

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Kateřina Višněvská

Rostlinné alkaloidy a jejich vliv na enzymy metabolisující xenobiotika

Plant alkaloids and their effects on enzymes metabolizing xenobiotics

Bakalářská práce

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Kateřina Višněvská

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za kvalitní odborné vedení, všestrannou pomoc, cenné rady a trpělivý přístup při vypracování bakalářské práce.

Práce byla vypracována jako součást řešení grantových vědeckých projektů podporovaných GAČR (P301/10/0356 a 301/09/0472) a MŠMT ČR (MSM 0021620808 a 1M0505).

OBSAH

Seznam použitých zkratk	6
Abstrakt	8
Abstract	9
1. Úvod	10
1.1. Kancerogenese	10
1.1.1. Nádorová onemocnění.....	10
1.1.1.1. Faktory způsobující nádorové onemocnění.....	10
1.1.2. Mechanismus kancerogenese.....	11
1.2. Biotransformace xenobiotik	13
1.3. Enzymy biotransformující cizorodé látky oxidačními reakcemi	14
1.3.1. Monooxygenasy.....	14
1.3.1.1. Cytochromy P450.....	15
1.3.1.1.1. Reakční mechanismus cytochromu P450.....	16
1.3.2. Peroxidasy.....	18
1.4. Enzymy biotransformující cizorodé látky redukčními reakcemi	20
1.4.1. NADPH:chinonoxidoreduktasa.....	20
1.4.2. Xanthinoxidasa.....	21
1.4.3. NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa.....	21
2. Cíl práce	23
3. Alkaloidy	24
3.1. Sanguinarin a chelerythrin	24
3.1.1. Chemické vlastnosti sanguinarinu a chelerythrinu.....	25
3.1.2. Metabolismus sanguinarinu a chelerythrinu.....	26
3.1.2.1. Interakce sanguinarinu a chelerythrinu s receptorem pro polycyklické aromatické uhlovodíky (AhR) a cytochromy P450 1A.....	27
3.1.3. Pozitivní účinky sanguinarinu a chelerythrinu na organismy.....	28
3.1.3.1. Vztah sanguinarinu a chelerythrinu k apoptóze.....	28
3.1.3.2. Využití sanguinarinu a chelerythrinu jako supravitální sondy.....	30
3.1.4. Negativní účinky sanguinarinu a chelerythrinu na organismy.....	31
3.2. Ellipticin	32

3.2.1. Metabolismus ellipticinu.....	32
3.2.1.1. Indukce ellipticinu prostřednictvím Ah receptoru.....	35
3.2.2. Pozitivní účinky ellipticinu na organismy.....	36
3.2.2.1. Antitumorová aktivita ellipticinu.....	36
3.2.2.1.1. Apoptóza indukovaná ellipticinem.....	37
3.2.3. Negativní účinky ellipticinu na organismy.....	38
3.3. Aristolochové kyseliny.....	39
3.3.1. Metabolismus aristolochových kyselin.....	40
3.3.2. Pozitivní účinky aristolochových kyselin na organismy.....	41
3.3.3. Negativní účinky aristolochových kyselin na organismy.....	42
3.3.3.1. Karcinogenní účinky aristolochových kyselin.....	42
3.3.3.2. Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami.....	43
3.3.3.3. Balkánská endemická nefropatie.....	44
3.4. Flavonoidy.....	45
3.4.1. Chemické vlastnosti flavonoidů.....	47
3.4.2. Metabolismus flavonoidů.....	47
3.4.2.1. Interakce flavonoidů s cytochromy P450.....	48
3.4.2.2. Estrogenní a antiestrogenní účinek flavonoidů.....	49
3.4.3. Pozitivní účinky flavonoidů na organismy.....	50
3.4.4. Negativní účinky flavonoidů na organismy.....	50
4. Závěr.....	52
Seznam použité literatury.....	56

Seznam použitých zkratek

3-MC	3-methylcholanthren
AA	aristolochové kyseliny
AAI	aristolochová kyselina I
AAIa	aristolochová kyselina Ia
AAII	aristolochová kyselina II
AAN	nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami
AhR	receptor pro polycyklické aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor)
ARNT	jaderný translokátor pro polycyklické aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon nuclear translocator)
ATP	adenosintrifosfát
Bax	proapoptický protein
Bcl-2	antiapoptický protein
BEN	balkánská epidemická nefropatie
BNF	β -naftoflavon
COX-1	cyklooxygenasa-1
COX-2	cyklooxygenasa-2
CYP	cytochrom P450
dA – AAI	7-(deoxyadenosin-N ⁶ -yl)aristolaktam I
dA – AAI	7-(deoxyadenosin-N ⁶ -yl)aristolaktam II
dG – AAI	7-(deoxyguanosin-N ² -yl)aristolaktam I
DHSA	dihydrosanguinarin
CHE	chelerythrin
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
KBA	kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy
LPO	laktoperoxidasa
MFO	mikrosomální systém monooxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)
monoHER	7-mono-O-(β -hydroxyethyl)-rutosid
MPO	myeloperoxidasa

NF- κ B	jaderný transkripční faktor kappa B
NQO1	NADPH:chinonoxidoreduktasa
<i>p53</i>	tumor supresorový gen
SA	sanguinarin
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
UV	ultrafialové záření

Abstrakt

Sanguinarin a chelerythrin jsou benzo[c]fenanthridinové alkaloidy. Prvním krokem metabolismu sanguinarinu je jeho redukce za vzniku dihydrosanguinarinu. Antimikrobiální a protizánětlivé účinky jsou využívány ve stomatologii a jako aditiva v krmivu zvířat. Sanguinarin i chelerythrin indukuje apoptózu buněk. Schopnost fluorescence alkaloidu a interkalace do DNA má potenciální využití ve značení DNA supravitálními sondami. Mezi negativní účinky sanguinarinu a chelerythrinu patří jejich genotoxicita.

V metabolismu ellipticinu hrají základní roli cytochromy P450 a peroxidasy. Ellipticin je potenciální agens pro léčbu rakoviny s vícenásobným mechanismem působení. Ellipticin interkaluje do DNA a inhibuje topoisomerasu II. Po aktivaci ellipticinu CYP a peroxidasami tvoří s DNA kovalentní adukty. Antitumorová aktivita ellipticinu a jeho derivátů se také vyznačuje kombinací mechanismů zastavení buněčného cyklu a indukci apoptózy. Farmakologický účinek a genotoxický vedlejší účinek je modulován cytochromy P450 a peroxidasami v cílové tkáni.

Majoritní metabolity biotransformace aristolochových kyselin jsou aristolaktamy. Nitroredukce aristolochových kyselin je stěžejním krokem vzniku aktivního metabolitu *N*-hydroxyaristolaktamu. Aristolochové kyseliny vykazují nefrotoxické a kancerogenní účinky. Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami se vyznačuje intersticiální fibrosou ledvin, která směřuje k totálnímu selhání ledvin. U pacientek se projevila i rakovina uroteliálního traktu. Existují určité podobnosti mezi touto chorobou a balkánskou endemickou nefropatií.

Flavonoidy jsou fytochemické sloučeniny, které se vyznačují antioxidantní aktivitou a schopností modulovat některé enzymy nebo buněčné receptory. Flavonoidy jsou metabolizovány střevní mikroflórou. Tyto alkaloidy s antiestrogenním účinkem vykazují protirakovinnou aktivitu zejména ve tkáni, kde je metabolismus ovlivňován hormony. Některé flavonoidy mohou vykazovat i cytotoxické, mutagenní a prooxidační účinky.

Klíčová slova: Cytochrom P450, peroxidasa, NADPH:chinonoxidoreduktasa, sanguinarin, chelerythrin, apoptóza, Ah receptor, ellipticin, aristolochové kyseliny, nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami, balkánská endemická nefropatie, flavonoidy, antioxidant

Abstract

Sanguinarine and chelerythrine are quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids. The first step in sanguinarine metabolism is its reduction to dihydrosanguinarin. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of these alkaloids are used in dentistry and as feed additives. Sanguinarine and chelerythrine induce apoptosis of cells. Fluorescence of these alkaloids and intercalation into DNA could be utilized to use the alkaloids as supravital DNA probe. Negative effect of sanguinarine and chelerythrine is their genotoxicity.

Cytochrome P450 and peroxidase oxidize ellipticine to detoxication and activation metabolites. Ellipticine is a potent antineoplastic agent exhibiting the multimodal mechanism of its action. Ellipticine intercalates into DNA and inhibits topoisomerase II. Covalent DNA adducts are mediated by CYP or peroxidase oxidation of ellipticine. The anti-tumor activity of ellipticine and its derivatives is caused by a combination mechanism of cell cycle arrest and induction of the apoptotic pathway. Pharmacological efficiencies and geneotoxic side effects of ellipticine is dependent on levels and activities of cytochrome P450 or peroxidase in target tissues.

Aristolactams are the major metabolites of biotransformation of aristolochic acid. Nitroreduction is the crucial step in formation of an AA reactive metabolite, *N*-hydroxyaristolactam. Aristolochic acid is naturally occurring nephrotoxin and carcinogen. Aristolochic acid nephropathy (AAN) is a type of rapidly progression interstitial fibrosis, which is responsible for destructive fibrotic process in the kidney caused by AA. AAN patients also suffer urothelial cancer. Balkan endemic nephropathy is similar type of nephropathy as AAN, being suggest to be developed by AA.

Flavonoids represent a group of phytochemicals with antioxidant properties and ability to modulate several enzymes or cell receptors. Flavonoids are metabolized mainly in the gut by colon microflora. Flavonoids having an anti-estrogenic effect show an anti-cancer activity, especially in relation to hormone-dependent tissues. However, not all flavonoids are beneficial. Some flavonoids have cytotoxic, mutagenic and prooxidant effects. (In Czech)

Keywords: Cytochrome P450, peroxidase, NADPH:chinonoxidoreductase, sanguinarine, chelerythrine, apoptosis, aryl hydrocarbon receptor, ellipticine, aristolochic acid, aristolochic acid nephropathy, balkan endemic nephropathy, flavonoids, antioxidant

1. ÚVOD

1.1. Kancerogenese

Kancerogenese neboli karcinogenese je dlouhodobý proces s pozdními účinky projevu. Jedná se o mnohastupňový proces, při němž dochází ke kumulaci poruch určitých genů, které vedou k narušení normální funkce jimi kódovaných proteinů. Nejzávažnější jsou poruchy genů pro proteiny podílející se na přenosu signálu, kontrole správnosti replikace DNA a chromosomů, regulaci dělení, diferenciaci a buněčném cyklu. (Stratil et al., 2004) Kancerogenese je proces vzniku nádorů, který je ovlivněn pohlavím, rasou a genetickým polymorfismem řady enzymů a proteinů. Maligní nádor vzniklý z epiteliálních buněk se nazývá karcinom, nádor vzniklý z podpůrných buněk nebo pojivových tkání je označován jako sarkoma. (Stiborová, <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 11.3. 2011)

1.1.1. Nádorová onemocnění

V ekonomicky vyspělých zemích jsou nádorová onemocnění jedním z nejčastějších příčin úmrtí. V poslední době tato choroba postihuje i nižší věkové ročníky. Příčinou je větší množství karcinogenních složek v životním prostředí, stres, špatný životní styl (kouření) a nekvalitní strava bohatá na tuky a cukry. (Stiborová, <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 11.3. 2011)

1.1.1.1. Faktory způsobující nádorové onemocnění

Při vzniku zhoubných nádorů se uplatňují vnější a vnitřní faktory. V lidském organismu obvykle spolupůsobí více karcinogenních faktorů v menším množství po delší dobu a jejich účinek se vzájemně sčítá nebo násobí. (Stratil et al., 2004) Faktory způsobující nádorová onemocnění jsou fyzikální, biologické a chemické.

Fyzikální faktory zahrnují různé druhy záření (radioaktivní, UV záření). Tyto faktory způsobují poškození DNA například tvorbou pyrimidinových dimerů nebo jednořetězových a dvouřetězových zlomů.

(Křemen,

http://ubeo.lf1.cuni.cz/Studenti/Texty/MOLEKULARNI%20KARCINOGENEZE_2009_10.pdf.

11.3. 2011)

Mezi **biologické** faktory patří onkoviry, porucha imunity a genetické předpoklady.

(Stiborová,

<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>,

11.3. 2011)

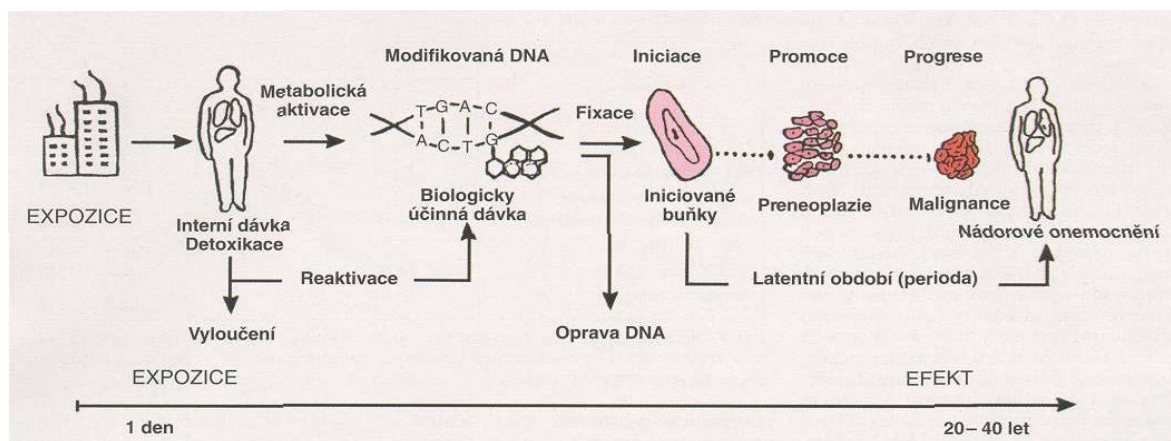
Dalším faktorem způsobující nádorové onemocnění jsou **chemické** kancerogeny, které různým způsobem pozměňují DNA. Podle mechanismu působení lze chemické kancerogeny rozdělit na genotoxické, které vytvářejí s DNA kovalentní adukty. Většina karcinogenů tvořících s DNA adukty vyžadují metabolickou aktivaci. (Stiborová, <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>,

11.3. 2011) Druhá skupina karcinogenů rozdělená podle mechanismu působení vytváří změny ve struktuře DNA, způsobuje například jedno-řetězové a dvou-řetězové zlomy DNA nebo cross-linking (propojení molekul). Třetí skupinou jsou epigenetické kancerogeny, které modifikují molekulu DNA nekovalentními interakcemi (například vmezeřením do šroubovice DNA). (Stiborová, <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 11.3. 2011)

1.1.2. Mechanismus kancerogeneze

Jak již bylo uvedeno výše, kancerogeneze je vícestupňový proces, kde dochází ke kumulaci poruch genů vedoucích k tvorbě nádorů. Pro kancerogenesi jsou klíčové dvě skupiny genů. První skupina jsou **protoonkogeny** a jejich produkty onkoproteiny (např. Ras, Raf, Sis). Druhou skupinou jsou **tumor supresorové geny** a jejich produkty tumor supresorové proteiny (např. gen *p53*). Tyto dvě skupiny genů regulují buněčný cyklus, dělení a diferenciaci buněk. (Stiborová, <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 11.3. 2011) Mutací protoonkogenů vznikají onkogeny, které způsobují nádorové bujení. Mutace tumor supresorových genů inaktivuje inhibitory cyklin dependentních kinas. Mutace u obou skupin genů způsobí neregulovaný buněčný růst. (Stiborová, Biochemie jako teoretický základ biomedicíny, přednáška na PřF UK, katedra biochemie, Praha, 2011)

Proces kancerogeneze lze rozdělit alespoň do tří fází: iniciační, promoční a progresní. První fáze je **iniciační**. V buňce dochází k mutaci DNA vedoucí k aktivaci onkogenů nebo deaktivaci tumor supresorových genů. (Stiborová, <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 11.3. 2011) Pokud reparační systémy neopraví poškozenou DNA a mutace je persistentní, vzniká iniciovaná buňka. V případě, že iniciovaná buňka není zničena imunitním systémem, je vystavena faktorům s promočním účinkem a nastává fáze **promoční**, která může trvat i několik let. V iniciované buňce se dále mění její genetická informace a dochází k proliferaci buněk s porušenou diferenciací a mezibuněčnou komunikací. Vznikne benigní nádor. (Stiborová, <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 11.3. 2011) Tato fáze zvyšuje proliferaci primárně pozměněných buněk účinkem promotorů. Klíčovými faktory promoční fáze jsou zejména aktivity proteinkinas a fosfatas a jejich regulace. Růst nádoru ovlivňují i produkty onkogenů vzniklé jejich aktivací onkovirem, nebo jiným kancerogenním podnětem. (Stiborová, <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 11.3. 2011) Mezi kancerogenní podněty jsou řazeny např. oxidační změny DNA, způsobené radikálovými formami kyslíku. Poslední stadium kancerogeneze je **progresní fáze**, kterou lze přirovnat k iniciační fázi. Procesy modifikace DNA jsou však razantnější. Účinkem progresoru se mění částečně kontrolovatelný růst benigního nádoru na nekontrolovatelný růst a vzniká maligní nádor. Buňky odštěpené z maligního nádoru se mohou dostat krevním nebo lymfatickým oběhem do dalších tkání nebo orgánů, kde vytvářejí dceřiné nádory – metastázy. (Stiborová, <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 11.3. 2011) Na obrázku 1.1.2. je zobrazen mnohastupňový proces kancerogeneze.



Obr. 1.1.2.: Mechanismus kancerogeneze (převzato ze Stiborová, Mikšanová, 1999)

1.2. Biotransformace xenobiotik

Biotransformace xenobiotik je biochemický proces vedoucí k detoxikaci, nebo aktivaci cizorodé látky. Lipofilní látky se mohou kumulovat v organismu a nemohou být vyloučeny z těla přímo. Proto musí nejdříve podstoupit biotransformaci, kterou se přemění na látky s vyšší polaritou. Polárnější látka je po reakci s endogenními sloučeninami eliminována močí nebo výkaly. Ve většině případů biotransformace dochází ke snížení toxicity xenobiotik, ale v některých případech může probíhat zvýšení toxicity, tedy vznik aktivního metabolitu. Metabolickou aktivaci vyžadují např. léčiva. Touto cestou se aktivuje i řada kancerogenů. (Stiborová, <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 11.3. 2011) Hlavním biotransformačním orgánem xenobiotik jsou játra. Další orgány umožňující biotransformaci xenobiotik jsou například ledviny, plíce, střevo.

V živočišných organismech probíhá biotransformace xenobiotik ve dvou fázích. V první fázi biotransformace dochází k řadě reakcí, například k oxidačně – redukčním procesům. Zvýší se hydrofilita xenobiotika zavedením nebo odkrytím polárních skupin. Tato fáze se nazývá **derivatizační**. Reakce, které zde probíhají, jsou především oxidační (např. hydroxylace, dealkylace, deaminace). V menší míře probíhají i reakce redukční (např. nitroredukce, azoredukce), nebo reakce hydrolytické. Uvedenými reakcemi se zvýší polarita xenobiotik a lépe proběhne konjugace a vyloučení látky z organismu. (Stiborová, <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 11.3. 2011)

Klíčový enzymový systém katalyzující derivatizační fázi biotransformace je mikrosomální systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO) obsahující cytochrom P450. Enzymy jsou lokalizovány v endoplasmatickém retikulu a označovány jako mikrosomální (mikrosomy vznikají destrukcí endoplasmatického retikula při homogenizaci buněk). (Stiborová, <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 11.3. 2011) MFO systém je podrobně popsán dále.

Druhá fáze biotransformace je označovaná jako fáze **konjugační**. Dochází ke konjugaci xenobiotika s endogenními polárními látkami (např. s kys. glukuronovou, sulfátem z aktivního sulfátu, glutathionem). Tímto krokem dojde k dalšímu zvýšení hydrofility a usnadnění eliminace metabolitu z buněk a vyloučení z organismu. (Chromá et

al., 2001) Za významnou součást antikancerogenních procesů je považován enzym glutathion-S-transferasa, který je schopen vázat reaktivní metabolity. (Stiborová, <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 11.3. 2011) Ve druhé fázi biotransformace se opět může zvýšit toxicita metabolitu xenobiotika. Například konjugáty se sulfátem vzniklé z *N*-hydroxylovaných aromatických aminů vlivem sulfotransferas. Konjugát sulfátu s *N*-hydroxysloučeninami se v kyselém prostředí moči snadno rozpadá za vzniku nitreniového iontu. (Stiborová, <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 11.3. 2011)

1.3. Enzymy biotransformující cizorodé látky oxidačními reakcemi

Nejpočetnější skupinou enzymů biotransformující xenobiotika oxidačními reakcemi jsou enzymy označované jako oxygenasy (skupiny monooxygenasy a dioxygenasy). Oxygenasy pro svou aktivitu vyžadují molekulu kyslíku a přítomnost kofaktoru (např. přechodný kov, flavin). Monooxygenasy vážou jeden atom kyslíku do hydrofobního xenobiotika a druhý atom kyslíku se redukuje na vodu. Dioxygenasy inkorporují oba atomy kyslíku do molekuly substrátu. (Stiborová et al., 2004a)

1.3.1. Monooxygenasy

Mezi monooxygenasy patří flavinové monooxygenasy (jednosložkové nebo vícesložkové) a monooxygenasy se smíšenou funkcí (mixed function oxidases, MFO) obsahující cytochrom P450. (Stiborová et al., 2004a)

Flavinové monooxygenasy katalyzující monohydroxylaci aromatického kruhu substrátu obsahují buď jeden typ enzymového proteinu, nebo jsou vícesložkové. Flavinové kofaktory jednosložkových monooxygenas mohou existovat v semichinoidních formách, které jsou schopné reagovat s molekulou kyslíku. (Stiborová et al., 2004a) Dalším koenzymem je NADPH. (Taylor et al., 1990 in Stiborová et al., 2004a) Reakční cyklus je zahájen navázáním substrátu na proteinovou molekulu enzymu. Vytvořením komplexu

enzym – substrát dochází ke konformační změně, která urychluje přenos vodíku z NADPH na N5 isoalloxazinového cyklu flavinu. (Stiborová et al., 2004a) NADPH je oxidován a FAD je redukován. Na FADH₂ se následně naváže molekula kyslíku. Kyslík je redukován jednoelektronovými reakcemi na superoxidový anionradikál, ze kterého se dále tvoří 4a-hydroperoxyflavin. (Stiborová et al., 2004a) Pokud se na enzym naváže substrát, který není donorem elektornů, k hydroxylaci substrátu nedochází a hydroperoxyflavin se rozkládá na peroxid vodíku a FAD. Většina flavinových monooxygenas produkují hydroxylovaný produkt, kde je OH skupina v poloze *ortho*, ale jsou známy i monooxygenasy hydroxylojící *para* polohu molekuly substrátu. Živočišné flavinové monooxygenasy (tzv. Zieglerův enzym) jsou jednosložkové monooxygenasy lokalizované v endoplasmatickém retikulu. Tyto flavinové monooxygenasy hydroxylojí především terciální a sekundární aminy. V rostlinách podobné enzymy zatím identifikovány nebyly. (Stiborová et al., 2004a)

MFO systém je vícesložkový systém skládající se ze tří základních složek: cytochromu P450, flavoproteinového enzymu NADPH:cytochrom P450 reduktasy (slouží jako dělič elektronového páru) a membrány endoplasmatického retikula (membránové lipidy). (Stiborová,

<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>,

11.3. 2011) Existují látky, které mohou působit jako induktory enzymů systému MFO, tj. stimulují jejich zvýšenou expresi, a to zejména při dlouhodobé expozici xenobiotik. Mezi induktory cytochromů P450 patří např. polycyklické aromatické uhlovodíky, fenobarbital, ethanol a další. (Rusek, <http://webak.upce.cz/~uozp/skripta/uozp-skripta-tox-rusek.pdf>, 9.4. 2011) Enzymy systému MFO pak zvýšeně biotransformují induktory i řadu dalších xenobiotik.

1.3.1.1. Cytochromy P450

Cytochromy P450 jsou hemoproteiny. Porfyrinový skelet je v enzymu vázán hydrofobními vazbami a prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu. Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody. (Stiborová et al., 1999) Cytochrom P450 je terminální oxidasou MFO systému. Substrátová specifita cytochromů P450 je většinou široká. Hydroxylojí například polycyklické

aromatické uhlovodíky, alifatické uhlovodíky, polycyklické aromatické nitrosloučeniny, aromatické a alifatické aminy, fenoly a řadu léčiv. (Stiborová et al., 2004a)

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (izoenzymy a izoformy), které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry homologie jejich primární struktury proteinových molekul (aminokyselinové sekvence). (Stiborová et al., 2004a)

Pro zjednodušení se používá zkratka CYP (CYtochrome P450), za kterou je číslo značící rodinu (např. CYP1). Následuje písmeno označující podrodinu (např. CYP1A). Poslední číslo popisuje konkrétní gen (geny se značí kurzívou *CYP1A1*) či enzym (CYP1A1). (Stiborová,

<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>,

11.3. 2011)

CYP jsou lokalizovány zejména v játrech, dále je jejich koncentrace významná v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži a mozku. Z jaterních cytochromů P450 jsou hojně zastoupeny izoenzymy CYP1A2, 2A6, 2D6, 2C, 3E1 a 3A4. V jiných tkáních jsou významné např. CYP1A1, 2B6, 3A4. Cytochromy P450 podílející se na přeměně prokarcinogenů jsou zejména CYP1A1, 1A2, 2E1 a 3A4. (Stiborová et al., 1999) V eukaryotické buňce se vyskytují především v membráně endoplasmatického retikula, ale některé CYP jsou lokalizovány např. i v membráně mitochondrií. (Stiborová et al., 1999)

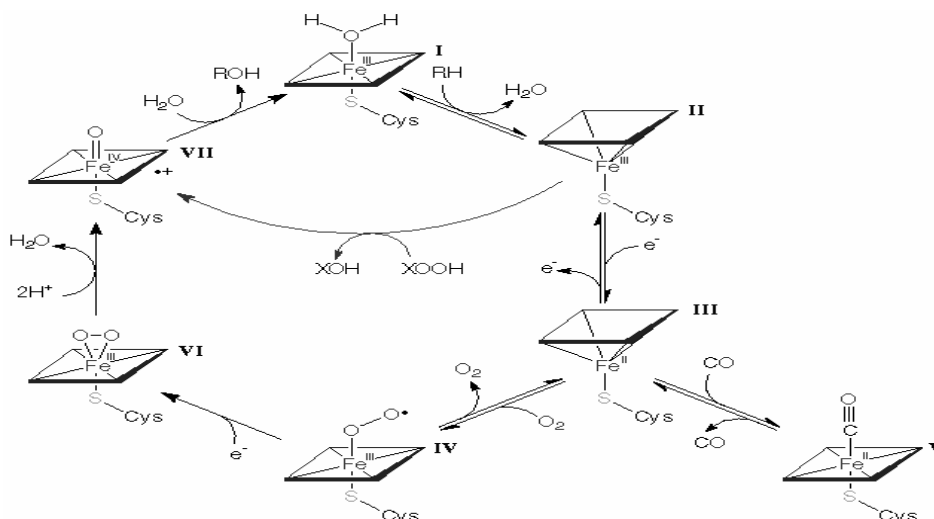
Variabilita obsahu cytochromů P450 v lidských tkáních je závislá na mnoha faktorech především na genetickém polymorfismu, vlivu vnějších podmínek (environmentální polulanty), stravě a věku. Genetický polymorfismus cytochromů P450 jsou vrozené změny DNA, které vedou k absenci některé formy cytochromu P450, k neschopnosti indukce CYP, nebo ke vzniku CYP se změněnou katalytickou aktivitou. Polymorfismus je definován jako geneticky podmíněná změna postihující alespoň 2% populace. Polymorfismus cytochromů P450 se liší u různých lidských ras. (Stiborová et al., 1999)

1.3.1.1.1. Reakční mechanismus cytochromu P450

Souhrně lze reakční mechanismus cytochromu P450 vyjádřit rovnicí:

$$RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NADP^+$$
, kde RH je substrát a ROH je hydroxylovaný produkt. Reakční cyklus cytochromu P450 sestává alespoň ze sedmi kroků (obrázek 1.3.1.1.1., str. 18). V klidovém stavu je hemové železo ve ferri formě (ox. číslo

III) a je hexakoordinováno (nízkospinový stav). Šestá valence je obsazena kyslíkem vody nebo interním (aminokyselinovým) ligandem. (Stiborová et al., 2004a) První krok reakčního mechanismu je navázání substrátu RH do aktivního místa enzymu, který vytěsňuje šestý ligand. Železo je v pentakoordinovaném stavu (vysokospinový stav). Zároveň dochází ke konformační změně v molekule enzymu. Ve druhém kroku je hemové železo redukováno NADPH:CYP reduktasou na ferro formu (Fe^{II}), přičemž zůstává pentakoordinované (vysokospinový stav). Takto přeměněný enzym je schopen navázat biatomickou molekulu kyslíku nebo jiné ligandy. Třetím krokem je navázání molekuly kyslíku za vzniku ternárního ferrisuperoxidového komplexu, kde je železo v nízkospinové formě a hexakoordinované. (Stiborová et al., 2004a) Ternární komplex je ve čtvrtém kroku opět redukován NADPH:CYP reduktasou za vzniku peroxidového aniontu. Pokud není druhý elektron dostatečně rychle doručen, komplex se rozpadá a uvolní superoxidový anionradikál, který je superoxidodismutasou přeměněn na peroxid vodíku. (Stiborová et al., 2004a) V komplexu cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku dochází v pátém kroku mechanismu k heterolytickému štěpení vazby mezi atomy kyslíku, přičemž jeden atom kyslíku je redukován za vzniku vody. Druhý atom kyslíku zůstává vázán na atom železa v hemu cytochromu P450 ve formě ferrioxenového komplexu. Ten je stabilizován mezomerním posunem elektronů z thiolátové síry na kyslík. Takto vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopen v šestém kroku vytrhnout atom vodíku z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylovaného radikálu vázaného na ion železa. V sedmém kroku dochází k rekombinaci radikálů za vzniku nativní formy cytochromu P450 a hydroxyderivátu substrátu (ROH), který je z enzymu uvolněn. (Stiborová et al., 2004a)



Obr. 1.3.1.1.1.: Reakční cyklus cytochromu P450 (převzato ze Stiborová et al., 2004a)

Na komplex III (obrázek 1.3.1.1.1.) se může místo kyslíku vázat rovněž oxid uhelnatý, který tak vazbu kyslíku inhibuje. V přítomnosti oxidačních činidel (např. peroxidu) může z komplexu III (obr. 1.3.1.1.1.) vznikat přímo komplex VII. Tato reakce probíhá neuspořádaným mechanismem a je označována jako peroxidasová aktivita cytochromu P450. Účinnost oxidace peroxidasovou aktivitou je nižší než reakce za přítomnosti NADPH a O_2 , a to z důvodu destrukce samotného enzymu. Peroxid vodíku způsobí degradaci hemu na reaktivní fragmenty, které se navážou do aktivního centra enzymu, a tím ho inaktivují. (Stiborová et al., 2004a)

1.3.2. Peroxidasy

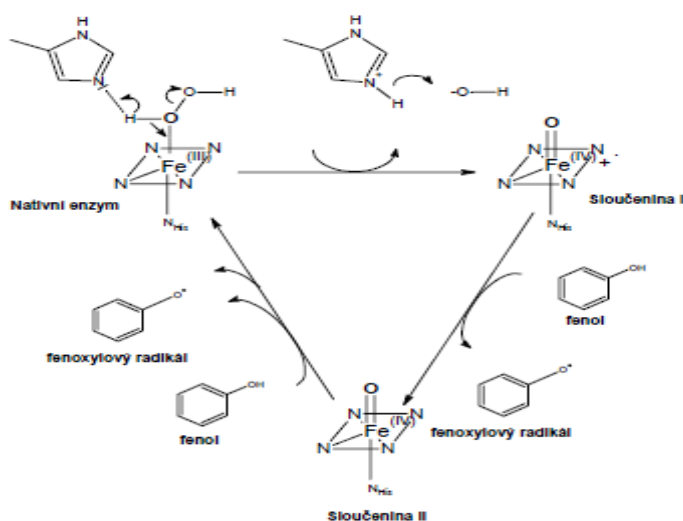
Peroxidasy se účastní biotransformace fenolů, azobarviv, aromatických aminů. Tyto enzymy redukují peroxid vodíku za současné oxidace další sloučeniny (endogenní sloučeniny nebo xenobiotika). Bohatě jsou obsaženy v rostlinách a nižších houbách, méně pak ve tkáních živočichů. (Stiborová et al., 2004a)

Peroxidasy katalyzují velké množství různých typů reakcí např. reakce vedoucí k dehydrogenaci, dále halogenaci a dehalogenaci (halogenperoxidasy), oxidaci halogenidů (myeloperoxidasa), oxidační kondenzaci aromatických aminů, oxidační polykondenzaci fenolů a jeho derivátů, dekarboxylační reakce a řadu dalších. (Stiborová et al., 2004a)

Peroxidasy jsou většinou hemoglykoproteiny, jejichž prosthetickou skupinu tvoří

obvykle ferriprotoporfyrin IX. Železo má oxidační číslo III a je pentakoordinované. Pátý ligand tvoří dusík histidylového zbytku proteinové části enzymu. Peroxidas lze rozdělit podle aktivního místa na: hemové, vanadové a ostatní peroxidasy. Nejpočetnější jsou peroxidasy, jejichž katalytické centrum obsahuje hem. (Stiborová et al., 2004a)

Reakční cyklus peroxidasy je zahájen vazbou peroxidu vodíku na nativní peroxidasu. Vznikne sloučenina I (obrázek 1.3.2.), která nese aktivovaný kyslík. Atom kyslíku je zde kovalentně vázán jako šestý ligand hemového železa s oxidačním číslem IV. (Stiborová et al., 2004a) Sloučenina I reaguje s molekulou substrátu za vzniku sloučeniny II (obr. 1.3.2.) a radikálu substrátu. Elektron, který je vytržen z molekuly substrátu, doplní deficit na porfyrinovém skeletu nebo na aminokyselinovém zbytku peroxidasy. Poslední krok reakčního cyklu peroxidasy je reakce sloučeniny II s další molekulou substrátu a vytvoří se nativní forma peroxidasy. Radikály substrátu vzniklé jedoelektronovou reakcí jsou uvolněny z vazebného místa peroxidasy volně do roztoku, kde reagují podle prostředí, nejčastěji za vzniku polymeračních produktů. (Stiborová et al., 2004a) Oxidační reakce katalyzované peroxidasami mohou vést k detoxikaci i k aktivaci xenobiotika. Například některé aminy (benzidín, 2-naftylamin) jsou peroxidasami aktivovány na reaktivní metabolity iniciující nádorové procesy u živočichů. (Stiborová et al., 2004a)



Obr. 1.3.2. Reakční cyklus peroxidasy (převzato ze Stiborová et al., 2004a)

1.4. Enzymy biotransformující cizorodé látky redukčními reakcemi

Redukční reakce jsou v první fázi biotransformace xenobiotik zastoupeny méně než reakce oxidační. Mezi enzymy katalyzující redukční reakce se řadí xanthinoxidasa, NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (DT-diaforasa) a v menší míře NADPH:CYP reduktasa. Redukční reakce jsou významné pro metabolismus nitro-aromátů a částečně i azobarviv. (Stiborová et al., 2004a)

1.4.1. NADPH:chinonoxidoreduktasa

NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (DT – diaforasa) je cytoplasmatický flavoprotein katalyzující dvouelektronové redukce chinonů a chinoidních sloučenin na hydrochinony, bez tvorby radikálových meziproduktů. Kromě chinonů redukuje DT-diaforasa i jiná nízkomolekulární xenobiotika, např. nitrosloučeniny a azobarviva. Jako donor elektronů využívá NADH i NADPH. DT – diaforasa je homodimer s prosthetickou skupinou FAD. (Stiborová et al., 2004a)

NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa je inducibilním enzymem. Existuje mnoho sloučenin, které mají schopnost indukovat DT – diaforasu, a tím ochránit organismus před toxickými látkami. Jedná se především o analogy azobarviv Sudanu I a Sudanu II, kumariny, flavonoidy, polycyklické aromatické uhlovodíky, sloučeniny obsahující ve své molekule síru, fenolické antioxidanty a další. (Stiborová et al., 2004a) NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa patří společně s CYP1A1 a 1A2 mezi enzymy indukované prostřednictvím Ah receptoru (receptor pro polycyklické aromatické uhlovodíky). Tímto mechanismem indukují DT – diaforasu například polycyklické aromatické uhlovodíky nebo azobarviva. Antiestrogeny (např. tamoxifen) stimulují expresi NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy prostřednictvím receptoru specifického pro estrogeny. (Stiborová et al., 2004a)

1.4.2. Xanthinoxidasa

Xanthinoxidasa je flavoprotein, který obsahuje ionty molybdenu a železa. Ionty molybdenu, jako kofaktor, jsou vázány v proteinové části enzymu. Xanthinoxidasa je cytoplasmatický enzym, homodimer, exprimovaný v mnoha tkáních, nejvíce v játrech. V jaterní tkáni se může vyskytovat i ve formě xanthindehydrogenasy, která je schopna navázat NAD^+ . (Stiborová et al., 2004a)

Xanthinoxidasa se v organismu účastní odbourávání purinových bází. Z purinů se odštěpí ribosa a zbylý guanin je metabolizován na xanthin, jenž je substrátem xanthinoxidasy. Xanthinoxidasa hydroxyluje xantin za vzniku kyseliny močové. (Stiborová et al., 2004a)

Intramolekulární transport elektronů v enzymu probíhá od atomu molybdenu k prosthetické skupině FAD. Mezi těmito dvěma centry se na elektronovém přenosu podílejí Fe se skupinami SH. Akceptorem elektronů je molekula kyslíku. Mezi inhibitory xanthinoxidasy se řadí allopurinol, který se využívá např. v léčbě hyperleukémií a je významným antioxidantem. (Racek et al., 1999)

1.4.3. NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa

NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa je membránově vázaný enzym lokalizovaný v endoplasmatickém retikulu. Obsahuje flavinové kofaktory FMN a FAD. Enzym je složkou monooxygenasového systému CYP a katalyzuje přenos elektronů z NADPH na cytochromy P450. Přenos elektronů byl pozorován také na cytochrom c a cytochrom b₅. NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa se skládá ze dvou funkčních domén. Hydrofóbní N-terminální doména je zakotvena v membráně. Hydrofilní C-terminální funkční doména je složena z FMN- a FAD- vazebné strukturní domény. (Stiborová et al., 2004a)

Na doménu s navázaným FAD se nekovalentně váže NADPH. Pozitivně nabitě aminokyseliny (arginin, lysin) v místě vazby NADPH interagují s negativně nabitou fosfátovou skupinou v poloze 2' ribosy. Doména s navázaným FMN řídí přenos elektronů na akceptorovou molekulu. Interakce mezi NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou a cytochromem P450 jsou především elektrostatické povahy. Uplatňují se elektrostatické síly

mezi kladně nabitým povrchem cytochromu P450 (lysiny a argininy) a záporně nabitým povrchem NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy (aspartát a glutamát). Dále působí hydrofobní interakce mezi nepolárními aminokyselinami (leucin, tryptofan a valin) v oblasti membránových domén NADPH:CYP oxidoreduktasy a cytochromu P450. (Wang et al., 1997 in Stiborová et al., 2004a)

Elektrony přechází z NADPH na akceptor elektronů FAD, který následně elektrony předává FMN. Za jednoelektronovou redukci cytochromu P450 je v případě savčí NADPH:CYP oxidoreduktasy zodpovědný zcela redukovaný hydrochinon FMNH₂. (Stiborová et al., 2004a)

NADPH:CYP oxidoreduktasa biotransformuje endogenní sloučeniny i xenobiotika. Substrátem tohoto enzymu jsou např. 1,8-dinitropyren, 3-nitrobenzathron, aristolochové kyseliny a další. Tento enzym také redukuje např. nitro-aromáty. Redukčními reakcemi jsou nitroskupiny postupně redukovány na aminoskupiny. (Stiborová et al., 2004a)

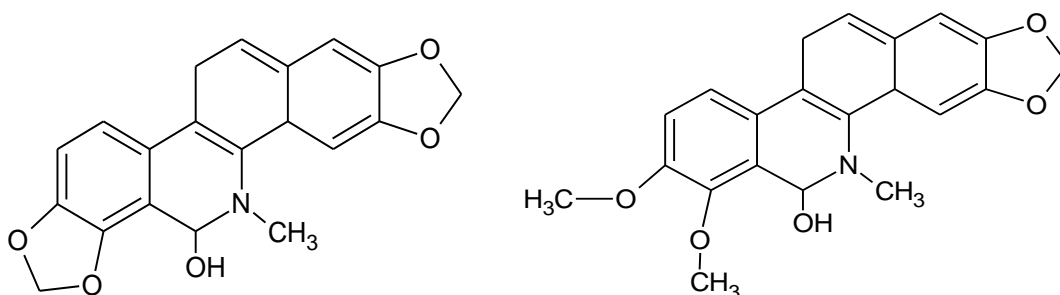
2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo shrnutí dosavadních poznatků o skupině alkaloidů a flavonoidů vykazujících význačné fyziologické účinky na lidský organismus. Jmenovitě se jedná o sanguinarin a chelerythrin, ellipticin, aristolochové kyseliny, z flavonoidů pak zejména flavanony a flavony. Cílem práce bylo popsání metabolismu těchto látek a srovnání jejich pozitivních a negativních účinků na organismy.

3. ALKALOIDY

Alkaloidy jsou dusíkaté organické sloučeniny zásaditého charakteru. Podle pH se atom dusíku může vyskytovat jako trojmocný a elektroneutrální, tedy ve formě neutrální báze, nebo jako čtyřmocný s pozitivním nábojem, tedy ve formě amoniové soli. Neutrální báze jsou bezbarvé a ve vodě nerozpustné. Amoniové soli jsou barevné a rozpustné ve vodě i v alkoholu. Tyto formy mezi sebou mohou volně přecházet. Podstatně se liší ve svých fyzikálně-chemických vlastnostech, výskytu, chemické struktuře a biologické dostupnosti. Alkaloidy vznikají jako produkty metabolismu aminokyselin v rostlinách (např. lilkovité, mákovité, pryskyřníkovité). Většina alkaloidů jsou bezbarvé, bez zápachu, vyznačující se hořkou chutí, při vyšších teplotách a za běžného tlaku se rozkládají. Alkaloidy mají toxický, ale i silný farmakologický účinek. Uplatňují se v medicíně (např. morfin, chinin, emetin). (Dostál, 2000)

3.1. Sanguinarin a chelerythrin



Obr. 3.1: Sloučeniny sanguinarin a chelerythrin ve formě pseudobáze

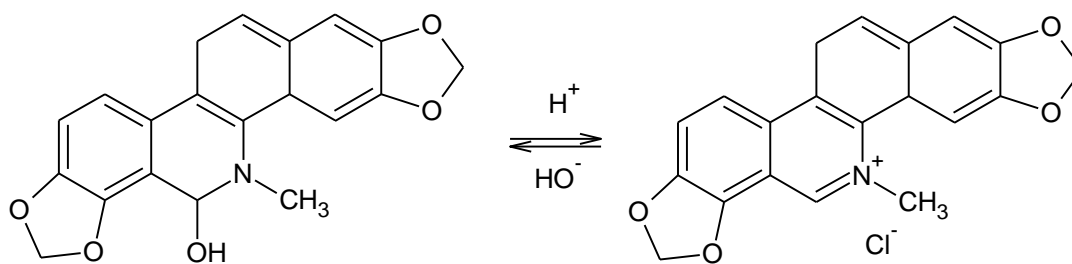
Sanguinarin (SA) a chelerythrin (CHE) patří mezi kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (KBA). (Zdařilová et al., 2006) KBA se dělí do čtyř podskupin podle typu substituce: 2,3,7,8-tetrasubstituované alkaloidy jako je sanguinarin a chelerythrin (obrázek 3.1.). Další skupiny jsou 2,3,8,9-tetrasubstituované, pentasubstituované a hexasubstituované. (Dostál et al., 2000) Sanguinarin a chelerythrin se vyskytují v rostlinách čeledi zemědýmovitých (*Fumariaceae*), makovitých (*Papaveraceae*), pryskyřníkovitých (*Ranunculaceae*) a routovitých (*Rutaceae*). (Zdařilová et al., 2006) Hlavním zdrojem sanguinarinu a chelerythrinu jsou *Sanguinaria canadensis* L. (krevnice kanadská, lidově krvavý kořen) vyskytující se především v Severní Americe,

Chelidonium majus L. (vlaštovičník větší) nacházející se v Evropě a *Macleaya cordata*, která roste volně v Japonsku a Číně. Alkaloidy byly izolovány ve formě kvarterních solí. (Zdařilová et al., 2006) SA a CHE působí jako fytoalexiny (obrané látky rostlin proti patogenním mikroorganismům a houbám). Mají pozitivní účinky např. protizánětlivý, antiplakový (využití směsí SA a CHE jako aktivní složka ústní hygieny) a antibakteriální, ale i negativní účinky např. genotoxicita, hepatotoxicita a cytotoxicita. (Zdařilová et al., 2006)

3.1.1. Chemické vlastnosti sanguinarinu a chelerythrinu

Ve vodném prostředí jsou SA a CHE v rovnováze mezi pseudobází a kvarterním kationtem (obr. 3.1.1., str. 26). Za fyziologického pH 7,2 až 7,4 prochází pseudobáze ve formě 6-hydroxy-5,6-dihydroderivátu (dále jen 6-hydroxydihydroderivátu) buněčnou membránou a v cytoplasmě je v rovnováze s kvartérním kationtem. 6-hydroxydihydroderiváty reagují se sloučeninami substituovanými thiolovou skupinou (např. L – cystein) vratnou nevazebnou interakcí. (Zdařilová et al., 2006) Volná báze vzniká alkalizací soli alkaloidu, v kyselém prostředí vzniká opět sůl alkaloidu. V alkalickém prostředí dochází ke kondenzaci dvou molekul pseudobáze za uvolnění molekuly vody. (Dostál et al., 2000) KBA mají schopnost inhibovat fyziologicky důležité enzymy. Mechanismem inhibice enzymů je adice nukleofilních skupin bílkoviny na iminiovou vazbu kvartérní formy SA nebo CHE. Inhibici lze potlačit přidáním glutathionu, dithiothreitolu, nebo jiné protektivní SH-látky. (Zdařilová et al., 2006)

Základním rysem KBA je citlivost k nukleofilnímu ataku na iminiovou vazbu $C=N^+$. (Dostál et al., 2000) Kation reaguje s DNA elektrostaticky, kovalentní modifikací nebo interkalací. Sen et al. (1996) prokázali, že vazba SA na DNA závisí na iontové síle, základním složení roztoku a sekvenci párů nukleotidů. (Zdařilová et al., 2006) Kvartérní sůl se přednostně váže do míst DNA bohaté na GC báze. Kationtová forma je barevná (sanguinarin je červený, chelerythrin žlutý), ve vodě rozpustná. Vzniklý adukt s DNA je bezbarvý a ve vodě nerozpustný. Schopnost vázat se na DNA je u CHE nižší než u SA. Interkalace sanguinarinu do DNA byla prokázána i metodami NMR. Kromě interkalace sanguinarin působí při replikaci DNA inhibicí DNA polymerasy I. (Slaninová et al., 2008)



Obr. 3.1.1.: Rovnováha mezi pseudobází a kvartérním kationtem sanguinarinu

Geometrie aromatických kruhů SA a CHE není zcela planární. Odchýlení od planarity je pravděpodobně způsobeno interakcí methylové skupiny na dusíku, který je navázán na uhlík C4. Další významným strukturním parametrem molekuly alkaloidů je orientace substituentů v pozicích 2,3 a 7,8. Substituenty leží většinou ve stejné rovině jako aromatický kruh kromě methoxy skupiny na uhlíku C7, která je orientována téměř kolmo k rovině aromatického kruhu. Přítomnost methoxy skupiny na uhlíku C7 snižuje schopnost interkalace alkaloidů do DNA. (Slaninová et al., 2008)

Biosyntéza SA a CHE vychází z aminokyselin tyrosinu a fenylalaninu. Důležitými meziprodukty jsou protopiny. Posledním mezistupněm biosyntézy jsou dihydroderiváty. Dihydroderiváty se oxidují benzo[c]fenanthridinoxidasou na kvartérní soli. (Zdařilová et al., 2006)

3.1.2. Metabolismus sanguinarinu a chelerythrinu

První zpráva o metabolické přeměně sanguinarinu u experimentálních zvířat byla publikována v roce 1957. Sanguinarin se přeměnil na „zeleně – fluoreskující sloučeninu“ izolovanou z potkaních jater. Na základě UV spektroskopie se zeleně – fluoreskující sloučenina označila za 3,4-benzaakridin. V dnešní době je tento metabolit prohlášen za artefakt. Nedostatečné studie a špatné isolační procedury použité v těchto studiích vedly k tomuto mylnému závěru. (Dvořák et al., 2007)

Studie Psotové et al. (2006a) poukázaly, že by dihydrosanguinarin (DHSA) mohl být prvním metabolitem detoxikačního metabolismu sanguinarinu. Dihydrosanguinarin byl vedle sanguinarinu přítomen vždy ve větším množství. V moči nebyl nalezen ani SA ani DHSA. V žádném vzorku nebyla prokázána přítomnost 3,4-benzaakridinu. Redukce

sanguinarinu na dihydrosanguinarin probíhá již v trávicím traktu především mikrobiálními reduktasami. Přeměna sanguinarinu na dihydrosanguinarin byla zjištěna i u rostlin, kde byla katalyzována sanguinarinreduktasou. (Zdařilová et al., 2006)

Studie Kosiny et al. (2004) popisuje podávání směsi sanguinarinu a chelerythrinu v poměru 6:2 prasatům v 90-ti denním experimentu. Nežádoucí účinky testovaných látek pozorovány nebyly. Denní dávka alkaloidů 5 mg/ kg byla tedy prokázána jako bezpečná. (Dvořák et al., 2007)

3.1.2.1. Interakce sanguinarinu a chelerythrinu s receptorem pro polycyklické aromatické uhlovodíky (AhR) a cytochromy P450 1A

Biologická aktivita sanguinarinu by mohla být modulována receptorem pro polycyklické aromatické uhlovodíky (AhR). SA pravděpodobně ovlivňuje funkci tohoto receptoru a funkci CYP1A. Bylo prokázáno, že sanguinarin inhibuje katalytickou aktivitu CYP1A. (Dvořák et al., 2007)

Williams et al. (2000) pozorovali snížení toxického účinku sanguinarinu u myší po premedikaci experimentálních zvířat induktorem CYP1A, 3-methylcholanthrenem (3-MC). (Zdařilová et al., 2006) Další aktivátory Ah receptoru např. β -naftoflavon (BNF) nebo 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) také snížily toxicitu sanguinarinu. Jedno z možných vysvětlení snížení toxicity sanguinarinu je indukce cytosolických reduktas těmito látkami. Tyto enzymy by mohly metabolizovat SA na DHSA. Další možnost je indukce enzymů II. fáze biotransformace opět např. TCDD, které mohou urychlovat vylučování reaktivních metabolitů sanguinarinu z organismu. (Dvořák et al., 2007)

Inkubací SA s DNA a potkaními jaterními mikrosomy, které byly indukovány CYP1A, dochází ke zvýšení tvorby aduktů s DNA oproti tvorbě aduktů s DNA v jaterních mikrosomech potkanů kontrolních (neindukovaných). (Stiborová et al., 2002 in Zdařilová et al., 2006) Aduky s DNA pravděpodobně vznikají z reaktivních metabolitů SA generovaných CYP1A. Přímé důkazy o tvorbě aduktů s DNA způsobené CYP1A *in vivo* však chybí. (Stiborová et al., 2002 in Dvořák et al., 2007)

3.1.3. Pozitivní účinky sanguinarinu a chelerythrinu na organismy

Sanguinarin a chelerythrin vykazují široké spektrum biologických aktivit např. protizánětlivé, antibakteriální, antiplakové a antimykotické účinky, které jsou využívány jako aditiva přípravků zubní hygieny. (Zdařilová et al., 2006)

Sanguinarin a chelerythrin jsou využívány též jako aditiva přidávána do krmiv hospodářských zvířat pod názvem Sangrovit®. A to za cílem zvýšit užitek zvířat eliminací nízké hladiny antibiotik v krmivu, která by mohla být spojena s rizikem rezistence na antibiotika. (Psotová et al., 2006b)

KBA interagují s bílkoviny. Vliv sanguinarinu na svalové bílkoviny byl studován na třech izolovaných tkáních hlodavců: na aortě, bránici a myokardu. SA uvolňoval hladké svalstvo izolované aorty po kontrakci iniciované fenylefrinem. Dále SA pozitivně působil na kontraktilitu příčně pruhovaného svalstva bránice myši. Sanguinarin ovlivňoval pozitivním účinkem i srdeční sval potkana. Nicméně intoxikace organismu sanguinarinem by mohla vyvolat infarkt myokardu. (Hu et al., 2005 in Zdařilová et al., 2006)

Vzhledem ke svým antiproliferačním účinkům a indukci apoptózy jsou sanguinarin a chelerythrin považovány za potenciální cytostatikum v léčbě nádorových onemocnění. Dále se KBA vyznačují fluorescenčními vlastnostmi, jejichž možné uplatnění tkví ve využití jako supravitální sondy. Některé pozitivní účinky sanguinarinu a chelerythrinu jsou popsány v následujících kapitolách.

3.1.3.1. Vztah sanguinarinu a chelerythrinu k apoptóze

Apoptóza je nejstudovanější typ programované buněčné smrti, která je závislá na signálních drahách umírající buňky. Při apoptóze ztrácí buňka asymetrii fosfolipidů v membráně, dochází ke kondenzaci chromatinu, redukci jádra, štěpení DNA, svraštění buňky a vydouvá se membrána. Buňka se rozpadá na apoptická tělíska. Vzniklá tělíska jsou v posledním kroku fagocytována bez vzniku zánětlivé reakce. (Zdařilová et al., 2006) Proteiny účastníci se apoptózy jsou buď proapoptické Bax, nebo antiapoptické Bcl-2. Signální dráhy vedoucí k apoptóze lze rozdělit na dvě skupiny: **vnitřní** signální dráha je

hlavním zdrojem proapoptických signálů z mitochondrií a je řízena působením molekul rodiny Bcl-2. Druhá signální dráha je **vnější** a spouští se aktivací receptorů na plasmatické membráně buněk. Výsledkem obou drah je aktivace specifických proteolytických enzymů kaspas. (Zdařilová et al., 2006)

Indukce apoptózy vyvolaná sanguinarinem byla pozorována u lidských prsních a prostatických nádorových buněčných linií, buněk melanomu, děložního čípku, myeloidních buněk, leukemických buněčných linií a dalších nádorů. Apoptóza vyvolaná chelerythrinem byla pozorována i u lidských neuroblastů, prsní nádorové buněčné linie (MCF-7) a buněčné linie karcinomu tračníku. (Zdařilová et al., 2006)

Ding et al. (2002) zkoumali apoptózu vyvolanou sanguinarinem na buňkách děložního čípku. SA byl účinný v závislosti na koncentraci. Při koncentraci 2-4 μM byla vyvolána apoptóza doprovázená aktivací kaspasy-3, při koncentraci 8-17 μM vznikla onkóza (buněčná smrt, která se projevuje otokem, zduřením, zvýšenou permeabilitou cytoplasmatické membrány a opět aktivací kaspasy-3). Nekróza byla vyvolána při koncentraci 8 μM , a to v případě obou alkaloidů SA i CHE. (Zdařilová et al., 2006)

Mechanismus apoptózy vyvolané sanguinarinem je pravděpodobně způsoben předčasným vyčerpáním redukovaného glutathionu reakcí alkaloidu s glutathionem a následnou aktivací kaspasy-3/7. Chan et al. (2003) označil chelerythrin jako inhibitor skupiny proteinů rodiny Bcl-2. Tímto krokem by došlo k vyplavení cytochromu c z mitochondrií a uvolnění kaspas. (Zdařilová et al., 2006)

Mezi faktory ovlivňující apoptózu patří protein NF- κB (Weerasinghe et al., 2001 in Zdařilová et al., 2006). Je to jaderný transkripční faktor regulující expresi cytokinů, zánět, buněčnou proliferaci a virovou expresi. Protein Bax a aktivace kaspasy-3 působí proapopticky, aktivace NF- κB účinkuje antiapopticky. Avšak mechanismus působení NF- κB na inhibici apoptózy nebyl zcela objasněn. Sanguinarin potlačuje aktivaci proteinu NF- κB v rakovinové buňce (např. v lidských leukemických buněčných linií K562). (Zdařilová et al., 2006)

Ze studií Dinga et al. (2002), Chana et al. (2003) vyplývá, že sanguinarin i chelerythrin jsou schopny vyvolat apoptózu. I když není známé přesné působení těchto alkaloidů, možný způsob je aktivace proteinů Bax a potlačení proteinů Bcl-2, nebo inhibice transkripčního faktoru NF- κB . Spolehlivé objasnění mechanismu vyvolání apoptózy alkaloidy SA a CHE by mohlo mít využití v protinádorové léčbě.

3.1.3.2. Využití sanguinarinu a chelerythrinu jako supravitální sondy

Značení DNA fluorescenčními sondami patří mezi významné metody využívané ve výzkumu (např. experimentální toxikologii a farmacii) i diagnostice. Jak již je uvedeno výše, KBA vykazují barevné a fluorescenční vlastnosti. Všechny KBA jsou barevné ve spektru od žluté po červenou barvu. Chromofory jsou zodpovědné za barevnost. Jsou to kondenzovaná aromatická jádra se substituenty, které jsou donory elektronů a obsahují kyslík (-OH, -OCH₃ a -OCH₂O-). (Slaninová et al., 2008) Podobně jako u jiných vlastností KBA, jejich fluorescence závisí na strukturní formě (kvartérní sůl nebo pseudobáze). Forma alkaloidů je ovlivněna pH prostředím i typem rozpouštědla. Lepší fluorescenční vlastnosti mají kvartérní kationty. Mechanismus interakce alkaloidů s DNA je interkalace. Skutečnost, že KBA interagují s DNA, potvrdili i Sen et al. (1994), kteří prokázali spektrofotometrií, spektrofluorimetrií a viskozimetrií interkalaci kvartérní soli do DNA, avšak u pseudobáze tyto vlastnosti pozorovány nebyly. (Slaninová et al., 2008)

Slaninová se spolupracovníky (2007) studovala průnik KBA do buněk a zjistila, že tyto alkaloidy pronikají velmi rychle do živých buněk a navíc sanguinarin, makarpin a chelirubin inkorporovaly rychle i do jádra. Strukturu jader značených těmito alkaloidy lze pozorovat na úrovni fluorescenční mikroskopie. Chelerythrin projevil menší schopnost se vázat do DNA než sanguinarin. (Slaninová et al., 2008) SA a CHE značí buňku a jádro srovnatelně s typickým interkalátorem ethyidium bromidem. Jen některé sondy mají schopnost vázat se na DNA kvantitativně, a to umožňuje rozlišit množství DNA v jednotlivých buňkách a určit fázi buněčného cyklu. Tyto sondy jsou schopné určit zastoupení proliferujících buněk v nádorové tkáni. (Slaninová et al., 2008)

Značení DNA pomocí fluorochromů umožňuje sledovat struktury jader a buněk ve fluorescenčním a konfokálním mikroskopu. Specifické fluorescenční sondy jsou využitelné i pro průtokovou cytometrii. (Slaninová et al., 2008)

3.1.4. Negativní účinky sanguinarinu a chelerythrinu na organismy

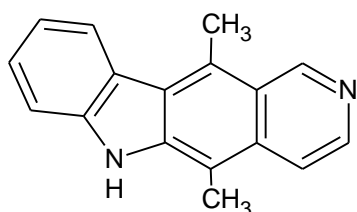
SA a CHE v buňce mohou interagovat s jadernou a mitochondriální DNA, jak již bylo popsáno výše. V řadě studií *in vitro* se zjistilo, že oba alkaloidy interkalují do DNA. Mezi negativní účinky SA a CHE patří jejich genotoxicita. Studie *in vitro* genotoxicitu prokázaly (Stiborová et al., 2002 in Zdařilová et al., 2006), zatímco výsledky ze studií *in vivo* jsou rozporuplné (Das et al., 2004; Kosina et al., 2004 in Zdařilová et al., 2006). Pokud byl myšim podán sanguinarin intraperitoneálně v dávce 10 mg. kg⁻¹, objevilo se poškození chromosomů u buněk kostní dřeně. (Das et al., 2004 in Zdařilová et al., 2006) Při pokusech prováděných na prasatech a potkanech se podávala směs SA a CHE v poměru 6:2 (10 mg. kg⁻¹ denně po dobu 90 dní) v krmivu a metodou „³²P – postlabeling“ nebylo nalezeno žádné poškození jaderné DNA jater experimentálních zvířat. Rozporuplné výsledky v pokusech *in vivo* by mohly záviset na způsobu aplikace KBA. Poškození DNA, které se objevilo po podání KBA intraperitoneálně nelze srovnat s účinkem alkaloidů aplikovaných perorálně. (Zdařilová et al., 2006)

SA a CHE jsou vzhledem ke svým pozitivním antimikrobiálním a protizánětlivým účinkům využívány ve stomatologii. V posledních letech se však diskutuje bezpečnost těchto přípravků při dlouhodobém užívání. KBA by mohly být zodpovědné za vznik prekancerózních lézí na sliznici dutiny ústní (leukoplakie). Možné působení SA a CHE je přímá interakce nebo indukovatelnost některého z cytochromů P450, pravděpodobně CYP1A1 a 1B1. Nicméně testy *in vitro* a *in vivo* jednoznačně nepotvrdily ani nevyvrátily vztah mezi těmito alkaloidy a leukoplakii. (Zdařilová et al., 2006)

Sanguinarinu a chelerythrinu je přisuzována toxicita oleje ze semen rostlin rodu *Argemone mexicana*. Po jeho požití dochází u savců k akutnímu oxidačnímu stresu (porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraněním reaktivních forem kyslíku) a selhání všech životně důležitých orgánů. Tato otrava je u lidí známa jako „*epidemic dropsy syndrom*“. (Zdařilová et al., 2006) Podle studií Psotové et al. (2006a) alkaloidy neprokázaly indukci oxidačního stresu v testech *in vivo*. Objasnění metabolismu sanguinarinu a chelerythrinu by přispělo k určení toxické látky v tomto oleji. (Zdařilová et al., 2006)

3.2. Ellipticin

Ellipticin je alkaloid vyskytující se v rostlinách čeledi toješťovitých (*Apocyanaceae*) např. *Ochrosia borbonica*, *Excavatia coccinea*. (Stiborová et al., 2011) Z chemického hlediska je ellipticin 5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol (obrázek 3.2.). Tento alkaloid byl poprvé izolován roku 1959 z jehličnatého stromu *Ochrosia elliptica*. Ellipticin a jeho více rozpustné deriváty (9-hydroxyellipticin, 9-hydroxy-N²-methylellipticinium, 9-chloro-N²-methylellipticinium a 9-methoxy-N²-methylellipticinium) se vyznačují anti – tumorovou a anti – HIV aktivitou. Je účinný především proti rakovinovým buněčným liniím leukemických a melanomických buněk a buněk tlustého střeva. Dále je účinný v léčbě rakoviny prsu a karcinomu štítné žlázy. Protirakovinový terapeutický účinek ellipticinu je kombinací zastavení buněčného cyklu a indukci apoptózy. Nežádoucím účinkem ellipticinu je mutagenita a cytotoxická aktivita vyvolána interkalací ellipticinu do DNA a inhibicí topoisomerasy II. (Stiborová et al., 2011)



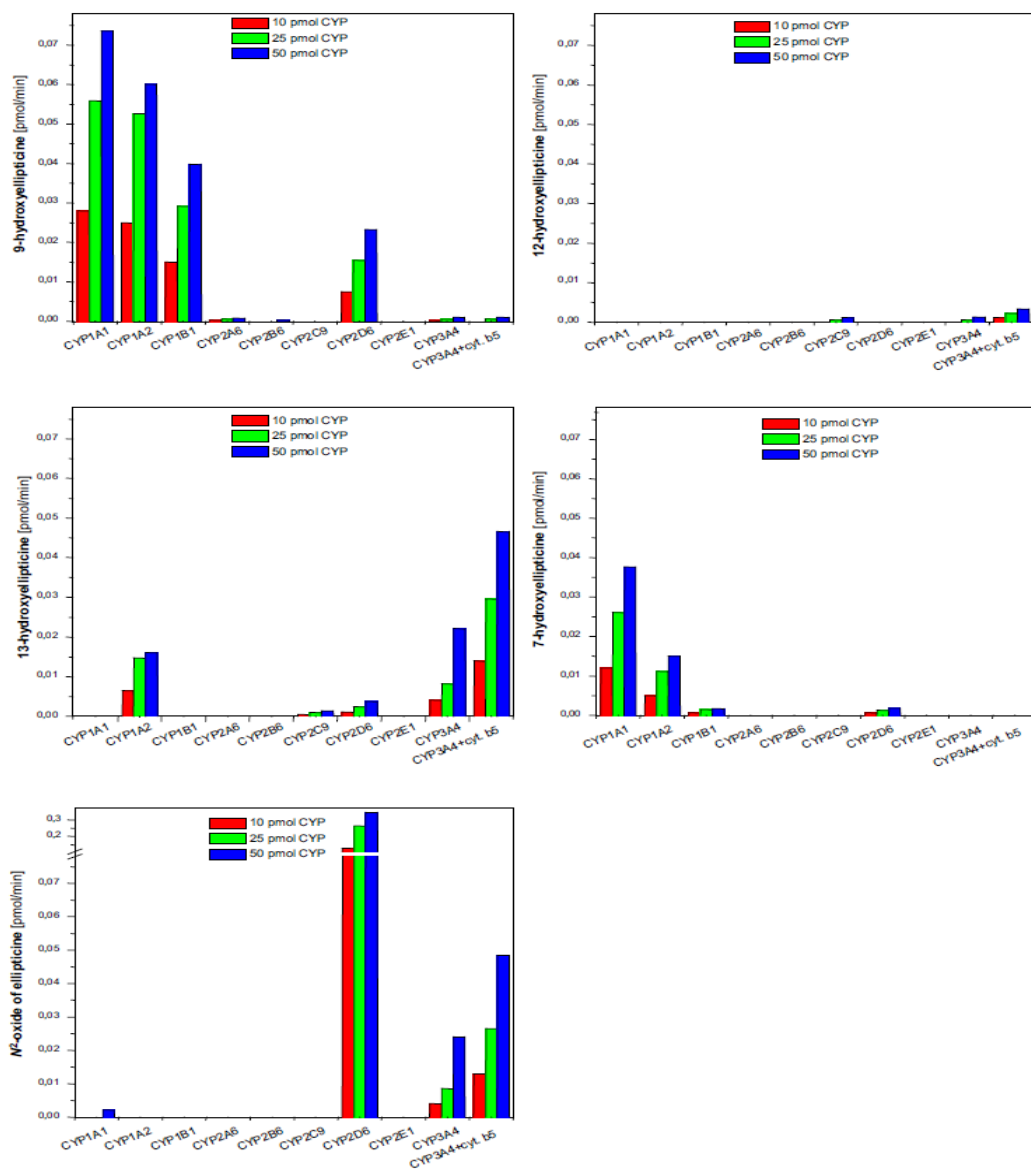
Obr. 3.2.: Chemická struktura ellipticinu

3.2.1. Metabolismus ellipticinu

V metabolismu ellipticinu hrají základní roli cytochromy P450 a peroxidasy. Tyto enzymy ellipticin buď detoxikují, nebo jej aktivují. Cytochromy P450 alkaloid oxidují na 9-hydroxy-, 7-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticin a ellipticin N²-oxid. Lidské CYP1A1, 1A2 a 1B1 jsou majoritní enzymy oxidující ellipticin na 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticin. Tyto metabolity se označují jako detoxikační metabolity. (obr. 3.2.1.b, str. 35) (Stiborová et al., 2011)

Z lidských CYP je neúčinnějším enzymem oxidujícím ellipticin CYP3A4. Aktivuje ellipticin na 13-hydroxyellipticin, a ellipticin N²-oxid, v malé míře vzniká i 12-hydroxyellipticin. Ellipticin N²-oxid je nestabilní a Polonowského přesmykem z něj vzniká 12-hydroxyellipticin. Proto je ellipticin N²-oxid také považován za aktivační metabolit

ellipticinu. Majoritní adukty ellipticinu s DNA se tvoří z 13-hydroxyellipticinu a 12-hydroxyellipticinu. Tyto metabolity tvoří adukty s deoxyguanosinem v DNA. (Stiborová et al., 2011) Adukty s DNA se tvoří ze dvou reaktivních karbeniových iontů: ellipticin 13-ylia, ellipticin 12-ylia, jenž vznikají spontánním štěpením 13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticinu bez účasti enzymů (adukty 1 a 2 na obr. 3.2.1.b., str. 35). Proto jsou tyto dva metabolity ellipticinu kandidáty pro zacílení tumorů bez aktivace enzymů. (Stiborová et al., 2011)

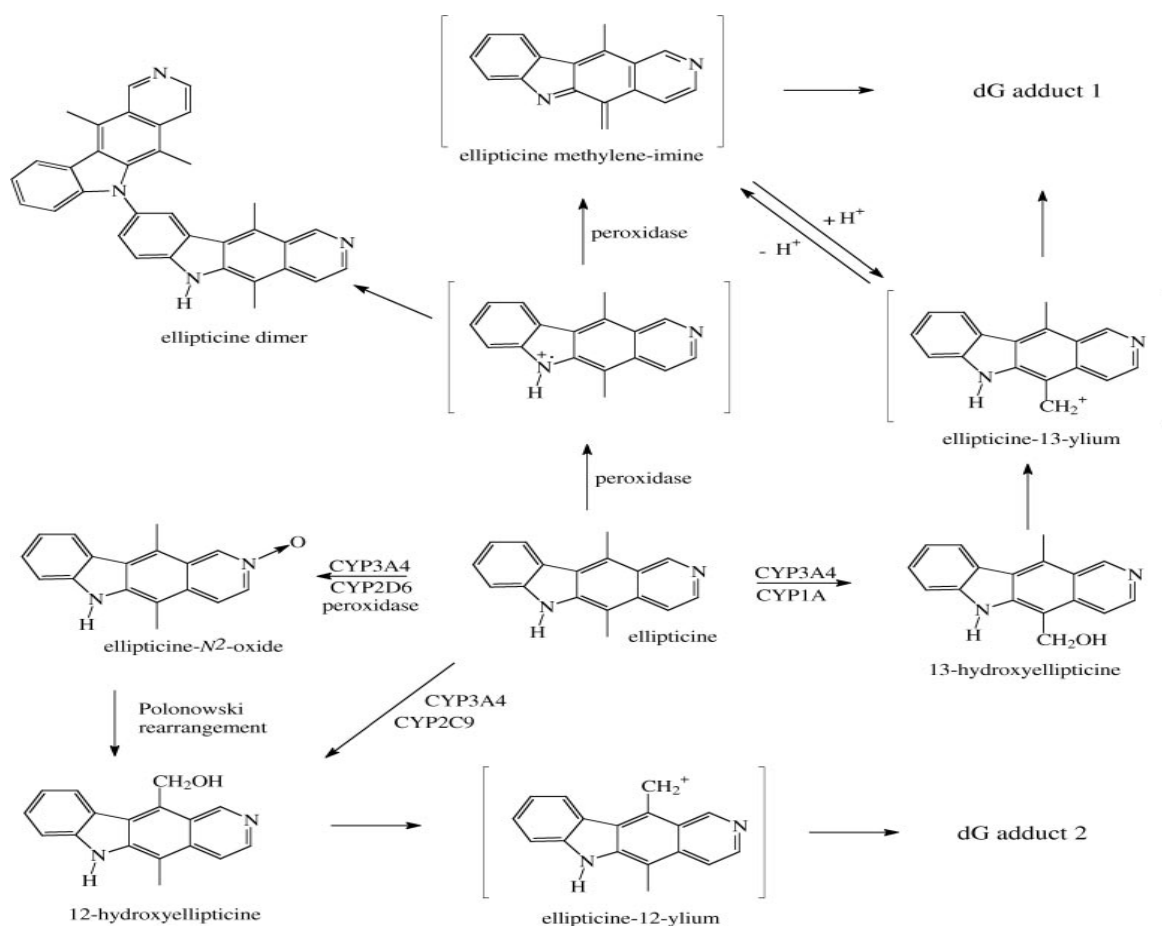


Obr. 3.2.1.a: Oxidace ellipticinu lidskými rekombinantními enzymy CYP. V experimentech bylo použito 10 – 50 pmol lidského rekombinantního CYP a 10 μ M ellipticinu. (převzato ze Stiborová et al., 2004b)

CYP3A4 je hojně zastoupen v lidských játrech, proto vznik 13-hydroxyellipticinu a N²-oxid ellipticinu je majoritní dráha aktivačního metabolismu ellipticinu v játrech. Další cytochromy P450, které oxidují ellipticin na 13-hydroxyellipticin jsou rovněž CYP1A2, 2D6, a 2C9. Nejúčinnějším enzymem pro vznik metabolitu N²-oxidu ellipticinu je CYP2D6, který oxiduje ellipticin také na 12-hydroxyellipticin. (Stiborová et al., 2011) Oxidace výše popsaných pěti metabolitů ellipticinu lidskými CYP je zobrazena na obrázku 3.2.1.a., str. 33.

V některých tkáních a buňkách je exprese CYP nízká (např. leukemické buňky). I zde však dokáže ellipticin vytvářet adukty s DNA. (Stiborová et al., 2011) Otázkou tedy je, které enzymy by aktivaci ellipticinu v těchto buňkách mohly zprostředkovat. Takovými enzymy by mohly být např. peroxidasy. Peroxidasy jako lidská cyklooxygenasa-2 (COX-2), ovčí cyklooxygenasa-1 (COX-1), hovězí laktoperoxidasa (LPO) a lidská myeloperoxidasa (MPO) totiž oxidují ellipticin na reaktivní metabolity, které tvoří adukty s DNA. (Stiborová et al., 2007a in Stiborová et al., 2011)

Majoritní metabolit ellipticinu tvořený peroxidasami *in vitro* je dimer ellipticinu. Dimer ellipticinu je složen ze dvou molekul alkaloidu spojených přes N⁶ pyrrolového kruhu jedné molekuly a C9 druhé molekuly ellipticinu. Tento metabolit vzniká jednoelektronovou oxidací ellipticinu. Tvoří se radikály ellipticinu, které spolu reagují za vzniku dimeru. (Stiborová et al., 2011) Dvouelektronovou oxidací ellipticinu pravděpodobně vzniká metabolit methylenimin ellipticinu. Vznik methyleniminu ellipticinu sice nebyl experimentálně prokázán, ale jeho tvorba je nanejvýš pravděpodobná. Adukty s DNA tvořené methyleniminem ellipticinu odpovídají aduktům tvořeným karbeniovým iontem ellipticin-13-yliem. 13-hydroxyellipticin tedy působí jako prekursor methyleniminu ellipticinu. N²-oxid ellipticinu, stejný metabolit vzniklý oxidací CYP, je minoritní produkt metabolismu ellipticinu katalyzovaného peroxidasami a je prekursorem 12-hydroxyellipticinu (obr. 3.2.1.b, str. 35). (Stiborová et al., 2011)



Obr. 3.2.1.b: Metabolismus ellipticinu katalyzovaný peroxidasami a lidskými cytochromy P450 (převzato ze Stiborová et al., 2007a)

3.2.1.1. Indukce ellipticinu prostřednictvím Ah receptoru

Antitumorová, cytotoxická a genotoxická aktivita ellipticinu závisí na expresi CYP v jednotlivých tkáních. Dominantní enzym působící v tvorbě reaktivních metabolitů ellipticinu u potkanů je CYP3A1. Studie *in vivo* s potkany však prokázaly, že v metabolismu ellipticinu hraje roli i CYP1A1. Jedno z možných vysvětlení působení CYP1A1 tkví v jeho indukci ellipticinem, která resultuje ve vyšší aktivitu tohoto enzymu. (Stiborová et al., 2011)

Někteří autoři (Fernandez et al., 1988; Gasiewicz et al., 1996) vysvětlují indukci CYP1A1 jako důsledek vazby ellipticinu na Ah receptor (aryl hydrocarbon receptor, AhR). Vazba ellipticinu umožní přenos AhR z cytosolu do jádra, kde dimerizuje s jaderným translokátorem ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator). Komplex AhR – ARNT stimuluje transkripci genu *CYP1A1*, a tím následně zvýší expresi proteinů CYP1A1. (Stiborová et al., 2011)

Další možný mechanismus indukce CYP1A1 vysvětlují Chang a Puga (1998). Ellipticin by mohl snižovat enzymovou aktivitu CYP1A1, jenž by vyvolalo zvýšení činnosti AhR – ARNT transkripčního komplexu, a tudíž indukci CYP1A1. (Stiborová et al., 2011)

Aimová et al. (2007) prokázali, že indukce CYP1A1 a 1A2 ellipticinem závisí na pohlaví. Indukce enzymů CYP1A1/2 ellipticinem byla několikrát vyšší u sameček potkanů, než u samic a zvyšovala se v závislosti na dávce. Dva týdny po podání dávky ellipticinu poklesly enzymové aktivity CYP1A1 a 1A2 na základní hladinu. Indukce enzymů CYP1A1/2 ellipticinem je tedy přechodná a závislá na dávce této látky. (Aimová et al., 2007)

3.2.2. Pozitivní účinky ellipticinu na organismy

Ellipticin je léčivo, jehož pozitivní i negativní účinky závisí na enzymové výbavě jedince. Vykazuje vysokou účinnost proti některým typům nádorům, např. karcinomu prsu. Má nízké vedlejší účinky a nevykazuje téměř žádnou hematologickou a hepatologickou toxicitu. Ellipticin a jeho deriváty mají využití jako potenciální antineoplastické agens s víceúčelovým mechanismem působení. (Stiborová et al., 2011)

3.2.2.1. Antitumorová aktivita ellipticinu

Přesný mechanismus působení ellipticinu jako cytostatika zatím není znám. Jeho antineoplastická aktivita zahrnuje např. interkalaci do DNA a inhibici aktivity topoisomerasy II. Velikost a tvar chromoforu ellipticinu je podobný purin – pyrimidinovým komplementárním párům bází, což podporuje interkalaci do DNA. Polycyklický aromatický charakter ellipticinu přispívá k těsné interakci s hydrofobními

centry v DNA. Interakce mezi methylovou skupinou léčiva a thyminem v interkalujícím místě je důležitá pro určení orientace elliptycinu. (Stiborová et al., 2006)

Ellipticin interaguje s topoisomerasou II a DNA za vzniku ternárního komplexu, který vede k rozštěpení nukleových kyselin a následné buněčné smrti. Ellipticin se může vázat v ternárním komplexu buď na DNA nebo na topoisomerasu II. (Froelich-Ammon et al., 1995)

Interkalace elliptycinu do DNA a inhibice topoisomerasy II tvoří nespecifické působení tohoto léčiva. Nespecifický je i přenos elliptycinu přes membránu do buňky. Ellipticin však působí specificky proti několika typům nádorového onemocnění. Specifická antitumorová aktivita elliptycinu tedy pravděpodobně vyplývá z jiného mechanismu, který doposud nebyl zcela objasněn. Stiborová et al. (2006) zjistili v testech *in vitro* a *in vivo*, že se ellipticin váže po aktivaci CYP a peroxidasami na DNA kovalentně, jak již také bylo uvedeno dříve. Tvorba aduktů byla nalezena např. v prsních nádorových buňkách MCF-7 a v lidských leukemických buňkách HL-60. (Rekha, Sládek, 1997; Poljaková, Stiborová 2004 in Stiborová et al., 2006) Ellipticin je tedy léčivo jehož farmakologická účinnost a genotoxické vedlejší účinky jsou modulovány cytochromy P450 a peroxidasami v cílové tkáni. (Stiborová et al., 2006)

3.2.2.1.1. Apoptóza indukovaná ellipticinem

Antitumorová aktivita elliptycinu a jeho derivátů se vyznačuje kombinací mechanismů zastavení buněčného cyklu a indukci apoptózy. Ellipticin a 9-hydroxyellipticin způsobují selektivní inhibici fosforylace p53 tumor supresorového proteinu prostřednictvím inhibice cyklin dependentní kinasy. Nahromadění defosforylovaného proteinu p53 může způsobit apoptózu ve fázi G1 buněčného cyklu. Zastavení buněčného cyklu v této fázi zabrání replikaci poškozené DNA. Ellipticin se také akumuluje v mitochondriích a narušuje tak energetickou bilanci buňky. (Stiborová et al., 2011)

Kuo et al. (2005) sledovali působení elliptycinu v prsních rakovinných buňkách MCF-7. Buňky se akumulovaly ve fázi G2/M buněčného cyklu a indukovala se apoptóza. Ellipticin snižuje expresi antiapoptických proteinů Bcl-2 rodiny a zvyšuje expresi proapoptických proteinů Bax. Následně se uvolní cytochrom c z mitochondrií

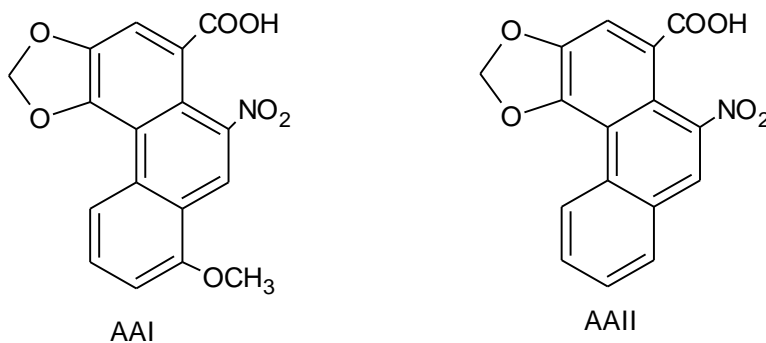
do cytoplasmy a aktivuje se kaspasa-9. (Kuo et al., 2005)

3.2.3. Negativní účinky ellipticinu na organismy

Ellipticin je potenciální protinádorové léčivo se schopností tvořit adukty s DNA v nádorové tkáni, a tak likvidovat kancerogenní buňku, jak vyplývá z výše uvedených kapitol. Tyto adukty se však tvoří i ve zdravých tkáních. Mezi negativní účinky ellipticinu proto může patřit i jeho genotoxický účinek. Podle studií Stiborové et al. (2007b) tvoří ellipticin adukty s DNA i ve zdravé tkáni potkanů *in vivo*, především v játrech a ledvinách, avšak většina poškozené DNA je opravena reparačními systémy zdravých buněk. Nalezené adukty tedy nejsou peristentí. (Stiborová et al., 2011) Při podání jedné dávky ellipticinu (4 mg/kg tělesné váhy) samičkám potkanů s prsním adenokarcinomem bylo objeveno až dvojnásobně množství aduktů s DNA v tumoru oproti zdravé tkáni. Tyto výsledky svědčí o genotoxickém působení ellipticinu v cílové nádorové tkáni. (Stiborová et al., 2011)

3.3. Aristolochové kyseliny

Aristolochová kyselina AA je rostlinný extrakt z rostlin rodu *Aristolochia* z čeledi *Aristolochiaceae* (např. *Aristolochia clematitis*, *Aristolochia fangchi*). Majoritní sloučeniny směsi AA jsou 8-methoxy-6-nitro-fenanthro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-karboxylová kyselina (AAI) a 6-nitro-fenanthro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-karboxylová kyselina (AAII) (obrázek 3.3.). AA jsou obsaženy v kořenech, stoncích, listech i plodech rostlin rodu *Aristolochia*. (Stiborová et al, 2009)



Obr. 3.3.: Aristolochové kyseliny AAI a AAII

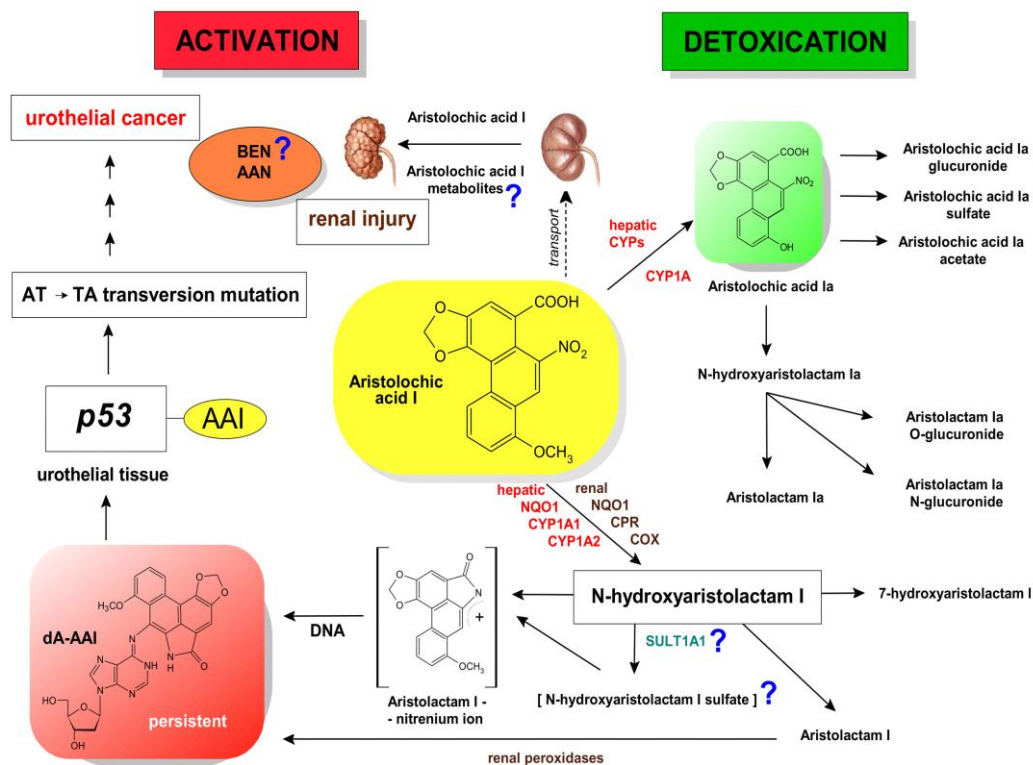
Aristolochové kyseliny se vyznačují nefropatickými a karcinogenními účinky. Nefropatie vyvolaná čínskými bylinami (CHN z angl. „Chinese herbs nephropathy“) byla poprvé popsána v Belgii v roce 1991. Do přípravků na snížení váhy byly nevědomě přidány rostliny obsahující aristolochové kyseliny. Nefropatie vyvolaná čínskými bylinami je nyní nazývána jako nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami AAN (aristolochic acid nephropathy), protože bylo jednoznačně prokázáno, že AA tuto nefropatii vyvolávají. (Stiborová et al., 2009) Existuje i hypotéza o AA jako příčiny balkánské epidemické nefropatie (BEN). Míra toxických účinků AA je dána enzymovou výbavou jedince a genetickým polymorfismem enzymů katalyzujících biotransformaci AA. Z orgánů podílejících se na metabolismu kyselin AA jsou aktivnější játra (bohatá na biotransformační enzymy) než ledviny. Cílovým orgánem aristolochových kyselin způsobujících nefrotoxicitu a kancerogenezi jsou však ledviny. (Stiborová et al., 2008a)

3.3.1. Metabolismus aristolochových kyselin

Majoritními metabolity biotransformace AA jsou aristolaktamy, které jsou vylučovány buď jako volné nebo ve formě konjugátů, a to močí a výkaly. (Stiborová et al., 2008a)

Prvním krokem metabolismu aristolochové kyseliny AAI je její nitroredukce resultující ve vzniku *N*-hydroxyaristolaktamu I. Nitroredukce je však stěžejní krok vzniku aktivního metabolitu AA. Metabolit *N*-hydroxyaristolaktam I může vytvořit cyklický *N*-acylnitreniový ion s delokalizovaným pozitivním nábojem. Tento ion je schopen utvořit persistentní adukt s DNA, 7-(deoxyadenosin-N⁶-yl)aristolaktam I (dA – AAI). Nejdůležitější enzym aktivující AAI v testech *in vitro* je cytosolická NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa (NQO1), následuje CYP1A1/2 a NAD(P)H:CYP reduktasa. (Stiborová et al., 2009)

Oxidace AAI na aristolochovou kyselinu Ia (AAIa) je detoxikační cesta metabolismu AAI. Detoxikační metabolit AAIa podstupuje konjugační reakce s endogenními látkami. Mezi konjugáty patří např. estery *O*-glukuronid, *O*-sulfát, nebo *O*-acetát. Další detoxikační cesta metabolitu AAIa je redukce za vzniku *N*-hydroxyaristolaktamu Ia, který se přemění na aristolaktam Ia. Aristolaktam Ia opět reaguje s konjugačními enzymy za vzniku *N*- nebo *O*-glukuronidů a konjugáty jsou vyloučeny močí. (Stiborová et al., 2009) Výše popsaný metabolismus AAI je na obrázku 3.3.1., str. 41.



Obr. 3.3.1.: Metabolismus aristolochových kyselin (převzato ze Stiborová et al., 2008b)

3.3.2. Pozitivní účinky aristolochových kyselin na organismy

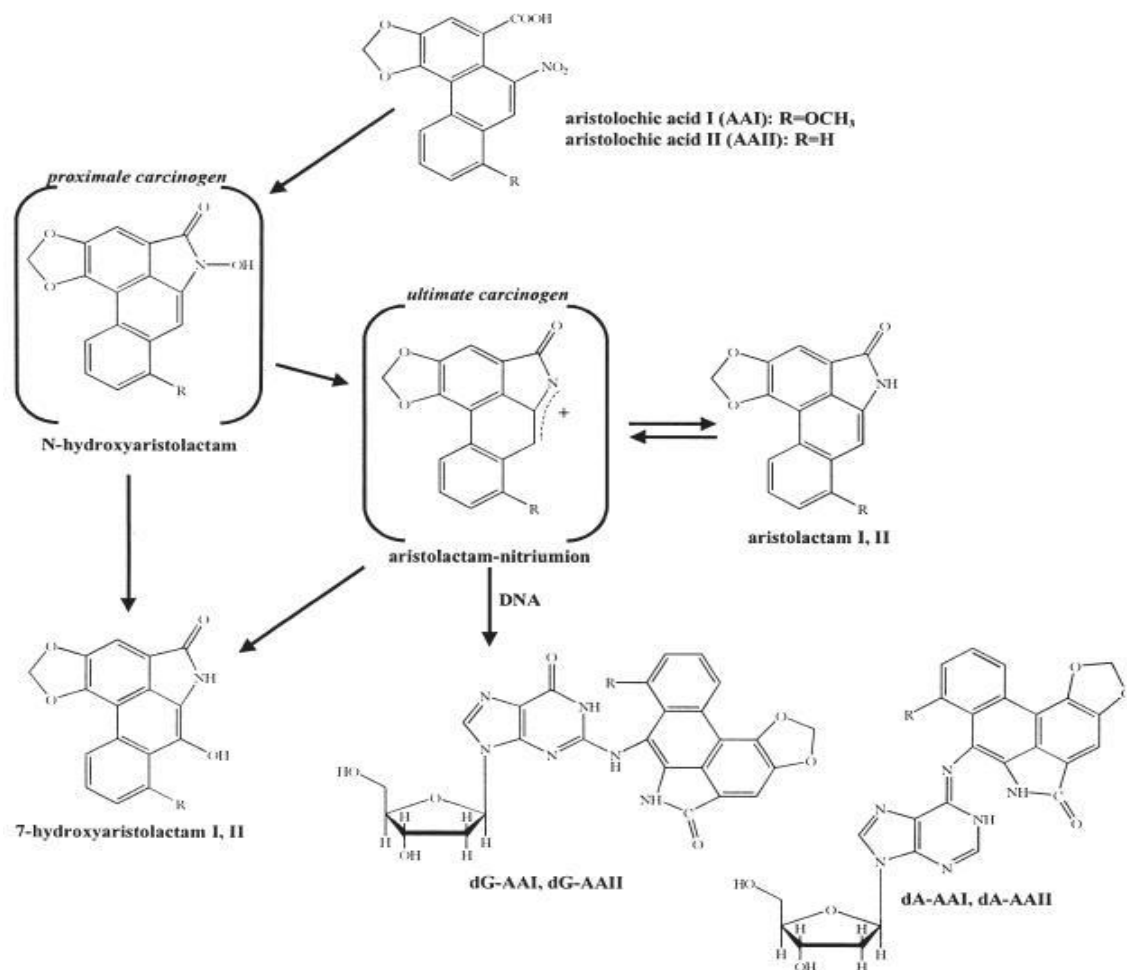
Aristolochové kyseliny byly používány od starověku v léčitelství. Jejich účinky se využívaly v porodnictví, v léčbě hadího uštknutí, hnisajících ran a nádorů. Extrakty aristolochových rostlin se také využívaly k léčení artritidy, dny a revmatismu. V roce 1970 však byly aristolochové kyseliny z farmaceutického průmyslu vyloučeny kvůli svým nefrotoxickým účinkům. Později Mengs a jeho spolupracovníci (1982) prokázali, že AA jsou i silnými kancerogeny pro potkany. (Arlt et al., 2002)

3.3.3. Negativní účinky aristolochových kyselin na organismy

Jak již bylo uvedeno výše, aristolochové kyseliny jsou po metabolické aktivaci kancerogeny a genotoxickými mutageny. Navzdory silným nežádoucím účinkům se aristolochové kyseliny stále používají v přírodních produktech čínské medicíny např. pro snížení tělesné hmotnosti nebo pro zlepšení imunitního systému. Aristolochové kyseliny byly klasifikovány jako lidské karcinogeny společností IARC (International Agency for Research on Cancer). (Arlt et al., 2007) V následujících kapitolách je popsán jak kancerogenní účinek AA, tak i nefropatie vyvolané po konzumaci aristolochových kyselin.

3.3.3.1. Karcinogenní účinky aristolochových kyselin

Schmeiser et al. (1988); Pfau et al. (1990) a Stiborová et al. (1994) prokázali, že AA vytváří kovalentní adukty s DNA v tkáni potkanů, i ve tkáni pacientek trpících nefropatií vyvolanou aristolochovými kyselinami. Jak již bylo řečeno výše, při redukci AA vzniká reaktivní cyklický *N*-acylnitreniový ion, který se váže na DNA. Pfau et al. (1990, 1991) určili strukturu majoritních aduktů AA s DNA, jmenovitě s deoxyguanosinem dG – AAI (7-(deoxyguanosin-N²-yl)aristolaktam I), s adenosinem dA – AAI (7-(deoxyadenosin-N⁶-yl)aristolaktam I) a v malém množství dA – AAI (7-(deoxyadenosin-N⁶-yl)aristolaktam II) (obrázek 3.3.3.1., str. 43). Tvorba aduktu vzniklého z AAI byla detekována jen za anaerobních podmínek. (Arlt et al., 2002) dA – AAI může vzniknout také demethoxylací AAI. (Stiborová et al., 1994 in Arlt et al., 2002) Dominantním aduktem je dA – AAI, který je v organismech persistentním aduktem. U pacientek trpících ANN byl tento adukt detekován i po deseti letech projevení se choroby. Adukty byly prokázány metodou „³²P-postlabeling“. (Schmeiser et al., 2009) Adukt dAA – AAI způsobuje v cílové tkáni transversní mutaci AT → TA v genu *p53* a tím zvýšenou expresi poškozeného proteinu *p53* pozorovanou u pacientů AAN. Tato mutace pravděpodobně způsobuje kancerogenezi uroteliálního traktu. U hlodavců byla pozorována specifická transversní mutace AT → TA také v onkogenu *H-ras* a následná jeho aktivace. (Arlt et al., 2002)



Obr. 3.3.3.1: Metabolická aktivace a tvorba aduktů s DNA aristolochových kyselin AAI (R = OCH₃) a AAII (R = H). (převzato z Arlt et al., 2002)

3.3.3.2. Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami (AAN)

Jak již bylo uvedeno výše, nefropatie vyvolaná čínskými bylinami neboli nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami se projevila u pacientek, které se zúčastnily léčebné kúry pro snížení tělesné hmotnosti v Belgii v roce 1991. Choroba se vyznačuje intersticiální fibrosou ledvin, která směřuje k totálnímu selhání ledvin. Ledvinové selhání u řady pacientek vedlo k transplantaci ledvin. Nefrotoxicita se u pacientek projevila působením rostliny *Aristolochia fangchi*, která obsahovala právě kancerogenní a

nefrotoxickou aristolochovou kyselinu. V roce 1994 se objevily dva případy rakoviny uroteliálního traktu u pacientek trpících AAN. Uvádí se, že dávka 200 g čínských bylin způsobí o 50 % vyšší riziko vzniku rakoviny uroteliálního traktu. AA jsou tedy i silnými kancerogeny pro člověka. (Arlt et al., 2002) Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami byla popsána také u pacientů z jiných zemí, v USA to bylo např. 170 případů. (Arlt et al., 2002)

3.3.3.3. Balkánská endemická nefropatie

Balkánská endemická nefropatie (BEN) je nemoc, která postihuje obyvatele žijící v některých oblastech Rumunska, Chorvatska, Bosny, Srbska a Bulharska v povodí řeky Dunaj. Znaky této nefropatie jsou velice podobné nefropatii AAN. BEN je charakterizována postupujícím progresivním zánětem intersticia ledvin, který vede až k totálnímu selhání funkce ledvin. Proces je ireverzibilní. Pacienti musí podstupovat dialýzu, popřípadě následuje transplantace ledvin. Onemocnění je doprovázeno anemií, ztrátou tělesné hmotnosti, bolestmi hlavy, proteinurií, glykosurií a zvýšenou hladinou některých enzymů v moči. Objevují se pomalu rostoucí povrchové tumory pánviček ledvin a tumory v dalších částech močového traktu. (Stiborová et al., 2005b) Doposud není známa přesná příčina nemoci. Existuje několik hypotéz.

Jedna z možných příčin balkánské endemické nefropatie jsou právě aristolochové kyseliny. Tuto teorii podporuje skutečnost, že aristolochové kyseliny se v postižených oblastech využívaly v lidovém léčitelství a semena rostliny *Aristolochia clematitis* byla nalezena v sýpkách s obilovinami, které jsou využívány pro přípravu potravin. (Stiborová et al., 2005b)

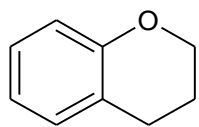
U pacientů trpících BEN se objevila také rakovina uroteliálního traktu podobně jako u pacientů trpících AAN. Aristolochové kyseliny by mohly být jeden z nejdůležitějších etiologických faktorů v BEN a související rakovině uroteliálního traktu. (Stiborová et al., 2008a)

3.4. Flavonoidy

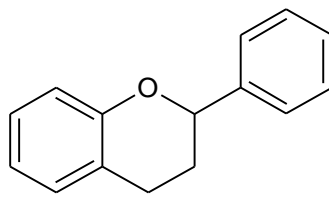
Flavonoidy představují fytochemické sloučeniny, které se vyznačují širokou biologickou aktivitou. Vyznačují se například antioxidantními vlastnostmi a schopností modulovat některé enzymy nebo buněčné receptory. Byly objeveny v roce 1930 Albertem Szent-Gyorgyi, který byl oceněn Nobelovou cenou za objev kyseliny askorbové. (Hodek et al., 2002)

Na základě struktury jsou flavonoidy klasifikovány do osmi skupin: flavany, flavanony, isoflavanony, flavony, isoflavony, antokyanidiny, chalkony a flavonoligandy. Struktury jednotlivých flavonoidů jsou odvozené od skeletu chromanu. Uhlík ve skeletu chromanu v pozici 2 nebo 3 substituován fenylem tvoří flavany. Oxo-skupina v pozici 4 a substituovaná fenylem na uhlíku C2 vytváří flavanony, na uhlíku C3 isoflavanony. Dvojitá vazba mezi uhlíky C2 a C3 a substituce fenylu na C2 uhlíku značí flavony a na C3 uhlíku isoflavony. Jednotlivé skupiny flavonoidů jsou zobrazeny na obrázku 3.4., str. 46.

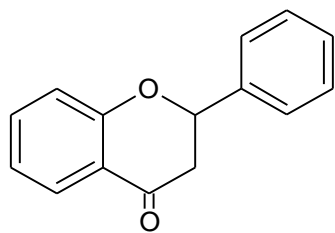
Oxo-skupina nahrazena dvojitou vazbou mezi uhlíkem C3 a C4 způsobuje barevnost sloučeniny, která je znakem skupiny antokyanidinů. Sloučeniny tvořící dva cykly, které se vyznačují otevřeným kruhem, patří do skupiny chalkonů a řadí se také mezi flavonoidy. (Hodek et al., 2002)



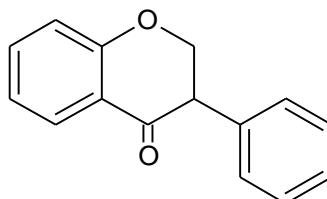
Chromany



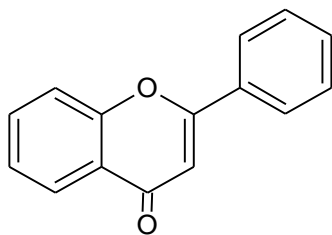
Flavany



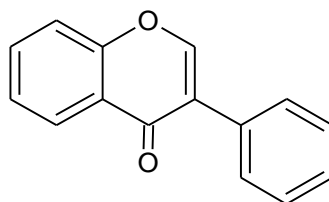
Flavanony



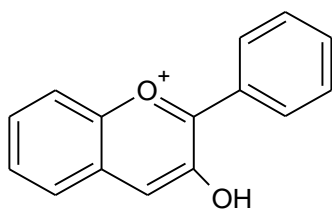
Isoflavanony



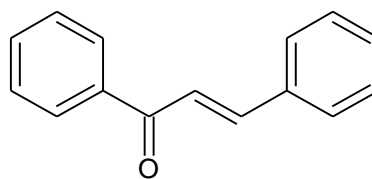
Flavony



Isoflavony



Antokyanidiny



Chalkony

Obr. 3.4.: Chemické struktury jednotlivých tříd flavonoidů

3.4.1. Chemické vlastnosti flavonoidů

Flavonoidy působí v prevenci proti oxidačnímu poškození membrán, proteinů a DNA. Používají se proti některým druhům kancerogeneze, při léčbě srdečních chorob a onemocnění jater. Flavonoidy v organismu působí vysoce specifickým účinkem na stěžejní enzymy (např. na cytochromy P450) a receptory (např. na estrogenní receptory). Některé fytochemické sloučeniny (např. silybin) jsou silnými inhibitory lipooxygenasy, fosfolipasy a cyklooxygenasy, tedy enzymů účastnících se biosyntézy prostaglandinu. Flavonoidy také inhibují třídu enzymů proteinkinasy, a to kompetitivní inhibicí s ATP ve vazbě na katalytické místo. (Hodek et al., 2002)

Flavonoidy se obvykle vyskytují jako glykosidy, ale existují i ve složitějších formách jako flavonolignany (silybin), nebo estery katechinů. (Hodek et al., 2002) Flavonoidy hrají důležitou roli v růstu a vývoji rostlin. Kromě toho také chrání rostliny proti mikroorganismům a škůdcům. Antioxidantní aktivita chrání rostliny před oxidačním stresem. Flavonoidy jsou obsaženy zejména v semenech, plodech, květech, nebo kůře. Hlavním zdrojem flavonoidů pro lidský organismus je ovoce (např. citrusové plody, šípky, meruňky, třešně, hrozny, černý rybíz a jablka), zelenina (např. cibule, zelený pepř, brokolice, rajčata a špenát), čajové listy a byliny (např. *Silybum marianum*). (Hodek et al., 2002)

3.4.2. Metabolismus flavonoidů

Flavonoidy získané z ovoce a zeleniny jsou metabolizovány střevní mikroflórou, kde jsou flavonoidové glykosidy štěpeny na volné flavonoidy (aglykony). Glykosidy i aglykony jsou dále absorbovány střevní stěnou. Degradace flavonoidové struktury probíhá především ve střevě. (Hodek et al., 2002)

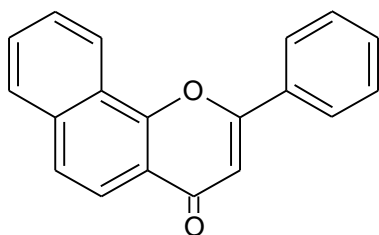
Dalším důležitým místem metabolismu flavonoidů jsou játra bohatá na enzymy I. a II. fáze biotransformace. Flavonoidy jsou postupně hydroxylovány, nebo *O*-demetylovány cytochromy P450 a podrobeny konjugačním reakcím katalyzovanými enzymy II. fáze biotransformace (glukuronidace, sulfonace, *O*-methylace). (Hodek et al., 2002)

3.4.2.1. Interakce flavonoidů s cytochromy P450

Flavonoidy mohou s cytochromy P450 interagovat třemi způsoby. Buď flavonoidy indukují biosyntézu některých CYP nebo modulují (stimulací nebo inhibicí) enzymovou aktivitu CYP. Flavonoidy jsou také cytochromy P450 metabolizovány. (Hodek et al., 2002)

Flavonoidy modulují funkci lidských cytochromů P450 v závislosti na jejich struktuře, koncentraci a experimentálních podmínkách. Při nízkých koncentracích flavonoidy blokují Ah receptor. Inhibice genetické exprese rodiny CYP1 přes blokaci Ah receptoru hraje důležitou roli v chemopreventivních vlastnostech flavonoidů. Např. quercetin je nejhojněji zastoupený flavonoid, který je antagonistou Ah receptoru, inhibuje přeměnu benzo[a]pyrenu indukci transkripce mRNA a expresí proteinu CYP1A1. (Hodek et al., 2002) Při vyšších koncentracích flavonoidy indukují expresi Ah receptoru a modulují tak genetickou expresi CYP1A1/2. Galangin, quercetin, diosmin zvyšují transkripci genu *CYP1A1*, dále flavon a tangeretin zvyšují CYP1A1/2 a do určité míry i CYP2B1/2. Flavanony jsou pravděpodobně specifickým induktorem CYP2B1/2. Ostatní enzymy jako je CYP2E1 a 3A4 nevykazují indukovatelnost flavonoidy. Rovněž některé flavonoidy jako genistein, equol a prenylchalkony nezasahují do regulace CYP. Flavonoidy jako flavanony a flavony indukují i jiné enzymy např. glutathion S-transferasu a UDP-glukuronosyltransferasu. (Hodek et al., 2002)

Přírodní i syntetické flavonoidy účinně inhibují čtyři CYP (CYP1A1, 1A2, 1B1 a 3A4) a jeden steroidogenní cytochrom P450, CYP19. (Hodek et al., 2002) Inhibice aktivity CYP je pravděpodobně způsobena hydroxylovou skupinou ve struktuře flavonoidů. Účinnými inhibitory CYP jsou totiž flavonoidy s hydroxylovými skupinami substituovanými v polohách 5 a 7. 7,8-benzoflavon (obr. 3.4.2.1., str. 49) má rozdílný účinek na expresi lidských CYP. 7,8-benzoflavon je inhibitorem lidských CYP1A1 a 1A2 a aktivátorem CYP3A4. (Hodek et al., 2002) Stiborová M. et al. (2005a) zjistili, že 7,8-benzoflavon stimuluje i aktivitu NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy. Ostatní flavonoidy (5,6-benzoflavon, quercetin, morin) nestimulovaly NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu. (Hodek et al., 2009b)



7,8-benzoflavo

Obr. 3.4.2.1.: Chemická struktura 7,8-benzoflavonu

3.4.2.2. Estrogenní a antiestrogenní účinek flavonoidů

Určitá třída flavonoidů (např. flavony, flavanony) má podobný skelet jako estrogenu. Tyto flavonoidy jsou schopny se vázat na estrogenový receptor a řídit tak jeho aktivitu. Mohou dále blokovat CYP19, který je stěžejním enzymem v biosyntéze estrogenu. Flavonoidy s antiestrogenovým účinkem vykazují protirakovinnou aktivitu, a to zejména ve tkáni, jejíž metabolismus je ovlivňován hormonem (např. v prsu, prostatě). (Hodek et al., 2002)

Aromatasa (CYP19) katalyzuje poslední krok v biosyntéze estrogenů. Tento enzym přeměňuje androgeny, androstendiony, anebo testosterony na estrogenu, estrony a estradioly eliminací methylové skupiny. Aromatasa je lokalizována v membráně endoplasmatického retikula vaječnic, prsu, varlat, prostaty a placenty, v menším množství je také exprimována v mozku a pokožce. (Hodek et al., 2002) Estrogen se podílí na nádorovém bujení, a proto je aromatasa cílem v léčbě tumorů závislých na produkci hormonů.

Flavony a flavanony jsou účinnějšími inhibitory aromatase, než isoflavony a isoflavanony. 4-hydroxyfenylová skupina u isoflavonů na pozici C3 snižuje schopnost inhibice aromatasy. Výskyt hydroxy skupin v určitých pozicích zvyšuje sílu inhibice. Například navázání hydroxylové skupiny na uhlík C7 flavonů zvýší účinek inhibice až dvacetkrát. Na druhou stranu hydroxylová skupina v pozici C3, C5, nebo C6 drasticky sníží aktivitu inhibice. Mezi efektivní inhibitory aromatasy patří 7,8-benzoflavon (obr. 3.4.2.1.) a jeho 9-hydroxyderivát. (Hodek et al., 2002)

3.4.3. Pozitivní účinky flavonoidů na organismy

Flavonoidy mají řadu pozitivních účinků např. antibakteriální, protizánětlivý, analgetický a protialergický účinek. Dále vykazují hepatoprotektivní, antioxidantní, estrogenní a antiestrogenní vlastnosti. (Hodek et al., 2002)

Epidemiologické studie v Číně a Japonsku a laboratorní experimenty *in vitro* se shodují na tom, že flavonoidy obsažené v jídle pomáhají snižovat riziko vzniku nádorového onemocnění, zejména závislého na produkci hormonů (rakovina prsu a prostaty). (Hodek et al., 2002) Epidemiologické studie také ukázaly, že vyšší konzumace červeného vína a zeleného čaje je prevencí srdečních chorob. Mezi další pozitivní účinek flavonoidů patří zmírnění symptomů menopausy. Quercetin (obr. 3.4.4., str. 51) je účinný inhibitor HIV1-proteasy a reversní transkriptasy. (Hodek et al., 2002)

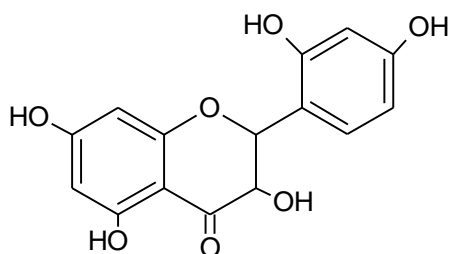
Antitumorové vlastnosti určitých flavonoidů (např. quercetin, myricetin a morin) vycházejí z inhibice topoisomerasy I a II. Flavonoidy také zpomalují proliferaci buněk vazbou na estrogenový receptor. Tyto alkaloidy mohou působit na nádorové bujení vyvoláním apoptózy a jsou schopny ovlivňovat kinasovou aktivitu v mitogenní signalizaci. (Hodek et al., 2002)

3.4.4. Negativní účinky flavonoidů na organismy

Některé flavonoidy mohou vykazovat cytotoxické, mutagenní a prooxidační účinky, ačkoli pro to neexistují přímé důkazy. Flavonoidy zasahují do základních biochemických drah a také reagují s léčivými a s různými složkami v potravě. Rovněž ovlivňují aktivitu CYP, které indukují vznik aduktů s DNA. (Hodek et al., 2009a) Flavonoidy mohou působit i na mikroflóru ve střevech. (Hodek et al., 2009a) Mutagenicita flavonoidů je pravděpodobně závislá na počtu a pozicích hydroxylových skupin. Hydroxylace flavonoidů katalyzovaná CYP může zvýšit genotoxicitu výsledného produktu. Genotoxicita flavonoidů je pravděpodobně způsobena reaktivními formami kyslíku vzniklých autooxidací těchto alkaloidů. Hojně zastoupený flavonoid quercetin (obr. 3.4.4., str. 51) prokázal mutagenicitu v Amesovém testu a schopnost štěpit vlákna DNA. (Hodek et al., 2009a) Quercetin se také váže kovalentně na proteiny v lidských buněčných kulturách. (Walle et al., 2001 in Hodek et al., 2002)

Jacobs et al. (2010) zkoumali působení oxidovaných flavonoidů [quercetin a 7-mono-O-(β -hydroxyethyl)-rutosid (monoHER)] vzniklých z reakce s kyslíkovými radikály. Oxidovaný quercetin reaguje přednostně s glutathionem. Oxidovaný monoHER reaguje více s kyselinou askorbovou. V krevní plasmě glutathion téměř není přítomen, proto quercetin může reagovat s thiolovými proteiny, což vede k cytotoxicitě (např. ke vzrůstu membránové permeability, nebo k narušení funkce enzymů obsahující thiolové skupiny). Oxidovaný monoHER se reakcí s kyselinou askorbovou přemění na původní monoHER a askorbát tak zabrání reakci monoHERu s thiolovými proteiny. (Jacobs et al., 2010)

Vliv flavonoidů na CYP19 může narušit hormonální rovnováhu a způsobit tak neplodnost. Například genistein ve vysokých dávkách vyvolal u experimentálních zvířat neplodnost a sexuální dysfunkci. (Hodek et al., 2009a)



Quercetin

3.4.4. Chemická struktura quercetinu

4. ZÁVĚR

Cílem předkládané bakalářské práce bylo shrnout dosavadní poznatky o alkaloidech sanguinarinu a chelerythrinu, ellipticinu, aristolochových kyselinách a flavonoidech a poukázat na jejich pozitivní a negativní účinky na organismy. Ze získaných informací z literárních zdrojů vyplývá:

Sanguinarin a chelerythrin patří mezi kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (KBA). Hlavním zdrojem sanguinarinu a chelerythrinu jsou *Sanguinaria canadensis L.*, *Chelidonium majus L.*, *Macleaya cordata*. Sanguinarin a chelerythrin působí jako fytoalexiny. Alkaloidy se vyskytují ve formě kvartérního kationtu nebo pseudobáze (6-hydroxy-5,6-dihydroderivátu). Ve vodném prostředí jsou obě formy v rovnováze.

Prvním krokem detoxikačního metabolismu sanguinarinu je pravděpodobně jeho redukce na dihydrosanguinarin. Sanguinarin inhibuje katalytickou aktivitu CYP1A. Toxický účinek sanguinarinu byl snížen premedikací testovaných zvířat aktivátory Ah receptorů, a to 3-methylcholanthrenem, β -naftoflavonem nebo 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem. Nedostatečné informace o enzymech účastnících se metabolismu sanguinarinu a chelerythrinu by měly být podkladem pro další výzkum.

Pozitivní účinky sanguinarinu a chelerythrinu jsou rozmanité. Mezi jejich široké spektrum biologických aktivit patří protizánětlivé, antibakteriální, antiplakové a antimykotické účinky, které se využívají jako aditiva v zubních pastách, ústních vodách a dalších přípravcích ve stomatologii. Dále jsou sanguinarin a chelerythrin využívány jako aditiva přidávána do krmiva zvířat pod názvem Sangrovit[®].

Sanguinarin a chelerythrin ovlivňují signální cesty vedoucí k apoptóze. Alkaloidy aktivují proapoptický protein Bax a inhibují antiapoptický protein Bcl-2 a transkripční faktor NF- κ B. Přesné působení mechanismu však není známo a objasnění vyvolání apoptózy alkaloidy sanguinarinu a chelerythrinu by mohlo být využito jako potenciální agens pro léčbu rakoviny.

Kvartérní kation KBA reaguje s DNA elektrostaticky, kovalentní modifikací, nebo interkalací. Sanguinarin a chelerythrin značí buňku a jádro srovnatelně s typickým interkalátorem ethydidium bromidem. Značení DNA pomocí benzo[c]fenanthridinových alkaloidů umožňuje sledovat struktury jader a buněk, rozlišit množství DNA v jednotlivých buňkách a stanovit fáze buněčného cyklu. Tyto sondy jsou schopné určit zastoupení proliferujících buněk v nádorové tkáni.

Mezi negativní účinky sanguinarinu a chelerythrinu patří genotoxický účinek, který nebyl přímo prokázán. KBA by mohly být zodpovědné za vznik prekancerózních lézí na sliznici dutiny ústní při dlouhodobém používání zubních přípravků. Další neobjasněné toxické působení sanguinarinu a chelerythrinu je přisuzováno otravě „*epidemic dropsy syndrom*“ z oleje ze semen rostlin rodu *Argemone mexicana*. Znalost metabolických přeměn sanguinarinu a chelerythrinu by pomohla objasnit toxicitu způsobenou tímto olejem.

Ellipticin se vyskytuje v rostlinách čeledi toješťovitých (*Apocyanaceae*) např. *Ochrosia borbonica*, *Excavatia coccinea*. Z chemického hlediska je ellipticin 5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol.

Cytochromy P450 ellipticin oxidují na 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticin (detoxikační metabolity), 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu jsou aktivačními metabolity. Nejúčinnějším lidským CYP oxidujícím ellipticin je CYP3A4, který oxiduje ellipticin za vzniku právě reaktivních metabolitů. Spontánním štěpením 13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticinu bez účasti enzymů vznikají karbeniové ionty (ellipticin 13-ylum, ellipticin 12-ylum), které tvoří adukty s deoxyguanosem v DNA. 13-hydroxy a 12-hydroxyellipticin jsou kandidáty pro zacílení do tumorů bez aktivace enzymů.

V buňkách s nízkým obsahem cytochromů P450 jsou tvořeny adukty ellipticinu s DNA pravděpodobně jeho aktivací peroxidasami (např. lidská cyklooxygenasa-2, ovčí cyklooxygenasa-1, hovězí laktoperoxidasa, lidská myeloperoxidasa). Peroxidasy oxidují ellipticin na dimer ellipticinu, methylenimin ellipticinu a N²-oxid ellipticinu.

Ellipticin vykazuje řadu účinků na nádorové buněčné linie. Jeho nespecifická antineoplastická aktivita se vyznačuje interkalací do DNA a inhibicí aktivity topoisomerasy II. Specifická antitumorová aktivita ellipticinu probíhá pravděpodobně jiným mechanismem; ellipticin se po aktivaci CYP a peroxidasami váže na DNA kovalentně. Antitumorová aktivita ellipticinu a jeho derivátů se také vyznačuje kombinací mechanismů zastavení buněčného cyklu a indukci apoptózy. Detailní znalost mechanismu působení ellipticinu na nádorové buňky je příležitostí pro další výzkum využitelný v léčbě nádorových onemocnění.

Mezi negativní účinky ellipticinu patří jeho genotoxické účinky. Ellipticin tvoří adukty s DNA i ve zdravých tkáních. Většina poškozené DNA je však opravena reparačními systémy zdravých buněk, adukty nejsou peristentí.

Aristolochová kyselina AA je rostlinný extrakt z rostlin rodu *Aristolochia*, představující čeleď *Aristolochiaceae* (např. *Aristolochia clematitis*, *Aristolochia fangchi*). Majoritní sloučeniny směsi AA jsou 8-methoxy-6-nitro-fenanthro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-karboxylová kyselina (AAI) a 6-nitro-fenanthro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-karboxylová kyselina (AAII).

Převažující metabolity biotransformace AA jsou aristolaktamy, které jsou vylučovány volně nebo jako konjugáty močí a výkaly. Prvním krokem metabolismu aristolochové kyseliny AAI je nitroredukce a vznik *N*-hydroxyaristolaktamu I. Tento metabolit může vytvořit cyklický *N*-acylnitreniový ion s delokalizovaným pozitivním nábojem, který je příčinou vzniku persistentního aduktu s DNA, dA – AA1. Nejvýznamnější enzym aktivující AAI je cytosolická NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (NQO1). Oxidace AAI na aristolochovou kyselinu Ia je detoxikační dráha metabolismu AA. Aristolaktam I i aristolochová kyselina Ia podstupují reakce s konjugačními enzymy za vzniku konjugátů. Přesné působení CYP v metabolismu AA není dosud známo. Aktivace aristolochových kyselin konjugačními enzymy je též nejasná. Detailnější prozkoumání enzymů v metabolismu aristolochových kyselin by pomohlo objasnit vliv AA na nefrotoxicitu a karcenogenitu.

Aristolochové kyseliny se stávají po metabolické aktivaci kancerogeny, nefrotoxiny a genotoxickými mutageny. Majoritní adutky aristolochových kyselin s DNA jsou dG – AAI (7-(deoxyguanosin-N²-yl)aristolaktam I), dA – AAI (7-(deoxyadenosin-N⁶-yl)aristolaktam I) a v malém množství dA – AAII (7-(deoxyadenosin-N⁶-yl)aristolaktam II). Adukt dA – AAI je v cílové tkáni premutagenní lézí vedoucí k transversní mutaci AT → TA v genu *p53*. Tato mutace vyvolává kancerogenezi uroteliálního traktu.

Aristolochové kyseliny způsobují nefropatii vyvolanou aristolochovými kyselinami (AAN). Choroba se vyznačuje intersticiální fibrosou ledvin, která směřuje k totálnímu selhání ledvin. Nefrotoxicita byla vyvolána rostlinou *Aristolochia fangchi*. Další výzkum zaměřený na genetický polymorfismus NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy by mohl odhalit, proč se rakovina uroteliálního traktu rozvinula jen u některých pacientů trpících AAN.

Další onemocnění ledvin, jehož příčinou může být AAI je Balkánská endemická nefropatie. Mezi touto nefropatií a nefropatií způsobenou aristolochovými kyselinami jsou značné podobnosti. BEN způsobuje změny ve strukturách tubulů ledvin a intersticiální fibrosu vedoucí k úplné atrofii orgánu. U pacientů BEN se také objevuje rakovina uroteliálního traktu.

Flavonoidy představují fytochemické sloučeniny, které jsou charakterizovány antioxidantními vlastnostmi a schopností modulovat některé enzymy (např. CYP) nebo buněčné receptory (např. estrogenní receptor). Podle jejich struktury jsou flavonoidy klasifikovány do osmi skupin: flavany, flavanony, isoflavanony, flavony, isoflavony, antokyanidiny, chalkony a flavonoligandy. Přírodní flavonoidy se obvykle vyskytují jako glykosidy, ale existují i ve složitějších formách jako flavonolignany (silybin), nebo estery katechinů.

Flavonoidy jsou metabolizovány střevní mikroflórou, kde jsou flavonoidové glykosidy štěpeny na volné flavonoidy (aglykony), které jsou dále absorbovány střevní stěnou. Dále jsou tyto alkaloidy v játrech hydroxylovány nebo *O*-demetylovány cytochromy P450. Důležité jsou i konjugační enzymy druhé fáze biotransformace, které katalyzují např. glukuronidaci, sulfonaci a *O*-methylaci flavonoidů.

Flavonoidy indukují expresi cytochromu P450, nebo modulují jejich enzymovou aktivitu. Flavonoidy také podléhají metabolismu katalyzovanému cytochromem P450. Flavanony a flavony jsou schopny se vázat na estrogenní receptor a řídit tak jeho aktivitu. Flavonoidy s antiestrogenním účinkem jsou potenciálním cílem pro léčbu nádorů závislých na produkci hormonů.

Mezi pozitivní účinky flavonoidů patří např. antibakteriální, protizánětlivý a protialergický účinek. Dále jsou využívány hepatoprotektivní vlastnosti v prevenci srdečních chorob. Významným pozitivním účinkem flavonoidů je jejich antioxidantní aktivita.

Flavonoidy však mohou působit cytotoxickými, mutagenními a prooxidačními účinky. Ovlivňují koncentraci léčiva v krevní plasmě a mohou vyvolat předávkování nebo ztrátu terapeutického efektu léčiva důsledkem indukce CYP nebo modulace aktivity CYP. I když mají flavonoidy řadu pozitivních účinků, jsou cizorodými látkami pro lidský organismus. Proto je nezbytný podrobnější výzkum metabolismu flavonoidů a jejich vliv při dlouhodobém užívání.

Seznam použité literatury

Aimová D., Svobodová L., Kotrbová V., Mrázová B., Hodek P., Hudeček J., Václavíková R., Frei E., Stiborová M.: *Drug. Metab. Dispos.* 35, 1926-1934 (2007)

Arlt V. M., Stiborová M., Schmeiser H. H.: *Mutagenesis* 17, 265-277 (2002)

Arlt V. M., Stiborová M., Brocke J., Simões M. L., Lord G. M., Nortier J. L., Hollstein M., Phillips D. H., Schmeiser H. H.: *Carcinogenesis* 28, 2253-2261 (2007)

Das A., Mukherjee A., Chakrabarti J.: *Mutat. Res.* 563, 81 (2004)

Ding Z., Tang S. C., Weerasinghe P., Yang X., Pater A., Liepins A.: *Biochem. Pharmacol.* 63, 1415 (2002)

Dostál J.: *J. Chem. Educ.* 77, 993-998 (2000)

Dostál J.; Slavík J.: *Chem. Listy* 94, 15 – 20 (2000)

Dvořák Z.; Šimánek V.: *Curr. Drug. Metab.* 8, 173-176, (2007)

Fernandez N., Roy M., Lesca P.: *Eur. J. Biochem.* 172, 585-592 (1988)

Froelich-Ammon S. J., Patchan M. W., Osheroff N., Thompson R.B.: *J. Biol. Chem.* 270, 14998-15004 (1995)

Gasiewicz T. A., Kende R. S., Rucci G., Whitney B., Willey J. J.: *Biochem. Pharmacol.* 52, 1787-1830 (1996)

Hodek P., Trefil P., Stiborová M.: *Chem. Biol. Interac.* 139, 1-21 (2002)

Hodek P., Křížková J., Burdová K., Šulc M., Kizek R., Hudeček J., Stiborová M.: *Chem. Biol. Interac.* 180, 1-9 (2009a)

Hodek P., Teplá M., Křížková J., Šulc M., Stiborová M.: *Neuroendocrinol. Lett.* 30, 67-71 (2009b)

Hu C. M., Cheng Y. W., Liao J. W., Cheng H. W., Kang J. J.: *J. Biomed. Sci.* 12, 399 (2005)

Chan S. L., Lee M. C. Tan K. O., Yang L. K., Lee A. S. Y., Flotow H., Fu N. Y., Butler M. S., Soejarto D. D., Buss A. D., Yu V. C.: *Biol. Chem.* 278, 20453 (2003)

Chang C.Y., Puga A.: *Mol. Cell. Biol.* 18, 525-535 (1998)

Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M.: *Chem. Listy* 95, 212 – 222 (2001)

Jacobs H., Moalin M., Bast A., Wim J. F. van der Vijgh, Haenen G. R. M. M.: *PLoS ONE* 5, 1-9 (2010)

Kosina P., Walterová D., Ulrichová J., Lichnovský V., Stiborová M., Rydlová H., Vičar J., Krečman V., Brabec M. J., Šimánek V.: *Food Chem. Toxicol.* 42, 85-91 (2004)

Křemen J.

http://ubeo.lf1.cuni.cz/Studenti/Texty/MOLEKULARNI%20KARCINOGENEZE_2009_10.pdf (11.3. 2011)

Kuo P. L., Hsu Y. L., Chang C. H., Lin C. C.: *Cancer Lett.* 223, 293-301 (2005)

Mengs U., Lang W., Poch J. A.: *Arch. Toxicol.* 51, 107-119 (1982)

Pfau W, Schmeiser H. H., Wiessler M.: *Carcinogenesis* 11, 313-319 (1990)

Pfau W, Schmeiser H. H., Wiessler M.: *Chem. Res. Toxicol.* 4, 581-586 (1991)

Poljaková J., Stiborová M.: *Chem. Listy* 98, 298 (2004)

Psotová J., Klejdus B., Večeřa R., Kosina P., Kubáň V., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: *J. Chromatogr. B* 830, 165 (2006a)

Psotová J., Večeřa R., Zdařilová A., Anzenbacherová E., Kosina P., Svoboda A., Hrbáč J., Jirovský D., Stiborová M., Lichovský V., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: *Vet. Med.* 51, 145 – 155 (2006b)

Racek J., Holeček V.: *Chem. Listy* 93, 774 – 780 (1999)

Rekha GK, Sládek NE.: *Cancer Chemother Pharmacol* 40, 215-224 (1997)

Rupertová M., Wiesner J., Hudeček J., Wiessler M., Frei E.: *Cancer Res.* 64, 8374-8380 (2004)

Rusek V., <http://webak.upce.cz/~uozp/skripta/uozp-skripta-tox-rusek.pdf> (9.4. 2011)

Sen A., Maiti M.: *Biochem. Pharmacol.* 48, 2097 (1994)

Sen A., Ray A., Maiti M.: *Biophys. Chem.* 59, 155 (1996)

Schmeiser H. H., Schoepe K.-B., Wiessler M.: *Carcinogenesis* 9, 297-303 (1988)

Schmeiser H. H., Stiborová M., Arlt V. M.: *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* 12, 141-148 (2009)

Slaninová A., Slanina J., Táborská E.: *Cytometry A* 71, 700 (2007)

Slaninová A., Slanina J., Táborská E.: *Chem. Listy* 102, 427 – 433 (2008)

Stiborová M., Fernando R. C., Schmeiser H. H., Frei E., Pfau W., Wiessler M.: *Carcinogenesis* 15, 1187-1192 (1994)

Stiborová M.; Hudeček J.; Hodek P.; Frei E.: *Chem. Listy* 93, 229 – 237 (1999)

Stiborová M., Mikšanová M.: *Živa* 4, 146 (1999)

Stiborová M., Šimánek V., Frei E., Hobza P., Ulrichová J.: *Chem. Biol. Interact.* 140, 231-242 (2002)

Stiborová M.; Hudeček J.; Páca J. JR.; Martínek V.; Páca J.: *Chem. Listy* 98, 876 – 890 (2004a)

Stiborová M., Sejbal J., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Poljaková J., Forsterová K., Rupertová K., Rupertová M., Wiesner J., hudeček J., Wiessler M., Frei E.: *Cancer Res.* 64, 8374-8380 (2004b)

Stiborová M., Frei E., Hodek P., Wiessler M., Schmeiser H. H.: *Int. J. Cancer* 113, 189-197 (2005a)

Stiborová M., Patočka J., Frei E., Schmeiser H. H.: *Chem. Listy* 99, 782-788 (2005b)

Stiborová M., Rupertová M., Schmeiser H. H., Frei E.: *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 150, 13-23 (2006)

Stiborová M., Poljaková J., Ryšlavá H., Dračínský M., Eckschlager T, Frei E.: *Int. J. Cancer* 120, 243-251 (2007a)

Stiborová M, Rupertová M, Aimová D, Ryšlavá H, Frei E.: *Toxicology* 236, 50-60 (2007b)

Stiborová M., Frei E., Arlt V. M., Schmeiser H. H.: *Mutat Res.* 658, 55-67 (2008a)

Stiborová M., Frei E., Schmeiser H. H.: *Kidney Int.* 73, 1209-1211 (2008b)

Stiborová M., Frei E., Arlt V. M., Schmeiser H. H.: *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 153, 5-12 (2009)

Stiborová M., *Biochemie jako teoretický základ biomedicíny*, přednáška na PřF UK, katedra biochemie, Praha (2011)

Stiborová M. <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf> (11.3. 2011)

Stiborová M., Rupertová M. Frei E.: *Biochim. Biophys. Acta* 1814, 175-185 (2011)

Stratil P.; Kubáň V.: *Chem. Listy* 98, 379-387 (2004)

Taylor M. G., Massey V.: *J. Biol. Chem.* 265, 13687 (1990)

Walle U. K., Nolan T., Walle T.: *FASEB J.* 15, A986 (2001)

Wang M., Roberts L. D., Paschke R., Shea M. T., Masters S. S. B., Kim P. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 8411 (1997)

Weerasinghe P., Hallock S., Liepins A.: *Exp. Mol. Pathol.* 71, 89 (2001)

Williams M. K., Dalvi S., Dalvi R. R.: *Vet. Hum. Toxicol.* 42, 196 (2000)

Zdařilová A., Malíková J., Dvořák Z., Ulrichová J., Šimánek V.: *Chem. Listy* 100, 30 - 41 (2006)

