformace oracinu

Vzhledem k slibné biologické aktivitě a příznivé farmakokinetice byla biotransformace oracinu intenzivněji studována. Hlavním metabolitem oracinu je

11-dihydrooracin, 6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5-oxo-11-hydroxy-5,6-dihydro-11H-indeno[1,2-c]isochinolin (DHO). Tento chirální metabolit je formován redukcí na prochirální karbonylové skupině na pozici 11 molekuly oracinu.



Obr. 6. Metabolismus potenciálního protinádorového léčiva oracinu. Redukce na pozici 11 je hlavní detoxifikační drahou a dochází ke vzniku dvou enantiomerů 11-dihydrooracinu (Wsól a kol. 2004).

Biotransformace oracinu byla studována jak *in-vitro* tak *in-vivo* na různých druzích zvířat a v lidské jaterní tkáni. Bylo zjištěno, že DHO je stereospecificky formován jak v cytosolické tak i v mikrosomální frakci. Stereospecifita je ovlivněna pohlavím laboratorních zvířat (Wsól a kol. 2004).

V lidském jaterním cytosolu je oracin metabolizován enzymy z AKR1C nadrodiny. Purifikovaná AKR1C2 a AKR1C4 produkuje výhradně (+)-DHO enantiomer. AKR1C1 produkuje obě formy enantiomeru s převahou (+)-DHO (Škarydová a kol. 2009). AKR1C3 nebyla purifikována z lidských jater, ale její rekombinantní forma je také zapojená do metabolismu oracinu (Novotná a kol. 2008).

Na základě indukčních a inhibičních studií s mikrosomálními frakcemi bylo zjištěno, že 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typ 1 (11 β -HSD1) (EC 1.1.1.146) se

účastní karbonylové redukce oracinu v jaterní tkáni potkana. 11 β -HSD1 je mikrosomální enzym, který hraje fyziologickou roli v reversibilních oxidoredukčních reakcích glukokortikoidů. Je to multifunkční enzym, který katalyzuje také redukci nesteroidních karbonylových sloučenin, a proto je důležitý při detoxifikačních procesech xenobiotik. 11 β -HSD1 z lidských jater se také účastní karbonylové redukce oracinu v mikrosomech (Wsól a kol. 2004).

11 β -HSD1 je jediný dobře popsáný mikrosomální enzym, který se mimo metabolismu eobiotik účastní také metabolismu xenobiotik. Bylo zjištěno, že oracin je tímto purifikovaným enzymem metabolizován se stereospecifitou (+)-DHO/(-)DHO 24/76 zatímco lidské jaterní mikrosomy se podílí na biotrasformaci oracinu s odlišným poměrem (viz Tab. 3). Rozdíly ve stereospecifitě metabolitů oracinu mezi lidskými jaterními mikrosomy a purifikovanou lidskou 11 β -HSD1 vedly k purifikaci další mikrosomální karbonylreduktasy, která produkuje metabolity oracinu v poměru enantiomerů (+)-DHO/(-)-DHO 86/14. (Škarydová a kol. 2009).

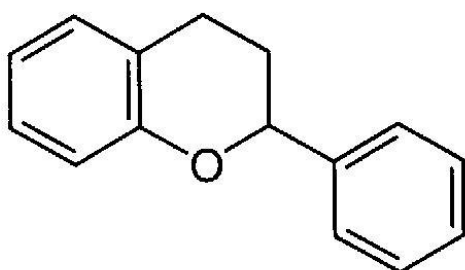
Tab. 3. Rozdíl ve stereospecifitě mikrosomálních karbonylreduktas a celé lidské jaterní mikrosomální frakce v metabolismu oracinu (Škarydová a kol. 2009).

| | (+)-DHO | (-)-DHO |
|--------------------------------|---------|---------|
| Lidské jaterní mikrosomy | 40 | 60 |
| 11 β -HSD1 | 24 | 76 |
| Purifikovaná neznámá reduktasa | 86 | 14 |

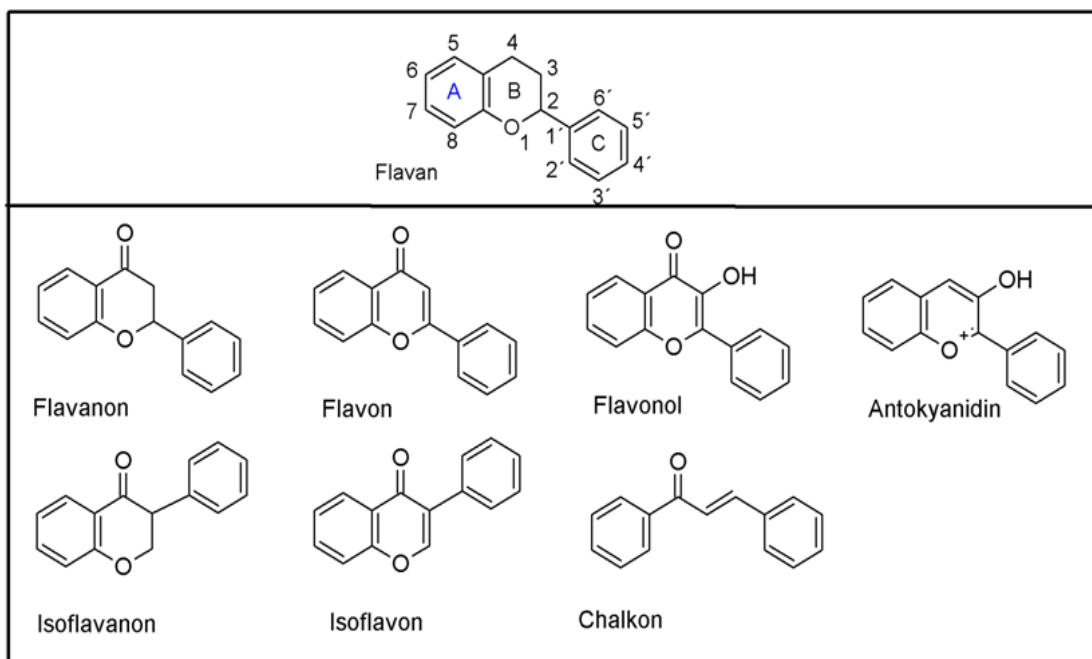
2.4 FLAVONOIDY

Flavonoidy jsou chemické sloučeniny patřící do rozsáhlé skupiny rostlinných fenolů. V současné době je známo okolo 8000 zástupců flavonoidních látek a stále se objevují nové (Internet1). Flavonoidy byly objeveny v roce 1930 Albertem Szent-Gyorgyim, laureátem Nobelovy ceny, jako sloučeniny s výraznou antioxidační aktivitou (Ferguson a kol. 2001). Základem je flavan (Obr. 7) skládající se ze dvou benzenových jader spojených pyranem. Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují v podobě O-glykosidů, jejich molekula se tady dá „rozdělit“ na cukernou a necukernou část

(aglykon). Flavonoidy dělíme podle základní struktury na sedm subkategorií (viz Obr. 8). Jejich antioxidační aktivita závisí na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule a také na jejich glykosylaci. Optimální vlastnosti byly nalezeny u flavonoidů s o-hydroxy skupinou v kruhu B, 2,3 dvojnou vazbu, 4-oxo funkční skupinu v kruhu C a 3 a 5 -OH skupiny na kruzích A a C. Tuto strukturu mají právě flavonoly, které se vyskytují v běžně konzumovaném ovoci, zelenině a dalších rostlinných produktech (citrusové plody, cibule, papája, brokolice, vinné hrozny, listová zelenina, čaj, čokoláda, sója, obilniny), a to zejména kvercetin a kemferol (Internet1).



Obr. 7. Struktura flavanu (Internet3).



Obr. 8. Rozdělení flavonoidů dle struktury.

Flavonoidy patří mezi významné antioxidanty. Zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, váží a inaktivují některé prooxidační ionty kovů (železo, měď) (Internet1). Jejich působení je základem prevence nemocí souvisejících s oxidativním poškozením membrán, proteinů a DNA (Ferguson a kol. 2001). Jedná se především o kardiovaskulární onemocnění, nádorová onemocnění a také záněty. Ukazuje se, že při terapii a prevenci zmíněných onemocnění je konzumace potravin obsahujících flavonoidy vhodnější než podávání samotných antioxidantů, jako je vitamin C a E (Internet1). V poslední době se v odborné literatuře objevují kromě jiných také epidemiologické studie vlivu konzumace kaka a čokolády na kardiovaskulární systém. Vyplývá z nich, že kakao a čokoláda zvyšují plazmatickou antioxidační kapacitu a redukují protrombogenní aktivitu (Internet1). Flavonoidy byly navrženy k užívání jako chemopreventivní doplněk při srdečních a jaterních onemocněních a také při onemocněních rakovinných. Antioxidační působení flavonoidů je prospěšné i při šedém zákalu a makulární degradaci (Sanderson a kol. 1999). Byl též popsán rozhodující efekt na regulační enzymy a receptory v organismu.

Mnohé flavonoidy jsou potenciálními inhibitory biosyntézy prostaglandinů (Hodek a kol. 2002). Flavonoidy mají inhibiční efekt na aktivitu mnoha enzymů: β -glucuronidasy, lipoxygenasy, cyklooxygenasy, oxidem dusnatým indukované syntasy, monooxygenasy, thyroïdperoxidasy, xanthinoxidasy, mitochondriální succinioxidasy a NADH-oxidasy, fosfodiesterasy, fosfolipasy A₂ a proteinkinasy (Moon a kol. 2005). Flavonoidy inhibují i účinek fosfodiesterasy, která zprostředkovává adhezi leukocytů v místě zranění. Flavonoidy inhibují i proteinkinasy, čímž je dosaženo protizánětlivého efektu (Hodek a kol. 2002). Flavony (chrysin, baicalein, galangin), flavanony (naringenin) a izoflavony (genistein, biochanin A) inhibují aktivitu aromatasy (CYP19). Tím klesá biosyntéza estrogenů a produkce antiestrogenních působků, důležitých při rakovině prsu a prostaty. Flavonoidy aktivují detoxifikační enzymy fáze II, UDP-glucoronyltransferasu a glutathion-S-transferasu, v čemž také spočívá protirakovinné působení. Řada flavonoidů včetně fisetinu, galanginu, kvercetinu, kaemferolu a genisteinu reprezentuje potenciální nekompetitivní inhibitor sulfotransferasy 1A1. Sulfotransferasa 1A1 hraje roli v sulfation-indukované karcinogenitě (Moon a kol. 2005).

Sloučeniny flavonoidní struktury byly označeny jako cytotoxické. Bylo identifikováno několik mechanismů působení flavonoidů, které hrají roli v cytotoxicitě.

Protinádorová aktivita několika flavonoidů (pinostrobin, kvercetin, myricetin, morin) je připisána inhibici topoisomerasy I a II (Hodek a kol. 2002). Flavonoidy zpomalují buněčnou proliferaci důsledkem vazby na estrogení receptory (Primiano a kol. 2001). Kompletní zástava růstu buněk při androgeně nezávislé rakovině prostaty byl pozorován při léčbě kaemferolem (Knowles a kol. 2000). Alternativním mechanismem účinku flavonoidů je spuštění apoptózy (Galati a kol. 2000).

Několik flavonoidů vykazuje antivirový a antibakteriální účinek. Kvercetin je účinným inhibitorem HIV1-proteasy a reverzní transkriptasy (Hodek a kol. 2002). Hesperidin předchází proniknutí rotaviru do buněk (Bae a kol. 2000). Experimenty potvrzují inhibici růstu působením myricetinu na *Burkholderia cepacia*, vankomycin-resistentních enterokoků a lékařsky důležitých mikroorganismů jako je *Klebsiella pneumoniae* a *Staphylococcus epidermis* (Xu a Lee 2001).

I když flavonoidy vykazují převážně prospěšnou aktivitu, existují i flavonoidy, u nichž byl zjištěn nepříznivý účinek. Proto vyvstává i otázka bezpečnosti flavonoidů (Walle a kol. 2001).

2.4.1 Vliv flavonoidů na enzymy I. fáze biotransformace

2.4.1.1 Flavonoidy a cytochrom P450

Cytochrom P450 monooxygenasový systém (CYP) je mnohofunkční oxidasový systém, který hraje klíčovou roli v metabolismu hydrofóbních endogenních sloučenin jako jsou steroly, prostaglandiny a mastné kyseliny a xenobiotik, kam patří např. léčiva, karcinogeny a imise (Nebert a Dieter 2000). Přestože CYP převážně vede k tomu, že zbavuje xenobiotika toxicity, existují i reakce, kdy se uvolňují volné radikály, které mohou být příčinou toxicity. Flavonoidy ovlivňují CYP třemi cestami:

- 1) flavonoidy indukují biosyntézu CYP,
- 2) flavonoidy ovlivňují enzymatickou aktivitu CYP
- 3) flavonoidy jsou metabolizovány CYP.

Pro porozumění metabolismu flavonoidů v organismu je důležité prozkoumat indukční efekt na CYP, vazbu na CYP a CYP-meziprodukty (Walle a kol. 2001).

Flavonoidy mohou měnit plazmatické koncentrace léčiv, což může vést k nadměrné dávce léčiva nebo ke ztrátě terapeutického účinku (Van der Weide a Stajjns 1999). Další zajímavostí je zahrnutí flavonoidů do procesu karcinogeneze. Flavonoidy

můžou zvýšit CYP zprostředkovanou karcinogenní aktivitu indukcí CYP. Metabolity flavonoidů se mohou kovalentně vázat na DNA a proteiny. Na druhou stranu inhibice CYP zprostředkované karcinogenní aktivity volných radikálů je prospěšná u řady flavonoidů (Hodek a kol. 2002).

- Interakce flavonoidů a léčiv

CYP3A4, převládající lidský jaterní a střevní cytochrom P450, je zodpovědný za metabolismus více než poloviny léčiv. Souběžné podávání flavonoidů a klinicky užívaných léčiv způsobuje mezi flavonoidy a léčivy interakce, které mohou vést ke změně farmakokinetiky, a to může vést ke zvýšení toxicity léčiv nebo ke snížení jejich terapeutického účinku v závislosti na struktuře flavonoidu (Tang a kol. 2001). Jak již bylo uvedeno metabolická aktivita CYP3A4 je stimulována vazbou efektoru (flavonoid) a substrátu (léčivo). Kromě dobře známého syntetického 7,8-benzoflavonu je ještě několik dalších flavonoidů, např. flavon a tangeretin, popsáno jako aktivátory enzymů. Existují také inhibitory CYP3A4 jako flavonolignan, sylimarin nebo hyperforin. Podobně naringenin, flavonoid obsažený v grepfruitovém džusu, projevuje inhibiční efekt na CYP3A4. Naringenin a bergamotin pak způsobují snížení jaterního metabolismu u některých léčiv Reprezentativní případ ovlivnění CYP3A4 zahrnuje flavon-dependentní stimulaci metabolismu zoxazolaminu a inhibice metabolismu felodipinu (Hodek a kol. 2002).

- Metabolismus flavonoidů a jejich genotoxicita

Metabolismus flavonoidů v lidském organismu stejně jako u experimentálních zvířat, který zahrnuje enzymy první i druhé fáze, je komplexní a ne zcela jasný. Flavonoidy z ovoce a zeleniny přijaté s potravou jsou prvně metabolizovány ve střevě pomocí střevní mikroflóry. Zde jsou flavonoidní glykosidy často rozštěpeny na volné flavonoidy (aglykony). Glykosidy i aglykony jsou absorbovány (Hollman a Katan 1997). Druhým důležitým místem transformace flavonoidů jsou játra. Tato tkáň je bohatá na enzymy první a druhé fáze. Flavonoidy jsou postupně hydroxylovány a/nebo O-demetylovány cytochromem P450 a pak jsou podrobeny konjugaci katalyzovanou enzymy druhé fáze (Rice-Evans 2001). Degradční produkty flavonoidů se vyskytují hlavně ve střevě. Rozštěpení flavonoidů má za následek degradační produkty, různé

fenolické kyseliny, které ještě vykazují aktivitu vychytávačů volných radikálů. Tyto metabolity jsou absorbovány a následně detekovány v moči (Hodek a kol. 2002).

U flavonoidů je udáván i negativní účinek, jako je mutagenicita a lipidová peroxidace (Sahu a Gray 1994). Mutagenicita flavonoidů se zdá být závislá na počtu a pozicích hydroxylových skupin v kruhu B. Hydroxylační reakce zprostředkované CYP mohou zvyšovat genotoxicitu u výsledných produktů. Genotoxicita je předpokládána u sloučenin, které obsahují volnou hydroxylovou skupinu na pozici 3 kruhu C, pozici 7 kruhu A a obsahující strukturu pyrogallolu nebo katecholu v kruhu B (Silva a kol. 2000).

- Flavonoidy jako inhibitory aromatasy

Některé flavonoidy jsou podle svojí struktury řazeny k fytoestrogenům. V organismu vykazují estrogení nebo antiestrogení aktivitu. Tyto flavonoidy jsou schopné, tak jako přirozené estrogény, navázat se na estrogení receptor a ovlivnit jeho aktivitu. Proto flavonoidy působí jako prevence osteoporózy a ostatních menopauzálních symptomů. Flavonoidy mající antiestrogení efekt vykazují protirakovinovou aktivitu, hlavně v tkáních, které jsou vystaveny působení pohlavních hormonů. Proto jsou flavonoidy jako inhibitory steroidních enzymů a modulátory estrogeních receptorů důkladněji studovány pro využití v prevenci a léčbě některých typů rakoviny nebo menopauzálních symptomů.

CYP19, aromatasa, je dalším členem nadrodiny enzymů cytochromu P450, který je inhibován flavonoidy. Tento enzym katalyzuje jedinečnou reakci, aromatizaci kruhu A mužských pohlavních hormonů. Třemi následujícími oxidačními reakcemi aromatasa přemění C19-androgeny, androstendion a testosteron na C18-estrogeny, estron a estradiol. Aromatasa byla detekována v membráně endoplazmatického retikula vaječníků, prostaty, varlat, placenty a prsní tkáně a v daleko menším množství v mozku, kostech, pokožce a tukových buňkách. Protože estrogény jsou známé jako buněčné proliferátory a jejich metabolity jsou karcinogenní, proto bývá exprese aromatasy spojována s nádorovou iniciací a progresí. Aromatasa je atraktivním cílem pro selektivní inhibici biosyntézy estrogenů a zároveň by to nemělo zasahovat do produkce ostatních steroidů. Mezi flavonoidy s inhibiční aktivitou na aromatasu patří např. 3-hydroxyflavon, 5-hydroxyflavon, 7-hydroxyflavon, apigenin, luteolin, kvercetin a 4-hydroxyflavanon (Hodek a kol. 2002).

2.4.1.2 Inhibiční účinek flavonoidů na některé enzymy ze skupiny karbonylreduktas

- AKR1C1

AKR1C1 je cytosolický enzym, který hraje důležitou roli v metabolismu progesteronu. Progesteron je nezbytný pro podporu těhotenství. Působením AKR1C1 je přeměňován na neaktivní progestin (20 α -hydroxyprogesteron). S AKR1C1 je spojený předčasný porod vedoucí k dětské nemocnosti a úmrtnosti. Zvýšená aktivita AKR1C1 v endometriu a v prsní tkáni vede k převaze proliferačně působících estrogenů, k rozvoji endometriosisy nebo nádoru endometria či nádoru prsu. AKR1C1 hraje také důležitou roli v mozkové činnosti. Ovlivňuje obsazení GABA_A (γ -aminomáselná kyselina) receptorů. AKR1C1 redukuje neuroaktivní steroidy (3 α ,5 α -tetrahydroprogesteron a 5 α -tetrahydrodeoxykortikosteron) a jejich prekurzorů (5 α -dihydroprogesteron a progesteron) na neaktivní 20 α -hydroxysteroidy. Eliminace neuroaktivních steroidů pomocí AKR1C1 souvisí s premenstruačním syndromem a s dalšími neurologickými poruchami (Dhagat a kol. 2007).

7-hydroxyflavon, naringenin, 3,7-dihydroxyflavon, kaempferol, genistein a biochanin A jsou nejsilnějšími inhibitory AKR1C1 ze skupiny flavonoidů s hodnotami IC₅₀ okolo 20 μ M. 5-hydroxyflavon, tamoxifen a flavanon nevykazují inhibiční efekt na AKR1C1 (Brožič a kol. 2006).

- AKR1C3

Cytosolická AKR1C3 přeměňuje neúčinný androgen androstendion na účinný androgen testosteron a také neúčinný estrogen estron na účinný estrogen 17 β -estradiol. Tím reprezentuje zajímavý terapeutický cíl při léčbě hormon-dependentních forem rakoviny, jako je rakovina prostaty, prsu a endometria (Brožič a kol. 2006). Velmi účinnými inhibitory jsou indomethacin, N-(4-chlorobenzoyl)-melatonin a flufenamová kyselina ze skupiny nesteroidních antiflogistik (Byrns a Penning 2009).

Byla popsána také řada inhibitorů ze skupiny flavonoidů a příbuzných fenolických látek. Nesubstituovaná skořicová kyselina (IC₅₀ je 50 μ M) je inhibitorem AKR1C3, stejně tak jako 3,4,5-trimethoxyskořicová kyselina (IC₅₀ je 49 μ M) a 3-trifluoromethylskořicová kyselina (IC₅₀ je 43 μ M). Nejlepším inhibitorem ze skupiny derivátů kyseliny skořicové je α -methylskořicová kyselina (IC₅₀ je 6,4 μ M). Kávová

kyselina (inhibice byla 18%) a m-kumarová kyselina (inhibice byla 34%) byly označeny jako slabé inhibitory (Brožič a kol. 2006).

2'-hydroxyflavanon byl označen jako velmi silný inhibitor. Pro IC_{50} byla zjištěna hodnota 0,3 μM a navíc byla prokázána selektivita v rámci podrodiny AKR1C (Škarydová a kol. 2009).

Účinnými inhibitory AKR1C3 byly shledány také kumestrol (IC_{50} je 5 μM), zearalenon (IC_{50} je 4 μM), flavon kvercetin (IC_{50} je 9 μM) a isoflavon biochanin A (IC_{50} je 14 μM) (Krazeisen a kol. 2001).

- AKR1B10

AKR1B10 se účastní regulačních mechanismů při nádorech plic, jater, jícnu, dělohy a při kolorektálním karcinomu. To poukazuje na jeho potenciální roli jako nádorového markeru. Tento enzym je cílem pro prevenci a léčbu výše uvedených typů nádorů skrz jeho možné inhibitory.

Mezi jeho inhibitory patří myricetin (IC_{50} je 6,8 μM), genistein (IC_{50} je 5,5 μM), chrysin (IC_{50} je 2,1 μM) a kvercetin (IC_{50} je 1,9 μM) (Endo a kol. 2010).

- AKR1B1

AKR1B1 patří do AKR nadrodiny. Byl identifikován jako marker u některých typů rakoviny. AKR1B1 metabolizuje glukosu na sorbitol a podílí se také na chronických komplikacích diabetu jako je retinopatie, nefropatie a neuropatie.

Mezi jeho inhibitory patří myricetin (IC_{50} je 0,61 μM), genistein (IC_{50} je 0,55 μM), chrysin (IC_{50} je 0,29 μM) a kvercetin (IC_{50} je 0,23 μM) (Endo a kol. 2010).

- 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typ 1

Cytosolická 17 β -HSD typ 1 se vyskytuje ve vaječnících, placentě, prsní tkáni, prostatě, lymfocytech, kostech a endometriu. Ve vaječnících zprostředkovává produkci estradiolu a v periférních tkáních reguluje jeho místní hladinu (Brožič a kol. 2008). 17 β -HSD typ 1 se podílí na transformaci estronu na estradiol a hraje tedy klíčovou roli v estrogen-dependetních onemocnění jako je nádorové onemocnění prsu (Poirier 2010).

Kumestrol se ukázal jako nejsilnější inhibitor 17 β -HSD typ 1 s hodnotou IC_{50} 0,2 μM . Mezi slabé inhibitory patří 4,4'-dihydroxybifenyl, genistein, β -sitosterol a β -sitostanol (Poirier 2003). Dalšími inhibitory jsou apigenin (IC_{50} je 0,71 μM), kemferol

(IC₅₀ je 1,05 μM), genistein (IC₅₀ je 2,21 μM), naringenin (IC₅₀ je 4,96 μM) a 7-hydroxyflavon (IC₅₀ je 5,25 μM) (Schuster a kol. 2008).

- 17β-hydroxysteroiddehydrogenasa typ 3

Mikrosomální 17β-HSD typ 3, nazývaná též testikulární 17β-HSD, transformuje C19 steroid 5-androsten-3β,17β-diol na testosteron. Inhibice tohoto enzymu představuje zajímavý cíl pro blokadu biosyntézy testosteronu, což může mít efekt u androgen-dependetních onemocnění.

Inhibiční účinek na tento enzym vykazuje 18β-glycyrretinová kyselina, kde byly naměřeny hodnoty IC₅₀ 4 μM a dále flavonoidy 7-hydroxyflavon (IC₅₀ je 9 μM) a biochanin A (IC₅₀ je 10,8 μM) (Poirier 2003).

- 17β-hydroxysteroiddehydrogenasa typ 7

Mikrosomální 17β-HSD typ 7 se podílí na redukci estronu na estradiol a dihydrotestosteronu na 3β-diol (Poirier 2003). Byla také popsána jeho účast v syntéze cholesterolu (Nagasaki a kol. 2009, Lukacik a kol. 2006).

U tohoto enzymu nebyly zatím prokázány žádné silné inhibitory ze skupiny flavonoidů (Poirier 2003).

- 11β-hydroxysteroiddehydrogenasa typ 1

11β-HSD typ 1 je mikrosomální enzym, který hraje fyziologickou roli v redukci inaktivního glukokortikoidu kortisonu na aktivní kortisol. Kromě toho se ukazuje, že je to multifunkční enzym, který katalyzuje redukci nesteroidních karbonylových sloučenin a detoxifikaci různých xenobiotik, aldehydů a ketonů (Wsól a kol. 2004). Nadměrná exprese 11β-HSD typ 1 má souvislost s centrální obezitou a metabolickým syndromem. Inhibitory 11β-HSD typ 1 by mohli mít pozitivní efekt při léčbě viscerální obezity a diabetu 2. typu. Významným inhibitorem 11β-HSD typ 1 je kyselina 18β-glycyrretinová (IC₅₀ je 1,57 μM). Inhibitory ze skupiny flavonoidů jsou flavanon (IC₅₀ je 18 μM), 4'-hydroxyflavanon (IC₅₀ je 34 μM) a 2'-hydroxyflavanon (IC₅₀ je 10 μM) (Schweizer a kol. 2003).

- Karbonylreduktasa 1 (CBR1)

Lidská CBR1 hraje důležitou roli v metabolismu steroidů, prostaglandinů, chinonů a xenobiotik, při syntéze tetrahydrobiopterinu, neuroprotekcí, protekcí rakoviny plic související s tabákovým kouřem, chemoterapeutické rezistenci a detoxikaci insekticidních látek. Je tedy přítomna v mnoha biologických procesech a proto se dostává do stále většího zájmu vědy (Laštovková 2008). Enzymová aktivita CBR1 může být inhibována celou řadou rozmanitých látek jako je indometacin, furosemid, etakrynová kyselina atd. (Hoffman a Maser 2007).

Mezi inhibitory CBR1 ze skupiny flavonoidů patří rutin (IC_{50} je 2,1 μM), kvercitrin (IC_{50} je 6,5 μM) a kvercetin (IC_{50} je 6,2 μM) (Carlquist a kol. 2008).

2.4.1.3 Vliv flavonoidů na chinonreduktasu

Chinonreduktasa (QR) katalyzuje dvouelektronovou redukci chinonů na hydrochinon a předchází tak vzniku radikálu semichinonu a vzniku redoxnímu cyklu chinonů, jež má za následek vznik volných kyslíkových radikálů. Z toho vyplývá, že indukce QR flavonoidy může být spojena s chemoprevencí rakovinného bujení.

Chalkon (+)-tephropurpurin z rostliny *Tephrosia purpurea* je potenciálním induktorem QR. Flavonoidy obsažené v chmelu (prenylchalkony a prenylflavanony) mohou indukovat QR v buněčné linii Hepalclc7 zatímco flavanon naringenin byl neúčinný při indukcí QR. Chalkony obsažené v chmelu xanthohumol a dehydrocykloxanthohumolhydrát indukují aktivitu QR. V potravě zastoupený morin zvyšuje aktivitu QR v játrech, střevě a jazyku. Flavonoid pinostrobin obsažený v medu a v thajském zázvoru reprezentuje potenciální induktor QR u savců. Silymarin významně zvyšuje aktivitu QR v jaterní a střevní tkáních krys. Genistein zvyšuje aktivitu QR, což bylo pozorováno u lidských střevních rakovinných buněk Colo205. V potravě obsažený genistein a diadzein jsou schopné zvyšovat aktivitu QR v tlustém střevě u samic krys *in-vivo* (Moon a kol. 2006).

2.4.2 Vliv flavonoidů na enzymy II. fáze biotransformace

Aktivace enzymů II. fáze biotransformace, UDP-glukuronyltransferasy (UGT), glutathion-S-transferasy (GST) a sulfotransferasy flavonoidy má za následek detoxifikaci karcinogenů a představuje jeden z mechanismů jejich antikancerogenního efektu (Moon a kol. 2006).

2.4.2.1 UDP-glukuronyltransferasa (UGT)

Glukuronidace katalyzovaná rodinou UGT je důležitou metabolickou cestou endogenních steroidů, žlučových kyselin, léčiv a karcinogenů. UGT jsou rozděleny do dvou rodin označovaných UGT1 a UGT2. Enzymy z rodiny UGT1 většinou katalyzují glukuronidaci exogenních sloučenin (léčiva, pesticidy atd.), zatímco enzymy patřící do rodiny UGT2 se podílí na glukuronidaci endogenních sloučenin (steroidní hormony a žlučové kyseliny). Vyjímkou je lidská UGT1A1, která metabolizuje toxický produkt rozpadu hemu bilirubin) i katecholové estrogény a flavonoidy. U člověka proces glukuronidace probíhá především v játrech a v menší míře i ve střevech a ledvinách.

V lidských jaterních HepG2 buňkách a v lidských střevních buňkách linie Caco2 je vysoký stupeň indukce UGT1A1 působením chrysinu. Podobně je indukovaná glukuronidace zprostředkovaná UGT1A1 kvercetinem. Tato indukce je specifická. UGT1A6, UGT1A9 a UGT2B7 není chrysinem ovlivněna. Dva z flavonoidů, které indukují CYP1A1, galangin a isorhamnetin, nemají efekt na aktivitu UGT1A1.

Polymethoxyflavon tangeretin je nejvíce účinným inhibitorem UGT1A1, který zprostředkovává estradiol-3-glukuronidaci v lidských jaterních mikrosomech. Podobně inhibuje estradiol-3-glukuronidaci naringenin. Flavon a kvercetin je slabým inhibitorem estradiol-3-glukuronidace. Chrysin, flavanon, nobiletin a silymarin mají největší inhibiční efekt na estradiol-3-glukuronidaci při substrátové koncentraci 25 μM (Moon a kol. 2006).

UGT je indukována některými vybranými flavonoidy (biochanin A, diadzein, formononetin, genistein, prunetin, apigenin, galangin, kemferol, neringenin a kvercetin) od 5 μM v buněčných liniích LNCaP nádoru prostaty. LNCaP buňky byly vystaveny působení flavonoidů po dobu šesti dnů. Tyto flavonoidy stimulují aktivitu testosteronové UGT. Biochanin A je nejvíce potenciálním induktorem UGT. Produkce a spuštění prostatického specifického antigenu PSA (markr nádoru prostaty) jsou závislé na testosteronu a biochanin A může značně snížit koncentraci PSA v důsledku zvýšení glukuronidace testosteronu. Tato studie naznačuje, že ovlivnění hormonálního metabolismu flavonoidy může být důležité v prevenci a léčbě nádoru prostaty (Moon a kol. 2006).

2.4.2.2 Glutathion-S-transferasa

Lidské cytosolické glutathion-S-transferasy (GST) jsou rodina dimerních biotransformačních enzymů dělících se do čtyř tříd. Hlavní funkcí GST je vazba a transport velkého množství škodlivých sloučenin. GST hrají důležitou roli v detoxifikaci karcinogenů. GST jsou přítomny v mnoha tkáních u různých druhů. Velké množství je též přítomno v lidských epitelech gastrointestinálního traktu. Zapojení GST do prevence rakovinného bujení dokazuje negativní korelace mezi enzymovou aktivitou GST a výskytem nádoru v mukose podél lidského gastrointestinálního traktu. Z toho vyplývá, že indukce GST flavonoidy může být spojena s chemoprevencí rakovinného bujení.

Genistein reguluje GST skrz estrogení receptor (ER)/ARE-dependentní gen s expresí *in-vitro*. Flavon obsažený v potravě zvyšuje aktivitu GST. Dlouhodobé přijímání extraktu ze zeleného čaje zvyšuje cytosolickou aktivitu GST u samic krys. V potravě zastoupený morin zvyšuje aktivitu GST v játrech, střevě a jazyku. Na druhou stranu u kvercetinů byla pozorována efektivní inhibice lidské placentární GST (GSTP1-1).

Silymarin signifikantně zvyšuje aktivitu GST v jaterní a střevní tkáni krys. V potravě obsažený genistein a diadzein jsou schopné zvyšovat aktivitu GST v ledvinách u samic krys *in vivo* (Moon a kol. 2006).

2.4.2.3 Sulfotransferasa

Cytosolické sulfotransferasy katalyzují sulfátovou konjugaci velkého množství hormonů, neurotransmiterů a xenobiotických sloučenin. Jsou zapojeny do II. fáze biotransformace xenobiotik i do inaktivace endogenních sloučenin jako jsou steroidy, thyroïdní hormony, katecholaminy a žlučové kyseliny. Zároveň je ale sulfatace klíčový krok v bioaktivaci velkého množství mutagenů a karcinogenů. Sulfatací aktivované karcinogeny jako jsou allylalkoholy, benzylalkoholy a N-hydroxyarylaminy a jejich sulfátové estery kovalentně váží nukleové kyseliny a další makromolekuly.

Flavonoidy byly navrženy jako chemoprotektivní sloučeniny sulfát-indukované karcinogeneze, protože vykazují inhibiční efekt na sulfotransferasovou aktivitu (např. fisetin, galangin, kvercetin, myricetin, kempferol, chrysin, apigenin a genistein).

Kvercetin inhibuje sulfataci resveratrolu v lidských játrech a duodenu *in-vitro*. Resveratrol je polyfenolická sloučenina vyskytující se ve víně. Má protektivní efekt na kardiovaskulární systém a působí prospěšně při rakovinném onemocnění.

Equol je možným inhibitorem estrogenní sulfontransferasy. 4'-hydroxylová skupina equolu se překrývá s 3-hydroxy skupinou 17 β -estradiolu (E₂). Kvercetin konkuruje v této inhibici 17 β -estradiolu v lidském prsním epitelu (Moon a kol. 2006).

2.4.3 Potenciální chemopreventivní a terapeutický účinek flavonoidů

Flavonoidy reprezentují širokou skupinu sloučenin s biologickou aktivitou, která vyplývá hlavně z jejich antioxidačních vlastností a schopnosti ovlivnit několik enzymů nebo buněčných receptorů. Navzdory omezeným znalostem mechanismu účinku flavonoidů v lidském těle vykazují epidemiologické studie příznivé účinky na lidský organismus např. vysoká konzumace zeleného čaje v Japonsku nebo konzumace vína ve Francii hovoří ve prospěch prevence před onemocněním srdce a nádorovým onemocněním. Podobně rozsáhlé vystavení populace v Asii flavonoidům ze soji pravděpodobně svědčí o snížení incidence estrogen-dependentní rakovině prsu a prostaty a o snížení menopauzálních symptomů. Nicméně povědomí o možné toxicitě rostlinných přípravků a fytoestrogenů obsažených v potravě použití výrazně omezuje ve srovnání s léčivý. Řada flavonoidů má mutagenní a/nebo prooxidační efekt a může zasahovat do biochemických cest. Je velké množství dostupných dat o použití *in-vitro*, ale o mnoho méně je studiích na zvířatech. Tyto výsledky však mohou být rozdílné od účinků v lidském těle na základě rozdílného bakteriálního a jaterního metabolismu mezi jednotlivými druhy (Ferguson a kol. 2001). Studie však prokazují, že dlouhodobý příjem flavonoidů v potravě je nezbytný. Zdá se, že mladá soja obsahuje nejvyšší dávky fytoestrogenů, které ovšem mohou v citlivém životním období indukovat toxicitu (Sheehan a kol. 1998).

Spolehlivá data o následcích působení flavonoidů na lidský organismus jsou omezena (Hodek a kol. 2002). Další obavy jsou vyřčeny ohledně interakcí mezi potravou přijmutými flavonoidy a předepsanými léčivý. Užití určitých rostlinných produktů může pozměnit farmakokinetiku určitých léčiv nebo zvýšit toxicitu léčiv (Venkataramanan a kol. 2000).

Široké studie vztahů mezi strukturou a funkcí flavonoidů poskytují cennou inspiraci při vyvíjení nových léčiv s chemopreventivními účinky a/nebo k léčení onemocnění srdce a rakovinných onemocněních (Hodek a kol. 2002).

3. CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce je nalézt možné inhibitory nové lidské mikrosomální karbonylreduktasy, která byla v nedávné době purifikována na Katedře biochemických věd FaF HK z lidských jater. Jednotlivé dílčí cíle jsou:

- 1) Otestovat inhibiční účinky vybrané skupiny látek flavonoidního charakteru na výše uvedený purifikovaný enzym.
- 2) Otestovat inhibiční účinky 18 β -glycyrretinové kyseliny (inhibitoru 11 β -HSD1) na výše uvedený enzym.
- 3) Nalézt IC₅₀ pro nejsilnější inhibitory.
- 4) Zjistit vliv nalezeného silného inhibitoru na biotransformaci oracinu v lidské jaterní mikrosomální tkáni.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

4.1.1 Použitý materiál

1-hexansulfonát sodný monohdrát (Sigma-Aldrich, Německo)

18 β -glycyrretinová kyselina (Sigma-Aldrich, Německo)

Acetonitril (Sigma-Aldrich, Německo)

Amoniak (Penta, Česká Republika)

Běžné chemikálie v čistotě p.a. (Penta, Česká republika; Sigma-Aldrich, Německo)

Flavonoidy a další fenolické látky (Sigma-Aldrich, Německo; Fluka, Německo):

vitexin

isovitexin

2'-hydroxyflavanon

4'-hydroxyflavanon

3-hydroxyflavon

5-hydroxyflavon

7-hydroxyflavon

kvercetin dihydrát

kávová kyselina

naringenin

chlorogenová kyselina

rutin hydrát

4-hydroxybenzoová kyselina

kvercitrin hydrát

epigallokatechin galát

kyanin chlorid

luteolin

taxifolin

silibinin

apigenin

Etylacetát (Sigma-Aldrich, Německo)

Glukosa-6-fosfát (Sigma-Aldrich, Německo)

Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (Roche, Německo)

Metanol (Sigma-Aldrich, Německo)

NADP⁺ (Sigma-Aldrich, Německo)

Oracin (Výzkumný ústav pro Farmacii a Biochemii, Česká republika)

11-dihydrooracin (Výzkumný ústav pro Farmacii a Biochemii, Česká republika)

Triethylamin (Fluka, Německo)

4.1.2 Přípravované roztoky a pufrы

0,1 M Na-fosfátový pufr, pH 7,4:

Pro přípravu tohoto pufru byly připraveny dva roztoky. Do prvního roztoku bylo naváženo 3,58 g 0,1 M Na₂HPO₄·12H₂O a toto množství bylo rozpuštěno v 100 ml vody. Do druhého roztoku bylo naváženo 0,39 g 0,1 M NaH₂PO₄·2H₂O a toto množství bylo rozpuštěno v 25 ml vody. Postupně byly oba roztoky slity až na pH 7,4. Roztok se uchovával v lednici.

10 mM hexansulfonanový pufr + 0,1M Triethylamin, pH 3,27:

Pro přípravu tohoto roztoku bylo naváženo 2,0624 g hexansulfonanu sodného monohydrátu. Toto množství se rozpustilo v 900 ml vody. Přidalo se 7,1 ml triethylaminu (TEA). Poté se upravilo pH na 3,27 pomocí 85% kyseliny fosforečné. Množství se doplnilo do 1000 ml vody. Roztok se přefiltroval přes nylonovou membránu (0,45 μm) a uchovával v lednici.

0,1 M MgCl₂:

Bylo naváženo 1,017 g MgCl₂·6H₂O a toto množství bylo rozpuštěno v 50 ml vody. Roztok se uchovával v lednici.

5 mM oracin:

Bylo naváženo 1,85 mg oracinu a toto množství bylo rozpuštěno v 1 ml vody. Roztok se uchovával v lednici.

0,3 M Chloristan amonný, pH 3,0

Pro přípravu tohoto roztoku bylo naváženo 35,25 g chloristanu amonného a rozpuštěno v 900 ml vody. Poté se upravilo pH pomocí koncentrované kyseliny chloristé na hodnotu 3,0. Množství roztoku se doplnilo na 1000 ml. Roztok se přefiltroval přes nylonovou membránu (0,45 μm) a uchovával v lednici.

NADPH-generační systém

NADPH-generační systém je třeba připravit před každou inkubací nový. Při přípravě NADPH generačního systému bylo vždy naváženo 4 mg NADP^+ a 12 mg glukosa-6-fosfátu do mikrozkušavky Eppendorf na analytických vahách. Tyto navážky byly rozpuštěny v 200 μl 0,1 M MgCl_2 a 200 μl 0,1 M Na-fosfátového pufru, pH 7,4. Výsledné koncentrace v roztoku jsou 0,8 mM NADP^+ , 6 mM glukosa a 3 mM MgCl_2 . Těsně před inkubací bylo do mikrozkušavky Eppendorf přidáno 10 μl glukosa-6-fosfát dehydrogenasy. Toto množství NADPH-generačního systému stačí do reakčních směsí pro inkubaci 20 vzorků.

Roztoky inhibitorů

Nejprve byly připraveny 1 mM zásobní roztoky potenciálních inhibitorů. Navážky, které byly vypočítány na základě hodnoty molekulární hmotnosti, byly rozpuštěny v 1 ml 100% metanolu. Některé flavonoidy se hůře rozpouštěly. Pro lepší rozpuštění bylo použito ultrazvukové lázně. Poté byly zásobní roztoky jednotlivých látek 5x zředěny na koncentraci 0,2 mM, pro ředění byla použita směs metanol:voda 1:1.

Tab. 4. Přehled použitých flavonoidů, způsob uchovávání (pt-pokojeová teplota, led- lednice, m-mrazák), molekulární hmotnosti a navážky na 1ml 1mM roztoku.

| Inhibitor | Uchovávání | Mr | Navážky (mg) |
|-------------------------------------|-------------------|-----------|---------------------|
| Vitexin | pt | 432,38 | 0,432 |
| 2'-hydroxyflavanon | pt | 240,3 | 0,240 |
| 4'-hydroxyflavanon | pt | 240,3 | 0,240 |
| 3-hydroxyflavon | pt | 238,25 | 0,238 |
| 5-hydroxyflavon | pt | 238,25 | 0,238 |
| 7-hydroxyflavon | pt | 238,25 | 0,238 |
| Kvercetin dihydrát | pt | 338,26 | 0,338 |
| Kávová kyselina | pt | 180,16 | 0,180 |
| Naringerin | pt | 272,26 | 0,272 |
| Chlorogenová kyselina | pt | 354,31 | 0,354 |
| Rutin hydrát | pt | 610,52 | 0,610 |
| 4-hydroxybenzoová kys. | pt | 138,12 | 0,138 |
| Kvercitrin hydrát | led | 448,4 | 0,448 |
| Epigallokatechin gallát | led | 458,4 | 0,458 |
| Kyanin chlorid | led | 646,98 | 0,646 |
| Luteolin | led | 286,2 | 0,286 |
| Taxifolin | m | 304,3 | 0,304 |
| Silibinin | m | 482,4 | 0,482 |
| Apigenin | m | 270,24 | 0,270 |
| 18β-glycyrrretinová kyselina | pt | 470,7 | 0,470 |

4.1.3 POMŮCKY A PŘÍSTROJE

- Pomůcky

V průběhu experimentu byly používány kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, mikrozkuřavky Eppendorf, automatické pipety a špičky, multipipeta, stojánky, lžička, navařovací lodička, parafilm, stopky a další laboratorní pomůcky.

- Přístroje

Centrifuga Eppendorf MiniSpin plus (Eppendorf, Německo)

Inkubátor Eppendorf Thermomixer komfort (Eppendorf, Německo)

Ultrazvuková lázeň Ultrasonic compact cleaner UC 005 AJ1 (Tesla, Česká republika)

pH-metr Thermo Orion model 410A (Thermo, USA)

Magnetická míchačka (Lavat, Česká republika)

Ultradestilační přístroj Milli Q (Prograd 2)(Millipore, USA)

Analytické váhy Scaltec SBC22, (Denver Instrument GmbH, Německo)

Předvážky KERN KB (Kern, Německo)

Výrobník ledu Scotsman AF 80 (Scotsman, Itálie)

Třepací zařízení Minishaker IKA MS2 (IKA, USA)

Vakuový koncentrátor Eppendorf 5301 (Eppendorf, Německo)

HPLC Agilent 1100 - gradientová pumpa, autosampler, odplyňovač, termostatovaná část pro kolonu, fluorescenční detektor (Agilent, USA)

4.2 METODY

4.2.1 Purifikace nové lidské mikrosomální karbonylreduktasy

Nová lidská mikrosomální karbonylreduktasa byla připravena podle postupu popsaného v článku Škarydová a kol 2009. Purifikace byla provedena na katedře biochemických věd. Lidské jaterní mikrosomy byly homogenizovány a solubilizovány pomocí solubilizačního pufru obsahujícího detergent Triton X-100. Před prvním purifikačním krokem byly solubilizované mikrosomy odsoleny pomocí gelové filtrace. Prvním purifikačním krokem byla iontově-výměnná chromatografie na Q-sepharose. Všechny získané frakce byly testovány na aktivitu vůči oracinu a zjištěna stereospecifita této reakce. Frakce, která nejlépe splňovala předpoklady (dostatečná aktivita vůči oracinu a stereospecifita ve prospěch (+)-DHO) byla podrobena druhému purifikačnímu kroku na Fenylyl-sepharose. Všechny frakce byly testovány obdobně jako v předchozím kroku. Byla získána frakce, která se podílela na biotransformaci oracinu se stereospecifitou (+)-DHO/(-)-DHO 86/14 a obsahovala novou lidskou mikrosomální karbonylreduktasu. Tato frakce byla použita pro následující studii vlivu potenciálních inhibitorů na její aktivitu.

4.2.2 Inkubace vzorků neznámé reduktasy s oracinem pro stanovení redukční aktivity

4.2.2.1 Inkubace vzorků pro stanovení enzymatické aktivity vůči oracinu

Purifikovaná frakce obsahující novu lidskou karbonylreduktasu byla uchována v mrazáku při teplotě -80°C . Před inkubací byly vzorky vyndány z mrazáku na led a nechaly se samovolně rozmrazit. Po rozmražení byly vzorky promíchány na třepače a dány zpět na led. K 10 μl vzorku nové mikrosomální karbonylreduktasy bylo přidáno 60 μl Na-fosfátového pufru, pH 7,4 a 20 μl NADPH-generačního systému. Proporce mezi vzorkem a fosfátovým pufrům se mohou měnit, ale vždy musí být zachováno množství NADPH-generačního systému, oracinu a celkového objemu reakční směsi 100 μl . Pro kontrolu bez metanolu (K) se do mikrozkuhavky k 10 μl vzorku přidalo 20 μl NADPH-generačního systému a 60 μl Na-fosfátového pufru, pH 7,4. Pro kontrolu s metanolem (KM) se do mikrozkuhavky k 10 μl vzorku připipetovalo 20 μl NADPH-generačního systému, 10 μl směsi metanol:voda 1:1 a 50 μl Na-fosfátového pufru, pH 7,4. Reakční směs byla preinkubována v termobloku při 37°C po dobu 5 min. Všechny reakce byly nastartovány přidáním 10 μl 5 mM oracinu. Reakce v jednotlivých mikrozkuhavkách Eppendorf byly startovány přesně po 30 s. Vzorky byly inkubovány při 37°C po dobu 30 min.

4.2.2.2 Zastavení inkubace a extrakce DHO

Reakce byla ukončena přesně po 30 min přidáním 40 μl 25 % amoniaku a 300 μl ethylacetátu. Časový interval mezi jednotlivými mikrozkuhavkami Eppendorf byl 30 s. Obsah mikrozkuhvek Eppendorf se ihned po ukončení třepal na třepače přesně 15 s a byl dán na led. Mikrozkuhavky Eppendorf byly centrifugovány při 13 000 otáčkách po dobu 2 min. Do nové mikrozkuhavky Eppendorf byla napipetována horní organická vrstva. Vzorky byly odpařeny na vakuové odparce při 45°C po dobu 20 min. Následovala příprava vzorků k HPLC analýze.

4.2.2.3 Přehled účinku potenciálních inhibitorů na aktivitu nové mikrosomální karbonylreduktasy

Postup odpovídá kapitole 4.2.2.1 a 4.2.2.2. Inkubační směs obsahovala 10 μl vzorku neznámé karbonylreduktasy, 50 μl Na-fosfátového pufru, pH 7,4, 10 μl 0,2 mM

roztoku inhibitoru a 20 μl NADPH-generačního systému. Reakce byla nastartována přidáním 10 μl 5 mM roztoku oracinu. Od každého inhibitoru byly testovány tři paralelní vzorky.

4.2.2.4 Stanovení IC_{50} vybraných inhibitorů

Postup odpovídá kapitole 4.2.2.1 a 4.2.2.2. Výsledné koncentrace jednotlivých inhibitorů v reakční směsi byly 50 μM , 30 μM , 10 μM , 5 μM a 1 μM . Inkubační směs obsahovala 10 μl vzorku neznámé karbonylreduktasy, Na-fosfátový pufr, pH 7,4, roztok inhibitoru (viz Tab. 5) a 20 μl NADPH-generačního systému. Reakce byla nastartována přidáním 10 μl 5 mM roztoku oracinu. Od každého inhibitoru byly testovány tři paralelní vzorky.

Tab. 5. Množství Na-fosfátového pufru, pH 7,4 a roztoku inhibitoru v reakční směsi.

| Výsledná koncentrace inhibitoru (μM) | Množství Na-fosfátového pufru, pH 7,4 (μl) | Množství roztoku inhibitoru (μl) |
|---|---|---|
| 50 | 50 | 10 (0,5 mM) |
| 30 | 54 | 6 (0,5 mM) |
| 10 | 58 | 2 (0,5 mM) |
| 5 | 50 | 10 (0,05 mM) |
| 1 | 58 | 2 (0,05 mM) |

4.2.3 Achirální analýza na HPLC

4.2.3.1 Mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena smícháním 10 mM hexansulfonanového pufru + 0,1M TEA, pH 3,27 a acetonitrilu v poměru 75:25. Nádoba, ve které byla mobilní fáze se překryla parafilmem, aby se zabránilo těkání acetonitrilu.

4.2.3.2 Příprava vzorků k analýze

K odparkům bylo přidáno 125 μ l mobilní fáze a byly rozpuštěny na ultrazvukové lázni. Rozpuštění bylo vizuálně kontrolováno. Poté byly vzorky napipetovány do inzertů. Inzerty byly vloženy do vialek a ty byly uzavřeny víčky s těsněním.

4.2.3.3 Samotná achirální analýza

Pro stanovení aktivity vůči oracinu a také míry inhibice jednotlivých flavonoidů bylo použito HPLC. Metoda byla popsána Wsólem a kol. v roce 1996. Pro separaci se využívá kolona BDS Hypersil C18, DHO se měří pomocí fluorescenčního detektoru při excitační/emisní vlnové délce 340/418 nm a k jeho eluci dochází v retenčním čase 2,8 min. Detekční limit metody je 10 pmol/ml DHO.

4.2.4 Výpočet inhibiční konstanty IC₅₀

Inhibiční účinnost jednotlivých flavonoidů byla charakterizována pomocí jejich IC₅₀, které byly vypočítány pomocí programu GraphPad Prism 5.00.

4.2.5 Inkubace vzorků mikrosomů s oracinem pro stanovení enzymové stereospecifity

4.2.5.1 Samotná inkubace mikrosomů s roztoky inhibitorů

Vzorky lidských jaterních mikrosomů se uchovávají v mrazáku při teplotě -80°C. Před inkubací byly vzorky vyndány z mrazáku na led a nechaly se samovolně rozmrazit. Po rozmražení byly vzorky promíchány na třepačce a dány zpět na led. Ke 2 μ l vzorku mikrosomů bylo přidáno 20 μ l NADPH-generačního systému, 0,1 M Na-fosfátový pufr, pH 7,4 a roztok inhibitoru. Proporce mezi vzorkem a fosfátovým pufrům se mohou měnit, ale vždy musí být zachováno množství NADPH-generačního systému, oracinu a celkový objem reakční směsi 100 μ l. Zároveň se vzorky se připraví mikrozkušavky pro kontrolu. Tyto mikrozkušavky obsahovaly 20 μ l NADPH-generačního systému a 70 μ l Na-fosfátového pufru, pH 7,4. Reakční směsi

byly preinkubovány v termobloku při 37°C po dobu 5 min. Reakce byly nastartovány přidáním 10 µl 5 mM oracinu. Reakce v jednotlivých mikrozkuvkách Eppendorf byly startovány přesně po 30 s. Vzorky byly inkubovány při 37°C po dobu 30 min.

Tab. 6. Množství Na-fosfátového pufru, pH 7,4 a roztoku inhibitoru v reakční směsi.

| Inhibitor | Koncentrace inhibitoru (µM) | Na-fosfátový pufr, pH 7,4 (µl) | Roztok inhibitoru (µl) |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------------|
| 18β-glycyrretinová kyselina | 5 | 58 | 10 (0,05 mM) |
| Kvercetin | 20 | 64 | 4 (0,5 mM) |

4.2.5.2 Zastavení inkubace a extrakce DHO

Reakce byla ukončena přesně po 30 min přidáním 40 µl 25 % amoniaku a 300 µl ethylacetátu. Časový interval mezi jednotlivými mikrozkuvkami Eppendorf byl 30 s. Obsah mikrozkuvek Eppendorf se ihned po ukončení třepal na třepače přesně 15 s a byl dán na led, aby došlo k úplnému ukončení reakce. Mikrozkuvky Eppendorf byly centrifugovány při 13 000 otáčkách po dobu 2 min. Do nové mikrozkuvky Eppendorf byla napipetována horní organická vrstva. Vzorky byly odpařeny na vakuové odparce při 45°C po dobu 20 min.

4.2.6 Chirální analýza na HPLC

4.2.6.1 Mobilní fáze

Mobilní fáze se skládá z 0,3 M chloristanového pufru (pH 3,0) a acetonitrilu v poměru 69:31 (v/v). Nádoba, ve které je mobilní fáze, se překryla parafilmem, aby se předešlo nadměrnému těkání acetonitrilu.

4.2.6.2 Příprava vzorků k analýze

K odparkům bylo přidáno 125 µl mobilní fáze a byly rozpuštěny na ultrazvukové lázni. Rozpuštění bylo vizuálně kontrolováno. Poté byly vzorky nepipetovány do inzertů. Inzerty byly vloženy do vialek a ty byly uzavřeny víčky s těsněním.

4.2.6.3 Samotná chirální analýza

Enzymová stereospecifita mikrosomů a její případné ovlivnění přítomností inhibitorů byla stanovena pomocí chirální HPLC metody pro stanovení obou enantiomerů DHO, která byla také vyvinuta na katedře biochemických věd Faf HK (Wsól a kol. 1999). Pro separaci se používala kolona OD-R Chiracel 240 mm x 4,6 mm, enantiomery DHO byly detekovány fluorescenčně při excitační/emisní vlnové délce 340/418 nm. Retenční čas enantiomeru (+)-DHO je 9 min a (-)-DHO 12 min.

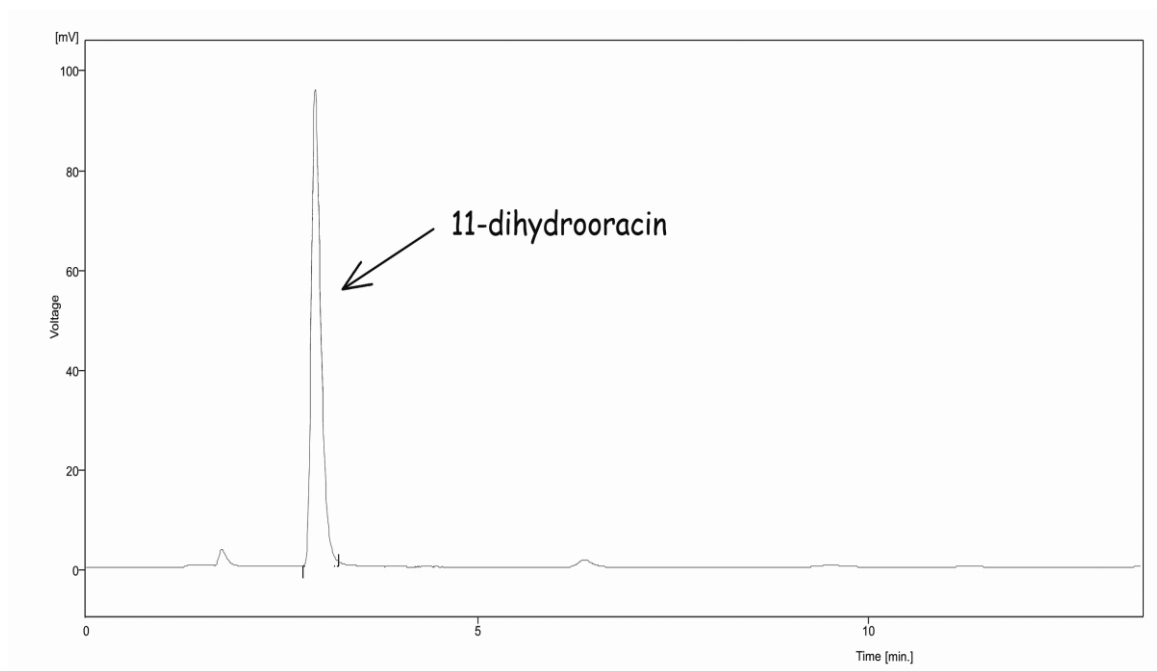
5. VÝSLEDKY

5.1 Charakteristika purifikované frakce

Pro stanovení inhibičního účinku vybrané skupiny látek flavonoidů a příbuzných látek byla použita purifikovaná frakce po druhém purifikačním kroku purifikačního schématu, které je uvedeno v části 4.2.1. Parametry této purifikované frakce byly změřeny v rámci purifikačního procesu na katedře biochemických věd Faf HK. Tato frakce obsahující novou mikrosomální karbonylreduktasu měla obsah bílkovin 1 $\mu\text{g/ml}$ a vykazovala vůči oracinu specifickou aktivitu 1090 ng DHO/mg/30 min. Stereospecifita redukce oracinu na metabolit DHO byla stanovena (+)-DHO/(-)-DHO 86/14.

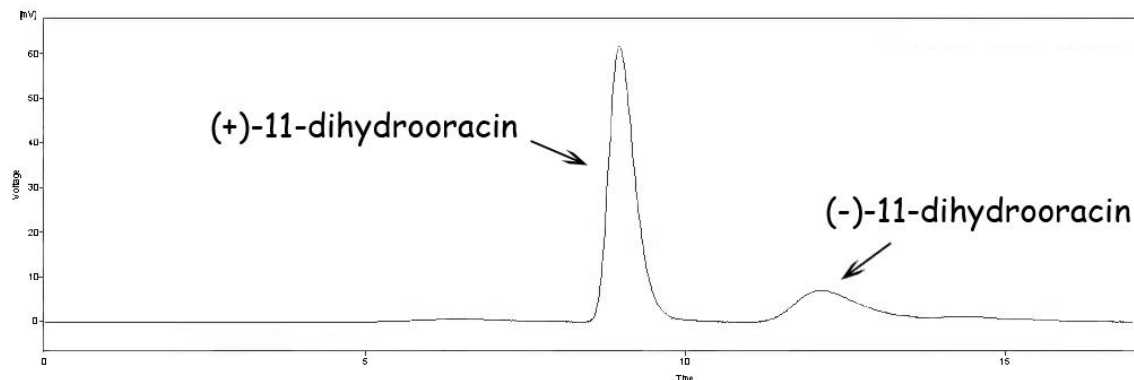
5.2 Využívané HPLC metody

Pro stanovení redukční aktivity vůči oracinu a také stanovení míry inhibičního účinku vybrané skupiny látek byla využívána HPLC metoda pro stanovení celkového množství metabolitu DHO (viz sekce 4.2.2). Příklad získaného chromatografického záznamu na obrázku 10.



Obr. 10. Chromatogram standardu 11-dihydrooracinu.

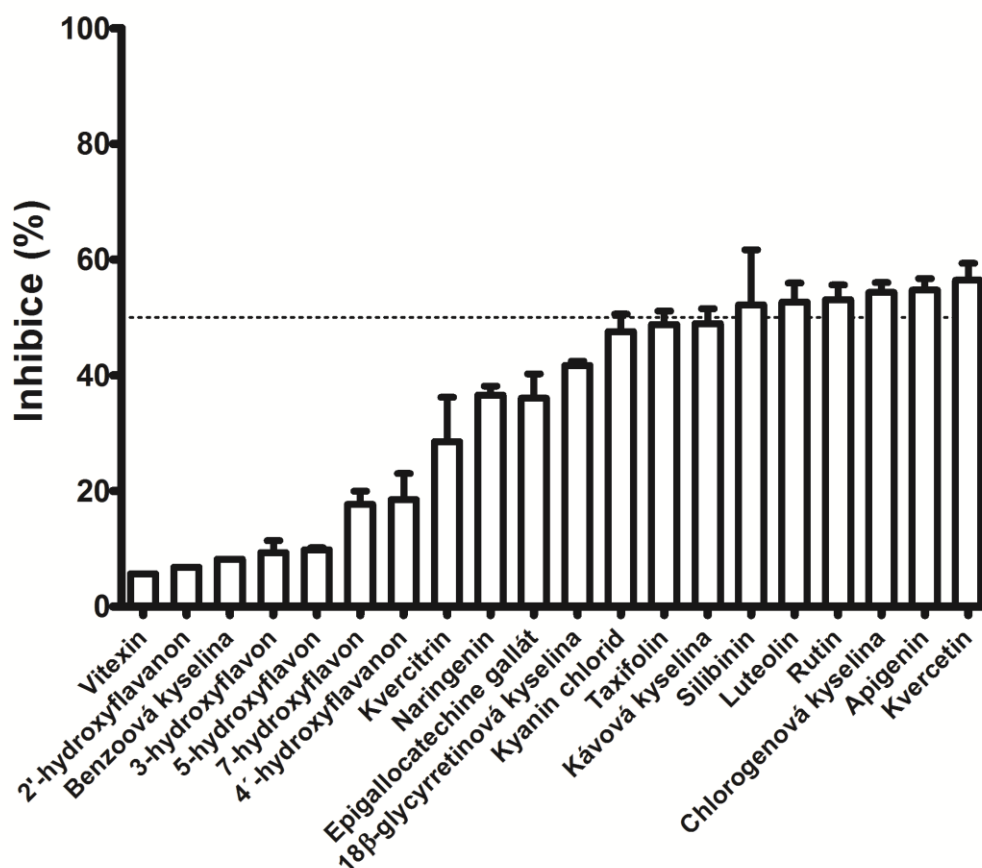
Pro stanovení stereospecifity lidské jaterní mikrosomální frakce a její ovlivnění vybranými inhibitory (viz sekce 4.2.5) byla využita chirální HPLC metoda (viz sekce 4.2.6). Příklad získaného chromatogramu je uveden na obrázku 11.



Obr. 11. Chromatogram enantiomerů 11-dihydrooracinu.

5.3 Stanovení inhibičního účinku vybrané skupiny látek

Purifikovaná frakce byla rozpipetována do mikrozkušavek Eppendorf z úsporných důvodů po 10 μ l. Nejprve byla u třech náhodně vybraných vzorků ověřena aktivita vůči oracinu a také ověřen vliv metanolu, který se používá jako rozpouštědlo potenciálních inhibitorů. Protože bylo potvrzeno, že aktivita frakce byla při jejím uchování při -80°C zachována bylo možné provést průzkum účinku jednotlivých látek z vybrané skupiny. Bylo zjištěno, že metanol ovlivňuje aktivitu enzymu, 5% metanolu v reakční směsi snižuje aktivitu enzymu o 24%, takže jako referenční hodnoty pro zjištění účinku inhibitorů byly použity kontrolní vzorky obsahující metanol, aby byl eliminován jeho účinek na enzym. Sledování inhibičního účinku bylo provedeno při koncentraci 20 μM jednotlivých potenciálních inhibitorů v reakčních směsích. Mimo flavonoidů a jim příbuzných látek byla do přehledu přidána také 18 β -glycyrretinová kyselina, inhibitor 11 β -HSD1. Flavonoidy se obecně v organismu pohybují ve velmi nízkých koncentracích a tato koncentrace byla zvolena jako hraniční, aby případné nalezené inhibitory a jejich IC_{50} měli z hlediska situace v organismu smysl. Inkubace se všemi potenciálními inhibitory byla provedená, jak bylo popsáno v sekci 4.2.2.3. Od každého inhibitoru se vytvořily tři paralelní vzorky. Výsledky byly zpracovány a jsou znázorněny na obrázku 12.



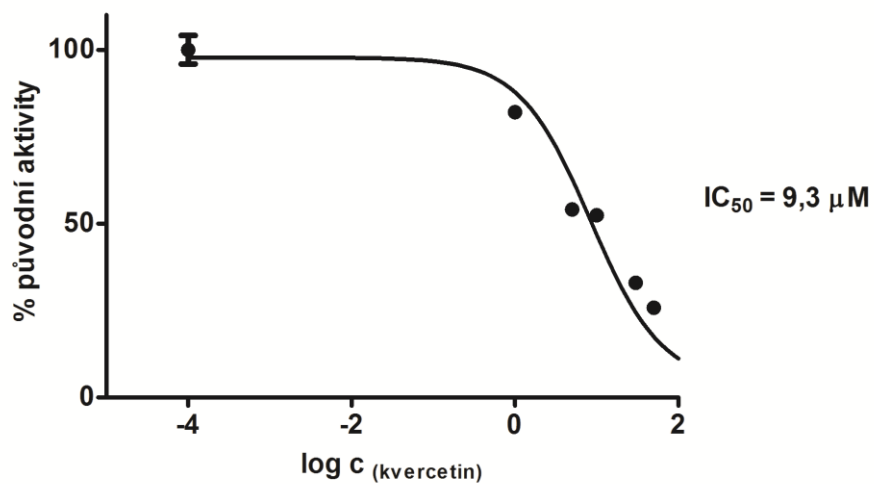
Obr. 12. Inhibiční efekt flavonoidů, příbuzných fenolických látek a 18β-glycyrretinové kyseliny v konečné koncentraci 20 μM na novou mikrosomální karbonylreduktasu.

Jak je z obrázku patrné nejvyšší inhibiční účinek na novou mikrosomální karbonylreduktasu vykazují kvercetin, apigenin, chlorogenová kyselina, rutin, luteolin a silibinin. Pro tyto látky byla dále stanovena poloviční inhibiční koncentrace IC_{50} pro daný enzym. Na druhou stranu byly nalezeny i takové látky, které prakticky nemají vliv na aktivitu studovaného enzymu jako je vitexin či 2'-hydroxyflavanon.

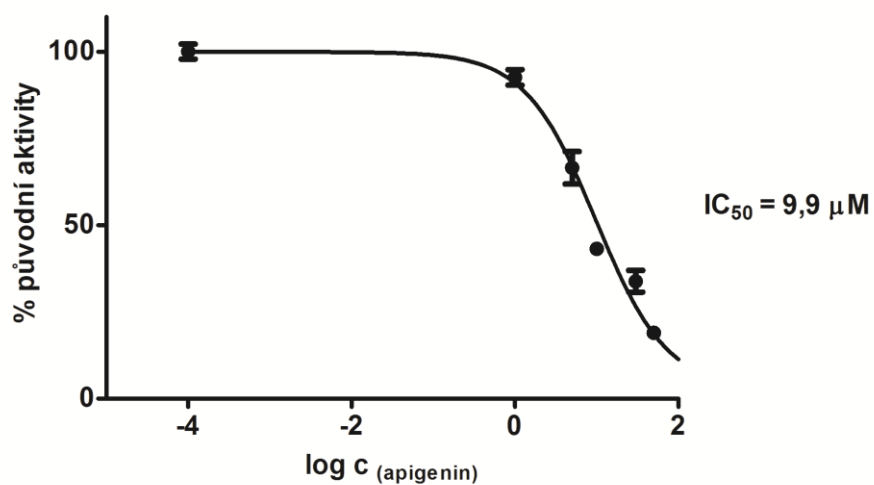
5.4 Stanovení poloviční inhibiční koncentrace IC_{50} pro vybrané látky

Pro další zkoumání jsme si tedy vybrali šest výše uvedených látek s nejvyšší mírou inhibice vůči studovanému enzymu. Koncentrace jednotlivých látek byly zvoleny podle výsledků screeningu na 1, 5, 10, 30, 50 μM v reakční směsi. Na následujících obrázcích (obr. 13-18) jsou uvedeny grafy inhibice jednotlivých inhibitorů. Hodnoty IC_{50} byly stanoveny v programu GraphPad Prism, aby bylo možné tyto hodnoty odečíst bylo nutné pro kontrolní vzorky bez inhibitoru do programu zadat velmi nízkou hodnotu

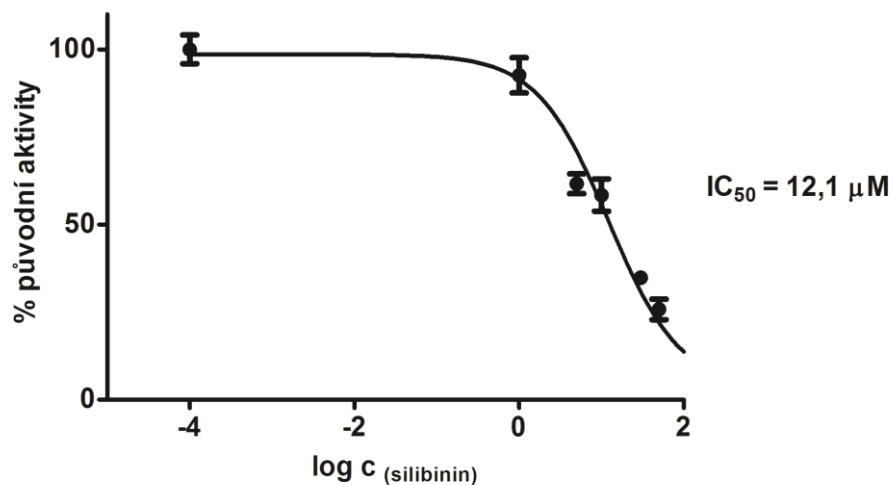
inhibitoru, v našem případě 10^{-4} μM jinak nebylo možné získat smysluplné hodnoty IC_{50} .



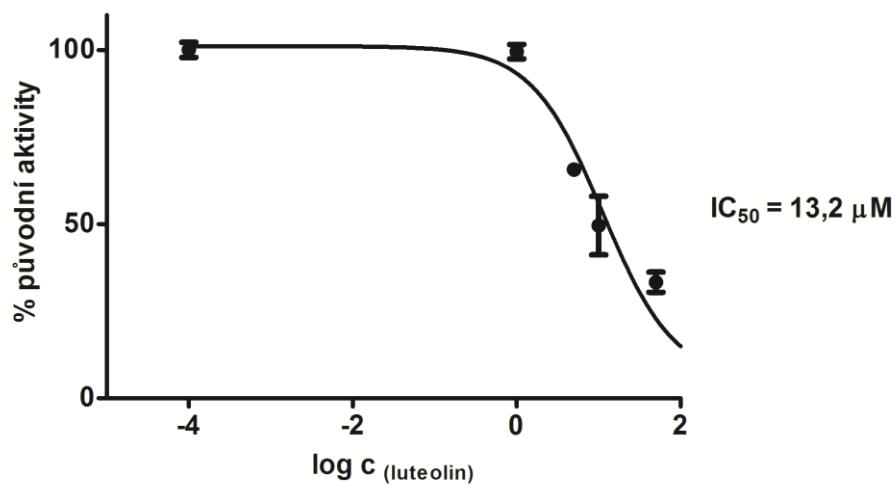
Obr. 13. Inhibiční účinek různých koncentrací kvercetinu na novou lidskou mikrosomální karbonylreduktasu.



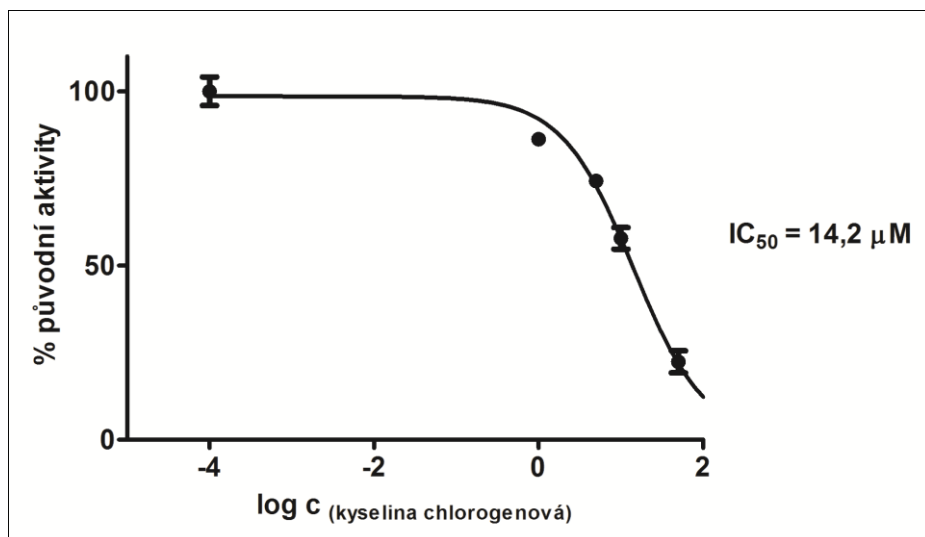
Obr. 14. Inhibiční účinek různých koncentrací apigeninu na novou lidskou mikrosomální karbonylreduktasu.



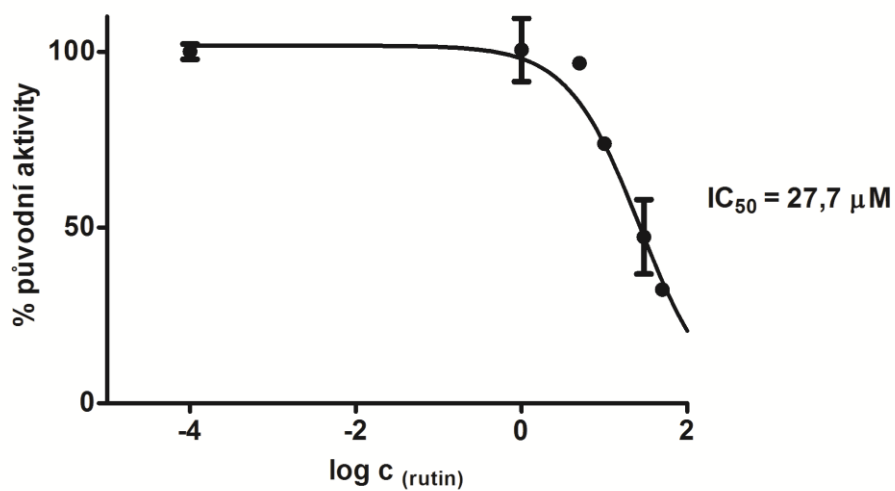
Obr. 15. Inhibiční účinek různých koncentrací silibininu na novou lidskou mikrosomální karbonylreduktasu.



Obr. 16. Inhibiční účinek různých koncentrací luteolinu na novou lidskou mikrosomální karbonylreduktasu.



Obr. 17. Inhibiční účinek různých koncentrací kyseliny chlorogenové na novou lidskou mikrosomální karbonylreduktasu.

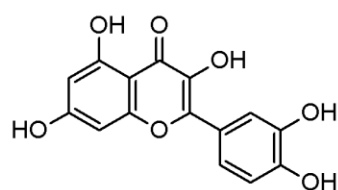


Obr. 18. Inhibiční účinek různých koncentrací rutinu na novou lidskou mikrosomální karbonylreduktasu.

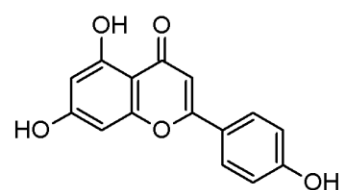
Tab. 7. Souhrn získaných hodnot IC_{50} pro nejlepší nalezené inhibitory nové lidské jaterní mikrosomální karbonylreduktasy.

| Inhibitor | IC_{50} (μ M) |
|-----------------------|----------------------|
| Kvercetin | 9,3 |
| Apigenin | 9,9 |
| Silibinin | 12,1 |
| Luteolin | 13,2 |
| Kyselina chlorogenová | 14,2 |
| Rutin | 27,7 |

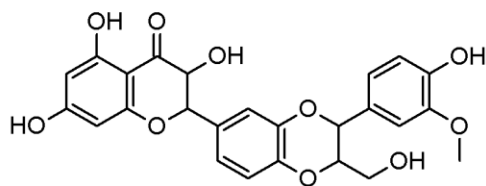
Pokud se podíváme na získané nejsilnější inhibitory z hlediska struktury (viz Obr. 19) tak je patrné, že jednotlivé inhibitory jsou strukturně odlišné. Zatímco kvercetin patří mezi flavonoly tak apigenin a luteolin mezi flavony. Silibinin a kyselina chlorogenová jsou strukturně zcela odlišné. Pouze rutin je kvercetin podobný, je jeho glykosidem, ale navázaný cukr zřejmě brání většímu inhibičnímu účinku.



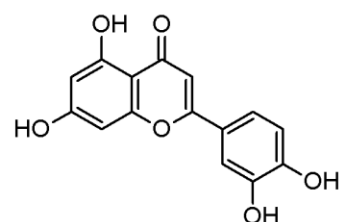
Kvercetin



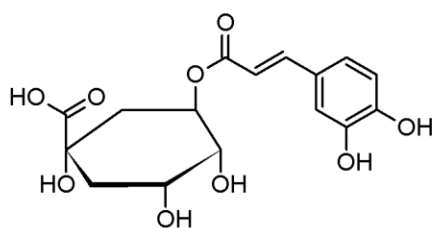
Apigenin



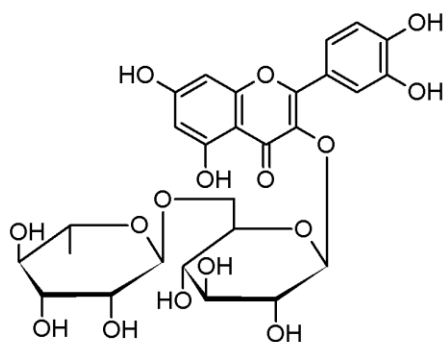
Silibinin



Luteolin



Kys. chlorogenová



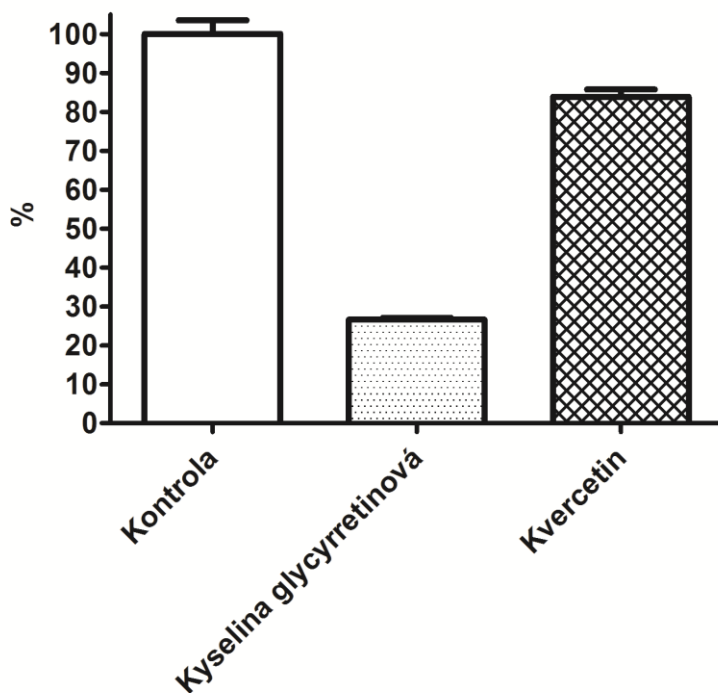
Rutin

Obr. 19. Struktury nejsilnějších inhibitorů nové lidské mikrosomální karbonylreduktasy.

5.5 Vliv vybraných inhibitorů na metabolismus oracinu v lidské jaterní mikrosomální frakci

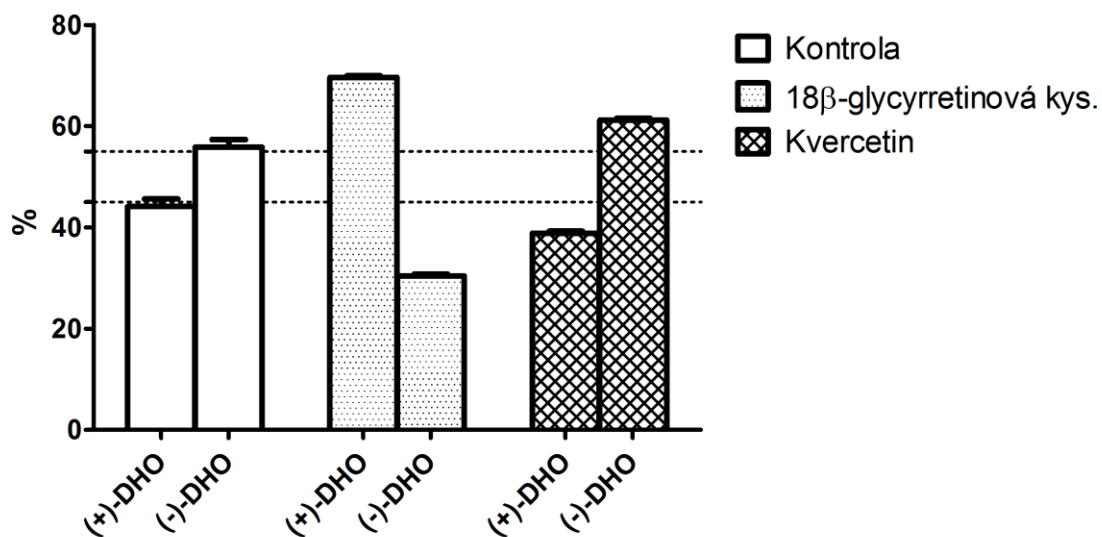
Lidské jaterní mikrosomy obsahují vedle námi zkoumané nové lidské karbonylreduktasy také 11 β -HSD1. Pro zjištění vlivu inhibitorů na metabolismus a stereospecifitu biotransformace oracinu jsme použili dobře známý inhibitor 11 β -HSD1 18 β -glycyrretinovou kyselinu v koncentraci 5 μ M. Jako silný inhibitor námi sledované karbonylreduktasy jsme vybrali kvercetin v koncentraci 20 μ M. Byla provedena inkubace mikrosomů s jednotlivými inhibitory (viz 4.2.5) a následně byla provedena chirální analýza na HPLC (viz 4.2.6).

Z Obr. 20 je patrné, že přítomnost kyseliny 18 β -glycyrréitinové o koncentraci 5 μ M přineslo 73% snížení aktivity lidských jaterních mikrosomů, zatímco přítomnost kvercetínu způsobila pouze 17% snížení aktivity.



Obr. 20. Vliv vybraných inhibitorů na metabolismus oracinu v lidské jaterní mikrosomální frakci.

Vedle aktivity vůči oracinu byla přítomností inhibitorů změněna také stereospecifita redukce. Došlo ke změně z poměru (+)-DHO/(-)-DHO 45:55 u neinhibované jaterní mikrosomální frakce ke změně ve prospěch (+)-DHO (70%) v případě kyseliny 18 β -glycyrréitinové a lehké navýšení ve prospěch (-)-DHO (62%) u kvercetínu jak je znázorněno na obrázku 21.



Obr. 21. Ovlivnění stereospecifity jaterní mikrosomální frakce přítomností inhibitorů 11β-HSD1 (18β-glycyrretinová kyselina) a nové lidské mikrosomální karbonylreduktasy (kvercetin).

6. DISKUSE

Inhibitory mohou hrát v organismu důležitou roli a to jak pozitivní tak negativní. Záleží na tom, který enzym inhibují a jakou selektivitu vůči němu vykazují. Existuje řada inhibitorů enzymů, které se klinicky využívají v terapii některých onemocnění např. statiny jsou inhibitory HMG-CoA reductasy v terapii hypercholesterolemie. Na druhou stranu například inhibice některých biotransformačních enzymů mohou vést k prodloužení účinku a zvýšení toxicity určitých léčiv. Flavonoidy a příbuzné látky mají v organismu řadu různých funkcí - udržují integritu stěny kapilár, působí proti vysokému krevnímu tlaku, antiarytmicky, protizánětlivě, podílí se také na snížení hladiny cholesterolu a brání rozvoji některých forem nádorů. Tyto funkce jsou způsobeny řadou mechanismů jako je jejich interakce s některými receptory, antioxidační funkce nebo interakce s enzymy (Škarydová a kol. 2009b, Brožič a kol. 2006b). Právě na inhibice karbonylreduktas látkami ze skupiny flavonoidů byla zaměřena tato práce. V teoretické části byly popsány funkce flavonoidů se zdůrazněním jejich inhibičního či indukčního působení na různé biotransformační enzymy.

V *in-vitro* experimentech mohou inhibitory sloužit k potlačení vlivu některých enzymů nebo k jejich rozlišení. Tato inhibiční studie nové lidské mikrosomální karbonylreduktasy, která nebyla zatím identifikována, byla provedena, aby se mimo rozdílů ve stereospecifitě (viz část 2.3.2) dalo na odlišnost tohoto enzymu od 11 β -HSD1 poukázat i další charakteristikou. Na začátku experimentů s novou karbonylreduktasou bylo třeba překonat obtíže spojené s tím, že se jedná o membránově vázaný enzym, který má tendenci nebýt volně v roztoku, ale vázat se na povrchy. Proto při přelítí vzorku ze zkumavky došlo ke ztrátě aktivity a bylo se nutné takového kroku vyvarovat. I přes nízkou koncentraci proteinu ve frakci obsahující novou mikrosomální karbonylreduktasu byla redukční aktivita poměrně vysoká a tak byla celá frakce rozpípetována do mikrozkuvek Eppendorf po 10 μ l, protože se jedná o cenný materiál a bylo nutné provést co nejvíc experimentů. Vzhledem k velmi nízkému detekčnímu limitu HPLC metody pro stanovení redukční aktivity, ale nebyl se stanovením metabolitu DHO žádný problém.

Pro stanovení inhibitoru nové lidské mikrosomální karbonylreduktasy byla zvolena skupina flavonoidů a příbuzných látek, protože u celé řady z nich byl popsán inhibiční efekt na různé jak cytosolické tak mikrosomální karbonylreduktasy. Skupina

byla vybraná tak, aby pokrývala různé skupiny látek řazené mezi flavonoidy a podobné fenolické sloučeniny. Navíc k nim byla přidána 18 β -glycyrretinová kyselina, která je dobře známým, poměrně silným, i když ne zcela selektivním inhibitorem 11 β -HSD1 (Maser a kol. 2002).

Bylo zjištěno, že nejsilnějším inhibitorem nové lidské mikrosomální karbonylreduktasy z vybrané skupiny látek je kvercetin s $IC_{50} = 9,3 \mu M$ následovaný apigeninem, silibininem, luteolinem a kyselinou chlorogenovou, které mají všechny hodnoty IC_{50} do $15 \mu M$ (viz tabulka 7). Poslední z podrobněji zkoumaných látek, rutin má už hodnotu vyšší. Pokud tyto výsledky porovnáme s publikovanými výsledky pro 11 β -HSD1 (viz tabulka 8), pak i přes to, že hodnoty IC_{50} záleží na podmínkách stanovení a není možné jejich hodnoty jednoduše porovnávat, se ukazuje, že se jedná i podle popsaných inhibitorů o jiný enzym. Zatímco u námi sledovaného enzymu byla inhibice kvercetinem a apigeninem prokázána tak na aktivitu 11 β -HSD1 tyto látky nemají vliv. Stejně tak u 11 β -HSD1 jsou silnými inhibitory 18 β -glycyrretinová kyselina a 2'-hydroxyflavanon, ale jejich efekt na novou mikrosomální karbonylreduktasu byl poměrně či velmi slabý (Schweizer a kol. 2003).

Tab. 8. Porovnání inhibičního účinku některých flavonoidů a kyseliny 18 β -glycyrretinové na novou mikrosomální karbonylreduktasu a 11 β -HSD1. Vysvětlivky: ? - nebylo popsáno, ox/red – v oxidačním/redukčním směru.

| | Nový enzym | 11 β -HSD1 (Schweizer 2003) |
|-------------------------------------|------------|-----------------------------------|
| Kvercetin | 9,3 | neinhibuje |
| Apigenin | 9,9 | neinhibuje |
| Silibinin | 12,1 | ? |
| Luteolin | 13,2 | ? |
| Chlorogenová kyselina | 14,2 | ? |
| Rutin | 27,7 | ? |
| 2'-hydroxyflavanon | >> 20 | 10 |
| 18 β -glycyrretinová kyselina | > 20 | 1,57/0,0034 (Ox/red) |

Teoreticky by bylo možné podle prokázaných inhibitorů vytipovat, o jaký enzym jde, pokud patří mezi ty už popsané, ale obecně u řady zejména mikrosomálních enzymů jsou tyto znalosti velmi kusé. Například u mikrosomální 17 β -HSD7 nebyly žádné informace ohledně vlivu flavonoidů na jeho aktivitu zatím publikovány. U dalšího mikrosomálního enzymu 17 β -HSD3 byl popsán pouze inhibiční vliv 7-hydroxyflavanonu, baicaleinu a biochaninu A. Tento enzym je navíc skoro výhradně exprimován ve varlatech (Poirier 2003). Obecně platí, že flavonoidy inhibují celou řadu karbonyl redukčních enzymů a zřejmě nebudou dostatečně selektivní pro žádný z nich. Například kvercetin, který je nejsilnějším inhibitorem námi sledovaného enzymu inhibuje s různou mírou také cytosolické enzymy CBR1 (Carquist a kol. 2008), AKR1C1 (Brožic a kol. 2006b), AKR1C3 (Škarydová a kol. 2009b, Krazeisen a kol. 2001), AKR1B1 a AKR1B10 (Endo a kol. 2010) zatímco žádný vliv nemá na aktivitu již zmíněné 11 β -HSD1 a cytosolické 17 β -HSD1 (Schuster a kol. 2008). Pokud bychom chtěli porovnávat inhibiční vliv určité látky, bylo by samozřejmě ideální jednou metodou stanovit IC₅₀ pro všechny sledované enzymy, což díky tomu, že metabolizují různé substráty tak není zcela možné.

Abychom zjistili vliv nalezených inhibitorů v komplexnějším vzorku, sledovali jsme vliv kvercetinu na redukční aktivitu celé lidské mikrosomální frakce. Pro srovnání jsme podobný experiment provedli také s kyselinou 18 β -glycyrretinovou (viz sekce 4.2.5). V přítomnosti 20 μ M kvercetinu došlo k poklesu celkové redukční aktivity o 17%, zatímco v případě 18 β -glycyrretinové kyseliny o 73%. Nižší pokles v případě kvercetinu je způsoben poměrně nízkou koncentrací vzhledem ke stanovené IC₅₀, zatímco koncentrace 18 β -glycyrretinové mnohonásobně převyšovala IC₅₀ pro 11 β -HSD1. Nicméně došlo i k očekávané změně ve stereospecifitě redukce oracinu. V přítomnosti kvercetinu, který inhibuje novou karbonylreduktasu, která vykazuje stereospecifitu pro (+)-DHO, došlo skutečně ve stereospecifitě mikrosomální frakce v redukci oracinu ke změně ve prospěch (-)-DHO, i když nebyla tato změna díky diskutované nízké koncentraci příliš velká. Naopak v přítomnosti 18 β -glycyrretinové kyseliny byla stereospecifita redukce oracinu výrazně posunuta ve prospěch (+)-DHO. Znalosti ohledně metabolismu oracinu v lidské jaterní mikrosomální frakci jsou poměrně omezené, z mikrosomálních enzymů byla popsána jen 11 β -HSD1 a námi zkoumaná mikrosomální karbonyl reduktasa, ale je víc než pravděpodobné, že existuje víc enzymů. Tyto enzymy mohou též metabolizovat oracin se stereospecifitou pro

(+)-DHO, což naznačují další získané frakce během purifikačního procesu, které nebyly zatím dále využity, což by vysvětlovalo, proč v přítomnosti kvercetinu došlo jen k malé změně stereospecifity ve prospěch (-)-DHO. Tento experiment by bylo ještě vhodné zopakovat s několika různými koncentracemi inhibitorů, aby mohl být sledován vliv těchto látek v závislosti na koncentraci.

7. ZÁVĚR

V dnešní době jsou stále objevovány nové lidské enzymy nebo nové funkce těchto enzymů. Je tedy důležité znát jejich strukturu a jejich vlastnosti. Mnoho z nich hraje důležitou roli v patogenezi různých onemocnění nebo v metabolismu různých léčiv. Budou-li tyto procesy pochopeny, usnadní se tak navrhování specifických léčiv působících přímo na dané struktury a bude zkvalitněna farmakoterapie nemocí.

Touto prací byl vytvořen přehled možných inhibitorů neznámé mikrosomální karbonylreduktasy a byl určen její nejsilnější inhibitor kvercetin. Tento inhibitor se velmi často vyskytuje v běžně používaných potravinách, ovoci, zelenině a v doplňcích stravy. Nicméně dokud nebude enzym identifikován a nebude určena jeho funkce v organismu, není možné dělat další závěry ohledně případného významu inhibice. V tuto chvíli lze nalezené inhibitory využít jen v *in-vitro* experimentech k rozlišení purifikovaných frakcí nebo potlačení vlivu daného enzymu.

8. ZKRATKY

| | |
|------------------|---|
| AcCoA | Acetylkoenzym A |
| AKR | Aldoketoreduktasy |
| ALDH | Aldehyddehydrogenasy |
| CBR | Karbonylreduktasa |
| CYP | Cytochrom P450 monooxygenasový systém |
| DHO | Dihydrooracin |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| E | Enzym |
| E2 | 17 β -estradiol |
| EC codes) | Mezinárodní kód pro označování enzymů (Enzyme Comission |
| GABA | Kyselina γ -aminomáselná |
| GST | Glutathion-S-transferasa |
| HMG-CoA | Hydroxymethylglutarylkoenzym A |
| HPLC | Vysokorychlostní kapalinová chromatografie |
| HSD | Hydroxysteroiddehydrogenas |
| I | Inhibitor |
| IC ₅₀ | Inhibiční konstanta |
| K | Kontrola |
| K _m | Micheliasova konstanta |
| KM | Kontrola s metanolem |
| MDR | Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem |
| NADH | Nikotinamid adenin dinukleotid |
| NADPH | Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát |
| pH | Záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů |
| QR | Chinonreduktasa |
| RNA | Ribonukleová kyselina |
| S | Substrát |
| SDR | Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem |
| UGT | UDP-glukuronyltransferasa |

9. LITERATURA

Bae E.A., Han M.J., Lee M. a Kim D.H. (2000) In vitro inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity. *Biol. Pharm. Bull.* 23, 1122-1124.

Barski O.A., Tipparaju S.M., Bhatnagar A. (2008) The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug. *Drug Metab Rev.* 40, 553-624.

Brožič P., Golob B., Gomboc N., Lanišnik Rižner T. a Gobec S. (2006a) Cinnamic acids as new inhibitors of 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (AKR1C3). *Mol. Cell. Endocrinolog.* 248, 233-235.

Brožič P., Lanišnik Rižner T. a Gobec S. (2008) Inhibitors of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1. *Curr. Med. Chem.* 15, 137-150.

Brožič P., Šmuc T., Gobec S. a Lanišnik Rižner T. (2006b) Phytoestrogens as inhibitors of the human progesterone metabolizing enzyme AKR1C1. *Mol. Cell. Endocrinolog.* 259, 30-42.

Byrns M.C., Penning T.M. (2009) Type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase (AKR1C3): Role in breast cancer and inhibition by non-steroidal anti-inflammatory drug analogs. *Chem. Biol. Inter.* 178, 221-227.

Carlquist M., Frejd T., Gorwa-Grauslund M.F. (2008) Flavonoids as inhibitors of human carbonyl reductase 1. *Chem. Biol. Inter.* 174, 98-108.

Dhagat U., Carbone V., Chung R.P.T., Matsunaga T., Endo S., Hara A. a El-Kabbani O. (2007) A Salicylic Acid-Based Analogue Discovered from Virtual Screening as a Potent Inhibitor of Human 20alpha-Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Med. Chem.* 3, 546-550.

Doostdar H., Burke M.D. a Mayer R.T. (2000) Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology* 144, 31-38.

Endo S., Matsunaga T., Soda M., Tajima K., Zhao H., El-Kabbani O. a Hara A. (2010) Selective Inhibition of the Tumor Marker AKR1B10 by Antiinflammatory N-Phenylanthranilic Acids and Glycyrrhetic Acid. *Biol. Pharm. Bull.* 33(5), 886-890.

Ferguson. (2001) Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. res.* 475, 89-111.

Galati G., Teng S., Moridani M.Y., Chan T.S. a O'Brien P.J. (2000) Cancer chemoprevention and apoptosis mechanismus induced by dietary polyphenolics. *Drug Metabol. Drug Interact.* 17, 311-349.

Hodek P., Trefil P., Stiborová M. „Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. (2002) *Chemico-Biological Inter.* 139, 1-21.

Hoffman F., Maser E. (2007) Carbonyl reductase and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenase of the short chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metab. Rev.* 39, 87-144.

Hollman P.C., Katan M.B. (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. Pharmacother.* 51, 305-310.

Internet1 - *Ronnie.cz* > *Flavonoidy*. [cit. 2009-12-6]. Dostupné z: <<http://medicina.ronnie.cz/c-330-flavonoidy.html>>.

Internet2 - *Eliminace léčiv*. [cit. 2010-4-12]. Dostupné z: <<http://www.faf.cuni.cz/~staud/lectures%5Cobecn%C04-metabolismus.pdf>>.

Internet3 - *Flavan*. [cit. 2010-3-20]. Dostupné z: <www.morelife.org/figures/flavan.jpg>.

Internet4 - *Enzym* - *Wikipedie*. [cit. 2010-3-21]. Dostupné z: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Enzym>>.

Internet5 - AKR Superfamily, AKR Members. [cit. 2010-4-12]. Dostupné z: <<http://www.med.upenn.edu/akr/members.shtml>>.

Internet6 - Číslo EC - Wikipedie. [cit. 2011-1-25]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/%C4%8C%C3%ADslo_EC>.

Internet7 - Enzyme Nomenclature. [cit. 2011-1-25]. Dostupné z: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>.

Internet8 - List of EC Numbers - Wikipedia. [cit. 2011-1-25]. Dostupné z: <[http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_EC_numbers_\(EC_1\)](http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_EC_numbers_(EC_1))>.

Internet9 - Liber Herbarum Minor. [cit. 2011-2-3]. Dostupné z: <<http://www.liberherbarum.com/minor/cz/PnIndex17.htm>>.

Internet10 - 3-hydroxyflavone - Wikipedia. [cit. 2011-2-3]. Dostupné z: <<http://en.wikipedia.org/wiki/3-hydroxyflavone>>.

Knowles L.M., Zigrossi D.A., Tauber R.A., Hightower C. a Milner J.A. (2000) Flavonoids suppress androgen-dependent human prostatic tumor proliferation. *Nutr. Cancer* 38, 116-122.

Krazeisen A., Breitling R., Möller G. a Adamski J. (2001) Phytoestrogens inhibit human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Mol. Cell. Endocrinol.* 171, 151-162.

Kvasničková, E. (1995) *Xenobiochemie*. Praha: Karolinum.

Laštovková Linda (2008): Klonování a exprese lidské karbonylreduktasy CR-1. Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové.

Ledvina M., Stoklasová A. a Cerman J. (2006) Biochemie pro studující medicíny. Praha: Karolinum.

Lukacik P., Kavanagh K.L. a Oppermann U. (2006) Structure and function of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 248, 61-71.

Maser E., Völker B. a Friebertshäuser J. (2002) 11 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 from Human Liver: Dimerization and Enzyme Cooperativity Support Its Postulated Role as Glucocorticoid Reductase. *Biochemistry*. 41, 2459-2465 .

Moon Y.J., Wang X. a Morris M.E. (2006) Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro*. 20, 187-210.

Nagasaki S., Miki Y., Akahira J., Suzuki T. a Susano H. (2009) 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases in Human Breast Cancer. *Steroid Enzymes and Cancer*. 1155, 25-32.

Nebert D.W., Dieter M.Z. (2000) The evolution of drug metabolism. *Pharmacology* 61, 124-135.

Novotná R., Wsól V., Xiong G. a Maser E. (2008) Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3. *Toxicology Letters*. 181, 1-6.

Oppermann U.C.T., Maser E. (2000) Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology*. 144: 71-81.

Persson B., Hedlund J. a Jörnvall H. (2008) The MDR superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65, 3879-3894.

Persson B., Kallberga Y., Brayd J.E., Bruforde E. a Dellaporta S.L. (2009) The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes). *Chemico-Biological Interactions*. 178, 94-98.

Poirier, D. (2003) Inhibitors of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases . *Curr. Med. Chem.* 10, 453-477.

Primiano T., Yu R. a Kong A.N.T. (2001) Signal transduction events elicited by natural products that function as cancer chemopreventive agents. *Pharm. Biol.* 39, 83-107.

Rice-Evans, C. (2001) Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 8, 797-807.

Roberts-Kirchhoff E.S., Crowley J.R., Hollenberg P.F. a Kim H. (1999) Metabolism of genistein by rat and human cytochromes P450s. *Chem. Res.Toxicol.* 12, 610-616.

Sahu S.C., Gray G.C. (1994) Kaempferol-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Lett.* 85, 159-164.

Sanderson J., McLauchlan W.R., Williamson G. (1999) Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced oxidation of the rat lens. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 639-645.

Sheehan, D. M. (1998) Hrbal medicines, phytoestrogens and toxicity: risk: benefit consideration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217, 379-385.

Schuster D., Nashev L. G., Kirchmair J., Laggner Ch., Wolber G., Langer T. a Odermatt A. (2008) Discovery of Nonsteroidal 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 Inhibitors by Pharmacophore-Based Screening of Virtual Compound Libraries. *J. Med. Chem.* 51, 4188-4199.

Schweizer R.A.S., Atanasov A.G., Frey B.M., Odermatt A. (2003) A rapid screening assay for inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases (11beta-HSD): flavanone selectively inhibits 11beta-HSD1 reductase activity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 212, 41-49.

Silva I.D., Gaspar J., da Costa G.G., Rodrigues A.S., Laires A. a Rueff J. (2000) Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity: potential implication in their use as therapeutical agents. *Chem. biol. Interact.* 124, 29-51.

Silva I.D., Rodrigues A.S., Gaspar J., Laires A. a Rueff J. (1997) Metabolism of galangin by rat cytochromes P450: relevance to the genotoxicity of galangin. *Mutat. Res.* 393, 247-257.

Skálová, L. (2008): Biotransformační studie. Přednáška xenobiochemie. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové.

Skarka A., Škarydová L., Štambergová H. a Wsól V. (2010) Anthracyclines and their metabolism in human liver microsomes and the participation of the new microsomal carbonyl reductase. *Chemico-Biological Interactions.* .

Skarka Adam (2008): Purifikace a charakterizace vybrané lidské mikrosomální reduktasy. Diplomová práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové.

Škarydová L., Skarka A., Novotná R., Živná L., Martin H.J., Wsól V. a Maser E. (2009a) Partial purification and characterization of a new human membrane-bound carbonyl reductase playing a role in the deactivation of the anticancer drug oracin. *Toxicology.* 264, 52-60.

Škarydová L., Živná L., Xiong G., Maser E. a Wsól V. (2009b) AKR1C3 as a potential target for the inhibitory effect of dietary flavonoids. *Chem. biol. Inter.* 178, 138-144.

Škarydová Lucie (2009): Role reduktas v nádorovém onemocnění. Disertační práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové.

Tang W., Stearns R.A. (2001) Heterotropic cooperativity of cytochrome P450 3A4 and potential drug-drug interactions. *Curr. Drug Metab.* 2, 185-198.

Van der Weide J., Steijns L.S.W. (1999) Cytochrome P450 enzyme system: genetic polymorphisms and impact on clinical pharmacology. *Ann. Clin. Biochem.* 36, 722-729.

Venkataramanan R., Ramachandran V., Komoroski B.J., Zhang S.M., Schiff P.L. a Strom S.C. (2000) Milk thistle, a herbal supplement, decreases the activity of CYP 3A4 and uridine diphosphoglucuronosyl transferase in human hepatocyte cultures. *Drug Metab. Dispos.* 28, 1270-1273.

Walle T., Otake Y., Brubaker J.A., Walle U.K. a Halushka P.V. (2001) Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 51, 143-146.

Walle U.K., Nolan A. a Walle T. (2001) Evidence of covalent binding of the flavonoid quercetin to protein in human cell cultures in vivo. *FASEB J.* 15, A986.

Wsól V., Skálová L., Szotáková B., Trejtnar F. a Kvasničková E. (1999) Sex differences in stereospecificity of oracin reductases in rat in vitro and in vivo. *Chirality*, 11, (5-6) 505-509.

Wsól V., Szotáková B., Skálová L. a Maser E. (2004) The novel anticancer drug oracin: different stereospecificity and cooperativity for carbonyl reduction by purified human liver 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Toxicology.* 197, 253-261.

Wsól, V. (2008): Redukční enzymy. Přednáška xenobiochemie. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové.

Xu H.X., Lee S.F. (2001) Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytother. Res.* 15, 39-43.

10. PŘÍLOHY

Příloha 1: Výskyt jednotlivých flavonoidů použitých v experimentální části.

Příloha 2: Abstrakt z konference 15th International Meeting Enzymology and Molecular biology of Carbonyl metabolism, 6-11 July 2010, Lexington, USA.

Skarydova, L., Lastovkova, L., Wsol, V. Flavonoids as inhibitors of a new human microsomal carbonylreductase participating in metabolism of xenobiotics, 15th International Meeting Enzymology and Molecular biology of Carbonyl metabolism, 6-11 July 2010, Lexington, USA.

Příloha 1: Výskyt jednotlivých flavonoidů použitých v experimentální části.

| Název flavonoidu | Místo výskytu |
|-------------------------|--|
| Vitexin | Hloh obecný, mučenka opletní, kakaovník obecný, kukuřice, čajovník čínský, rooibos, pohanka obecná, sója, majoránka, oregano (Internet9). |
| 2'-hydroxyflavanon | Červené a žluté plody ovoce a zeleniny (Škarydová a kol. 2009b). |
| 4'-hydroxyflavanon | Červené a žluté plody ovoce a zeleniny (Škarydová a kol. 2009b). |
| 3-hydroxyflavon | Syntetický (Internet10). |
| 5-hydroxyflavon | Červené a žluté plody ovoce a zeleniny (Škarydová a kol. 2009b). |
| 7-hydroxyflavon | Červené a žluté plody ovoce a zeleniny (Škarydová a kol. 2009b). |
| Kvercetin | Řepík lékařský, cibule kuchyňská, česnek kuchyňský, kopr vonný, celer, medvědice lékařská, křen selský, oves setý, měsíček lékařský, čajovník čínský, kmín, rybíz černý, heřmánek pravý, grep, šafrán, mrkev obecná, pohanka obecná, fenýkl obecný, jahodník obecný, sója luštinatá, jabloň domácí, chmel otáčivý, pupalka dvouletá, olivovník evropský, meruňka, švestka, hrušeň, zázvor (Internet9). |
| Kávová kyselina | Bez černý, echinacea, lípa, bříza, mrkev, med, šalvěj lékařská, jablka, meduňka, máta, vinná réva, vlašské ořechy, borůvky, zelená káva, roibos (Internet9). |
| Naringerin | Grep, pomeranč, chmel, ostropestřec mariánský, přeslička, čajovník, citróny, sója, petržel, broskvoň, mateřídouška (Internet9). |
| Chlorogenová kyselina | Bez černý, roibos, echinacea, mrkev, meduňka, máta, zelená káva, lípa, artyčok zahradní, brambory, pivo, bříza, jablka, rajčata, čajovník, břechťan (Internet9). |
| Rutin | Citrusové plody, lípa, artyčok zahradní, pivo, bříza, rajčata, třezalka tečkovaná, pohanka, chřest, jablka, broskve, |

| | |
|----------------------------|---|
| | nektarinky, lesní plody, kiwi, banány, výluh ze zeleného a černého čaje (Internet9). |
| 4-hydroxybenzoová kyselina | Borůvky, třezalka tečkovaná, ječmen, pupalka, rýže, ostružiník maliník, cibule, česnek, medvědice lékařská, mrkev, fenykl, hrách, vinná réva, zázvor, křen selský, jitrocel, pohanka, oves setý, měsíček lékařský, čekanka, sója (Internet9). |
| Kvercitrin | Řepík lékařský, kopr vonný, medvědice lékařská, bříza bělokorá, čajovník čínský, čekanka, grepfruit, hloh obecný, mrkev obecná, sója luštinatá, chmel otáčivý, třezalka tečkovaná, lilek rajče, jabloň domácí, máta dlouholistá, pepřovník černý, meruňka obecná, broskvoň obecná, rybíz černý, špenát setý, kakaovník obecný, lípa, borůvka, vinná réva (Internet9). |
| Epigallocatechin | Čajovník čínský, borůvky, vinná réva (Internet9). |
| Kyanin | Zázvor, vinná réva (Škarydová a kol. 2009b). |
| Luteolin | Celer, bříza bělokorá, řepík lékařský, paprika, heřmánek pravý, mrkev obecná, třezalka tečkovaná, levandule lékařská, jabloň domácí, máta peprná, bazalka, olivy, jitrocel, rozmarýn lékařský, šalvěj lékařská, ostropestřec mariánský, lilek brambor, kakaovník obecný, vinná réva, kozlík lékařský (Internet9). |
| Taxifolin | Přeslička rolní, višně, ostropestřec mariánský (Internet9). |
| Silibinin | Ostropestřec mariánský, cibule, ananas, celer, kmín, kokos, jahodník, čočka, máta, mandloň, rozmarýn, brambory, zázvor (Internet9). |
| Apigenin | Česnek kuchyňský, kopr vonný, celer, čajovník čínský, višně, heřmánek pravý, mrkev obecná, jabloň domácí, bazalka pravá, olivy, petržel zahradní, šalvěj lékařská, ostropestřec mariánský, kakaovník obecný (Internet9). |

Příloha 2: Abstrakt z konference 15th International Meeting Enzymology and Molecular biology of Carbonyl metabolism, 6-11 July 2010, Lexington, USA.

Flavonoids as inhibitors of a new human microsomal carbonyl reductase participating in metabolism of xenobiotics

Skarydova, Lucie, Lastovkova, Linda and Wsol, Vladimir

Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

Phone: 00420737987467 E-mail: lucie.skarydova@faf.cuni.cz Fax:

Flavonoids are naturally occurring polyphenolic compounds that are produced by plants. They may confer health benefits with respect to cardiovascular diseases, cancer etc. One important way is that flavonoids modulate enzyme activities. Some of the enzymes modulated are key enzymes in the metabolism of xenobiotics. Others take part in phase I and phase II biotransformation of xenobiotics. Carbonyl reducing enzymes are inhibited by some flavonoids as well. The inhibition of carbonyl reductases by flavonoids has been reported especially for cytosolic carbonyl reductases (e.g. CBR1, 17 β -HSD1) but the inhibition has been described also for membrane-bound carbonyl reductases (e.g. 11 β -HSD1). The potency of particular flavonoids is diverse for various enzymes however no flavonoid has been determined, so far, as a specific and potent inhibitor for certain carbonyl reducing enzymes.

Knowledge of membrane-bound carbonyl reductases is generally not as widespread as that of cytosolic forms. There are several membrane-bound carbonyl reductases that participate in metabolism of xenobiotics but it has been reported that there is only one well-known carbonyl reductase that contributes significantly to the metabolism of drugs – 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11 β -HSD1). Recently our workgroup purified a new microsomal carbonyl reductase from human liver [1] that was proven to metabolize some xenobiotics (oracin, daunorubicin, idarubicin). The fraction containing the new enzyme was incubated with the anticancer drug oracin in the presence of an NADPH-generating system and particular flavonoids. The reductive activity was measured by the HPLC method for the determination of oracin metabolite 11-dihydrooracin. A set of flavonoids was dissolved in a mixture of water/methanol and screening of their inhibition potency was performed at a concentration of 20 μ M. The flavonoids possessing the highest inhibition efficiency were further tested in concentrations ranging from 1 to 50 μ M and their inhibitory effect on the new enzyme was characterized by IC₅₀ values.

The highest potency in the inhibition of the new human microsomal carbonyl reductase displayed quercetin, caffeic acid and apigenin. Their IC₅₀ values ranged from 2.3 to 5.1 μ M. Although the new enzyme has not been fully identified so far, it is clear from this inhibition study that, among other characteristics, it differs from 11 β -HSD1. It has been reported that quercetin and apigenin do not inhibit 11 β -HSD1 or do so with very low potency. Other substances that display weaker inhibition effect on the new microsomal carbonyl reductase are silibinin, chlorogenic acid and rutin. All mentioned substances are commonly present in the human diet but there is still a lack of information about the intake from food and bioavailability in humans.

This work was supported by Grant Agency of Charles University (GAUK 45508/C/2008).

[1] Skarydova et al. (2009), *Toxicology*, 264, 52-60.