

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Johana Hrdinová

STUDIUM INDUKCE INTESTINÁLNÍCH KONJUGAČNÍCH
ENZYMŮ DOPLŇKY STRAVY

Study on the induction of intestinal conjugation enzymes by food
supplements

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2013

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto 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.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 13. května 2013.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při tvorbě této práce.

Dále bych chtěla poděkovat svým kolegům za vytvoření výborného pracovního prostředí a v neposlední řadě mé rodině a přátelům za podporu během studia.

ABSTRAKT

Cytochromy P450 (CYP) jsou enzymy hrající důležitou roli při metabolismu exogenních látek (například léčiv, kancerogenů, polutantů) a účastní se metabolismu hydrofobních endogenních substrátů (například sterolů, mastných kyselin, prostaglandinů). Cytochromy podrodiny CYP1A se účastní aktivace prekancerogenů. Jelikož konzumace potravních doplňků obsahujících chemopreventivní látky (například flavonoidy), které mohou bránit procesu kancerogeneze, v posledních letech výrazně stoupá, přestože tyto látky mohou mít na organismus také negativní účinek. Jsou totiž schopné cytochromy P450 indukovat, a tím navýšit riziko aktivace prekancerogenů. V této práci byl sledován indukční efekt některých flavonoidních látek: β -naftoflavonu, myricetinu, dihydromyricetinu a léčiva obsahujícího výtažek z červených listů vinné révy - Antistax®.

Klíčová slova: transferasy, Western blot, protilátky, kancerogeny

ABSTRACT

Cytochrome P450s (CYP) are enzymes, that play an important role in the metabolism of foreign compounds (e.g. drugs, carcinogens, pollutants) and they also participate in the metabolism of hydrophobic endogenic substrates (e.g. sterols, fatty acids, prostaglandins). Cytochromes of subfamily CYP1A are involved in activation of precarcinogens. Whereas the consumption of dietary supplements containing chemopreventive substances (e.g. flavonoids) that can prevent the process of carcinogenesis is significantly increasing in recent years, although these substances may also have a negative effect on the organism. That because these substances can induce the cytochrome P450s and thus increase the risk of activation precarcinogens. In this study had been investigated the inductive effect of some flavonoids compounds – β -naphthoflavone, myricetin, dihydromyricetin and a drug containing an extract of red vine leaves - Antistax®.

Key words: transferases, Western blot, antibody, carcinogens

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
1 TEORETICKÝ ÚVOD	9
1.1 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK	9
1.1.1 První fáze biotransformace	10
1.1.2 Druhá fáze biotransformace	11
1.2 CYTOCHROMY P450	11
1.2.1 Charakteristika cytochrom P450	11
1.2.2 Klasifikace cytochromů P450	12
1.2.3 Struktura molekuly mikrosomálních cytochromů P450	13
1.2.4 Systém oxidas se smíšenou funkcí (MFO systém)	14
1.2.5 Mechanismus katalýzy cytochromů P450	14
1.2.6 Podrodina cytochromů CYP1A	16
1.2.7 Indukce, inhibice a stimulace cytochromů P450	16
1.3 KANCEROGENEZE	17
1.3.1 Chemické kancerogeny	18
1.4 CHEMOPREVENCE RAKOVINY	20
1.4.1 Flavonoidní látky	20
1.4.1.1 Modulace aktivity CYP flavonoidními sloučeninami.....	21
2 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	23
3 MATERIÁL A METODY	24
3.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	24
3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A MATERIÁL	26
3.3 METODY	28
3.3.1 Premedikace potkanů.....	28
3.3.2 Izolace mikrosomální frakce	29
3.3.3 Stanovení proteinů	30
3.3.4 Diskontinuální elektroforéza SDS-PAGE	31
3.3.5 Metoda Western blot	32
3.3.6 Stanovení enzymové aktivity 7-ethoxyresorufin-O-deethylasy (EROD) a 7-methoxyresorufin-O-demethylasy (MROD).....	33

4 VÝSLEDKY	35
4.1 IZOLACE MIKROSOMÁLNÍ FRAKCE A STANOVENÍ PROTEINŮ ..	35
4.2 VLIV FLAVONOIDNÍCH LÁTEK NA EXPRESI PROTEINŮ CYP1A1 A CYP1A2	36
4.3 VLIV FLAVONOIDNÍCH LÁTEK NA ENZYMOVOU AKTIVITU CYTOCHROMŮ P450	38
5 DISKUZE	41
6 ZÁVĚR	44
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky
B[a]P	benzo[a]pyren
BCA	bicinchoninová kyselina
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát/nitro blue tetrazolium
BIS	N,N'-methylenbis(akrylamid)
BNF	β-naftoflavon
BSA	hovězí sérový albumin
CBB	Coomassie brilliant blue
CYP	cytochrom P450
Da	Dalton – atomová hmotnostní jednotka
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EROD	7-ethoxyresorufin-O-deethylace
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
GIT	gastrointestinální trakt
MFO	oxygenasa se smíšenou funkcí
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MROD	7-methoxyresorufin-O-demethylace
MS	mikrosomální frakce
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PBS	fosfátem pufovaný isotonický roztok solí
PCB	polychlorované bifenyly
p.o.	perorální podání
PVDF	polyvinylidenfluorid
RH	substrát
ROH	hydroxylovaný substrát
RPM	otáčky za minutu

SDS	dodecylsulfát sodný
TCDD	2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. TEORETICKÝ ÚVOD

S rozvojem vědy a techniky dochází k rozmachu průmyslu a dopravy, hromadění odpadů a časté chemizaci prostředí. Živé organismy jsou tudíž vystaveny působení cizorodých látek, které dříve nebyly běžné nebo vůbec neexistovaly. Mezi takové látky patří například: pesticidy, barviva, nitrosloučeniny, aromatické aminy, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), fenolické sloučeniny, ale i léčiva, jejichž účinkům se záměrně vystavujeme [1]. Mnohé z těchto látek mohou u člověka vyvolat různá onemocnění, jako jsou astma, diabetes, rakovina atd.

Abychom mohli škodlivým efektům těchto látek předcházet či je eliminovat, je důležité porozumět mechanismu jejich působení. Významnou roli v těchto mechanismech hrají biotransformační enzymy, které dané látky metabolizují. Příkladem takovýchto enzymů jsou cytochromy P450.

1.1 Biotransformace xenobiotik

Xenobiotika jsou látky, které se v organismu běžně nevyskytují a nejsou potřebné jako zdroj energie ani pro zdravý vývoj organismu [2]. Xenobiotika mohou být hydrofobní látky. Tato vlastnost jim umožňuje snadný vstup biologickými membránami, ale je překážkou pro jejich eliminaci z organismu. Molekuly xenobiotik je tedy nutné biotransformovat na molekuly polárnější, které se vylučují z organismu snadněji [3].

Biotransformace (metabolismus) cizorodých látek je proces vedoucí k jejich snadnějšímu vyloučení nebo potlačení jejich biologických efektů na organismus [1]. Při biotransformaci se mění fyzikálně-chemické vlastnosti molekul xenobiotik tak, aby ve výsledku byla upřednostněna jejich exkrece. Tuto úlohu v organismu zajišťují biotransformační enzymy [4]. Tyto enzymy mají širokou substrátovou specifitu, proto jsou schopny přeměňovat látky exogenní i endogenní.

Bakterie využívají biotransformačních enzymů ve svůj prospěch – aktivují xenobiotika a využívají je jako zdroj energie či uhlíku. Živočichové se biotransformační

enzymy snaží naopak eliminovat cizorodé sloučeniny, a proto během evoluce vznikly různé skupiny těchto enzymových systémů [5].

Biotransformační reakce můžeme rozdělit na dvě fáze. První fází je fáze derivatizační. Tato fáze zahrnuje pochody, které zvyšují polárity xenobiotik a zavedením funkční skupiny do xenobiotika pro druhou fázi biotransformace. Druhou fází představují reakce, při kterých dochází ke konjugaci polarizované molekuly xenobiotika s látkami těla vlastními (endogenními). Konečným produktem druhé fáze biotransformace je molekula lépe rozpustná ve vodě, která může být z organismu snadněji vyloučena [6, 7].

1.1.1 První fáze biotransformace

Při první fázi biotransformace se uplatňují reakce oxidační, redukční a hydrolytické. Dochází k zavedení či zpřístupnění funkční skupiny, které se později stávají reakčními centry další fáze biotransformace. Nejhojněji se vyskytují enzymy, které katalyzují oxidační reakce. Mezi tyto enzymy řadíme například oxygenasy nebo peroxidasy.

Nejdůležitější roli v této fázi mají monooxygenasy, které zahrnují cytochromy P450 a flavinové monooxygenasy. Tyto enzymy využívají ke své funkci molekulu biatomického kyslíku a kofaktor, který je schopný tuto molekulu aktivovat (hem či FAD). Atom kyslíku je inkorporován do molekuly substrátu, přičemž druhý atom kyslíku je redukován na vodu [8].

Peroxidasy využívají k oxidaci současnou redukci peroxidu vodíku. Mají širokou substrátovou specifitu, prosthetickou skupinou je zde hemově vázaný atom železa [9].

1.1.2 Druhá fáze biotransformace

Ve druhé fázi biotransformace dochází k reakci funkční skupiny xenobiotika s polárním endogenním substrátem. Mezi významné reakce patří konjugace s kyselinou glukuronovou, acetátem či s některými aminokyselinami. Po proběhnutí této reakce je polarita xenobiotika prudce zvýšena a jeho molekula je vyloučena z organismu [7].

Většinu reakcí druhé biotransformační fáze katalyzuje enzym UDP-glukuronyltransferáza. Jako donor glukuronátu slouží UDP-glukuronová kyselina. Vzniklý metabolit je z organismu posléze vyloučen močí nebo žlučí [10].

Další významná reakce je reakce s glutathionem, kterou katalyzuje glutathion-S-transferasa. Tato reakce zabezpečuje detoxikaci molekul, které ve své struktuře obsahují elektrofilní centra. Tato centra se mohou vázat na nukleofily (například nukleové kyseliny a proteiny) a způsobit poškození genetického materiálu nebo buňky. Konjugáty glutathionu mohou být z těla vyloučeny žlučí anebo ve formě merkapturových kyselin močí.

Ne všechna xenobiotika podstupují obě fáze biotransformace. Příkladem jsou opiové alkaloidy morfin a kodein. Kodein je pomocí cytochromu P450 (CYP2D6) demetylován na aktivní morfin, ten je posléze konjugován s kyselinou glukuronovou za vzniku morfin-3-glukuronidu [11, 12].

1.2 Cytochromy P450

1.2.1 Charakteristika cytochromů P450

Cytochromy P450 patří mezi hemové proteiny. Roku 1958 byly objeveny v savčích jaterních mikrosomech a popsány Garfínkelem a Klingenbergem [13, 14]. Vyskytují se v mnoha organismech včetně hub, bakterií, ryb, hmyzu, rostlin a savců.

Název „cytochromy P450“ vychází z poznatku, že redukovaná forma tohoto hemoproteinu v komplexu s oxidem uhelnatým vykazuje silné absorpční maximum při vlnové délce 450 nm, písmeno P značí, že se jedná o pigment [15].

Tyto enzymy se od ostatních hemoproteinů liší katalytickými a spektrálními vlastnostmi, které podmiňuje především typ vazby porfyrinového skeletu [16]. Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je v aktivním centru enzymu vázán hydrofobními interakcemi a pomocí thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu [17].

Cytochromy můžeme dělit podle toho, zda metabolizují exogenní (tzv. detoxikační cytochromy P450), či endogenní látky [18]. Rozšíření detoxikačních cytochromů P450 zapříčinila tzv. chemická válka mezi živočišnou a rostlinnou říší, ve které se živočichové snažili vypořádat s fytotoxiny rostlin v přijímané potravě [19].

U savců jsou cytochromy nejhojněji zastoupeny v játrech [20]. Dále se vyskytují ve tkáních gastrointestinálního traktu, plicích, ledvinách, mozku a v nízkých koncentracích také příklad ve tkáni nosní sliznice či srdečním svalu [21].

1.2.2 Klasifikace cytochromů P450

Cytochromy dělíme do genetických rodin a podrodin na základě homologie jejich primární struktury (pořadí aminokyselin) proteinových molekul [22].

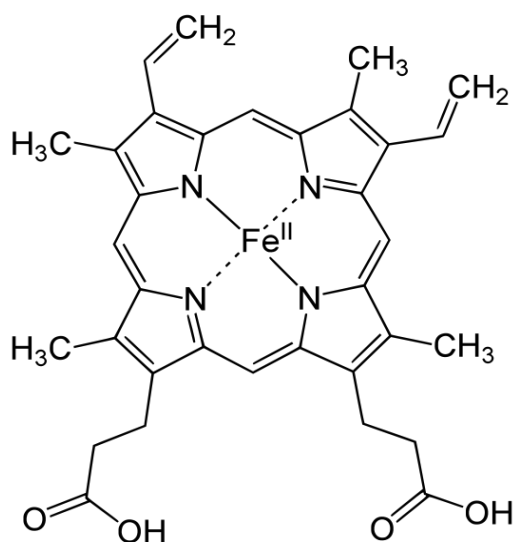
Nové systematické názvosloví navrhl Nebert a kolektiv – formy P450 se označují zkratkou CYP (dle názvu cytochrom P450), rodiny se označují arabskou číslicí za zkratkou CYP. Podrodiny jsou označovány pomocí velkého písmene a konkrétní forma je určena arabskou číslicí na konci názvu (např. CYP1A2). Do stejných rodin náleží cytochromy P450, jenž mají minimálně 40% homologii aminokyselinové sekvence. Do stejné podrodiny řadíme cytochromy s homologií nejméně 60%.

Cytochromy v lidském organismu jsou řazeny do 17 skupin. Metabolismu xenobiotik se účastní především cytochromy ze 3 rodin CYP1, CYP2 a CYP3 (v malé míře i CYP4), zbylé rodiny se podílí na biosyntéze endogenních sloučenin (cholesterol, žlučové kyseliny, atd.) [23].

1.2.3 Struktura molekuly mikrosomálních cytochromů P450

Mikrosomální cytochromy P450 jsou proteiny s molekulovou hmotností kolem 50 000 Da, které jsou asociované s fosfolipidovou dvouvrstvou endoplasmatického retikula [24, 25]. Ukotvení na membránu zprostředkovává N-terminální hydrofobní doména, která čítá 20 až 25 aminokyselin [19]. Směrem do cytosolu je orientována C-terminální hydrofilní doména, která zodpovídá za katalytickou funkci enzymu.

Cytochromy P450 jsou řazeny mezi hemoproteiny typu b. Ve své struktuře obsahují apoprotein, ale i nebílkovinnou složku - hem b (*Obr. 1.1*) neboli Fe-protoporfyrin IX [26]. Atom železa je ve skeletu protoporfyrinu IX koordinováno dusíky tetrapyrolového jádra a thiolátové síry cysteinu, která je pátým ligandem. Pro katalytickou aktivitu cytochromů (aktivaci molekuly kyslíku) je velice důležitá koordinační Fe-S vazba s vysokou elektronovou hustotou na atomu železa [27]. Tato vazba je též zodpovědná za vznik charakteristického absorpčního spektra komplexu redukované formy cytochromu P450 s oxidem uhelnatým při 450 nm. Při poškození vazby Fe-S, k čemuž dochází například při denaturaci, přechází cytochrom P450 na katalyticky neaktivní formu P420 [28].



Obr. 1.1: Hem b

1.2.4 Systém oxidas se smíšenou funkcí (MFO systém)

Systém oxidas se smíšenou funkcí je soubor enzymů, které katalyzují řadu oxidačních, oxigenačních, či redukčních reakcí. Systém při těchto reakcích využívá především molekulární kyslík. Podle mechanismu katalýzy je také nazýván monooxygenasový systém.

Monooxygenasový systém se skládá ze 3 částí:

1) cytochrom P450

2) biologická membrána

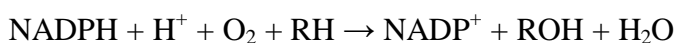
Lipidy membrány ovlivňují konformaci molekuly cytochromu P450 a zvyšují jeho afinitu k substrátu. Zároveň shromažďují hydrofobní substráty cytochromů P450 [23].

3) NADPH:cytochrom P450 reduktasa

Molekulová hmotnost tohoto enzymu je okolo 80 000 Da [28]. Obsahuje FMN i FAD koenzymy, a díky tomu může působit jako dělič elektronového páru, který postupně dodává elektrony cytochromu P450.

1.2.5 Mechanismus katalýzy cytochromů P450

Cytochromy P450 nejčastěji katalyzují oxidační reakce, při kterých přenáší jeden atom z molekulárního kyslíku na substrát, přičemž z druhého atomu kyslíku vzniká voda [29]. Obecně lze reakci katalýzy cytochromem P450 tedy zapsat ve formě:

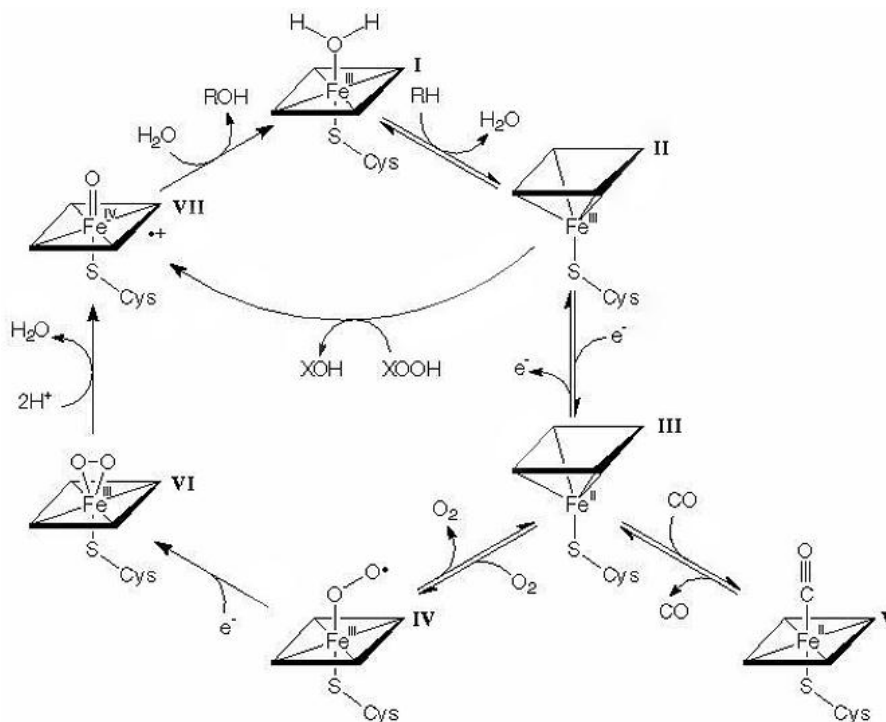


kde RH je substrát cytochromu a ROH je hydroxylovaný produkt reakce.

Cyklus katalýzy cytochromem P450 je na *Obr. 1.2*. V klidovém stavu se atom železa nachází ve trojmocném (nízkospinovém) stavu a je hexakoordinován – šestý ligand tvoří voda (I). Při navázání substrátu na trojmocné železo cytochromu P450 dochází k uvolnění molekuly vody (šestého ligandu). Atom hemového železa nadále zůstává v trojmocném stavu, avšak dochází ke konformační změně molekuly enzymu

(II). Následně dojde k přenosu elektronu z NADPH:cytochrom P450 reductasy, při čemž je atom hemového železa redukován na dvojmocnou formu a komplex zůstává pentakoordinován (ve vysokospinovém stavu). Tato forma enzymu může vázat ligandy hemu, například molekulu kyslíku (III) a (V). V tomto kroku je tvořen ternální komplex. Následkem vzniku tohoto komplexu dochází k přechodu do mezomerního stavu na tzv. Fe^{3+} -superoxidový komplex. Tento komplex je později redukován druhým elektronem pomocí NADPH:cytochrom P450 reductasy a kyslík je aktivován na peroxidový anion (IV). Tato reakce je posledním stupněm tzv. aktivační fáze reakčního cyklu cytochromu P450.

Dalším krokem je rozštěpení O-O vazby. Jeden atom kyslíku v redukovaném stavu přijme dva protony a dojde k uvolnění molekuly vody (VI). Druhý atom kyslíku zůstane navázán na hemové železo, tím vznikne tzv. Fe^{4+} -oxenový komplex (VII). V dalším kroku dochází k odštěpení atomu vodíku z molekuly substrátu a vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu, který je vázán na ion hemového železa. Následně dojde k rekombinaci radikálů, při které se uvolní molekula hydroxylovaného substrátu (ROH) a regeneruje se původní forma cytochromu P450 [29].



Obr. 1.2: Mechanismus katalýzy cytochromu P450 (převzato a upraveno z [30])

1.2.6 Podrodina cytochromů CYP1A

Podrodina CYP1A se skládá z forem CYP 1A1 a CYP1A2. Tito zástupci mohou aktivovat až 90 % známých kancerogenů – účastní se biotransformace aromatických aminů, heterocyklických aminů, ale i polycyklických aromatických uhlovodíků [21].

Tyto dvě formy vykazují téměř 70% totožnost v aminokyselinové sekvenci a katalyzují podobné reakce (někdy i zcela shodné). Liší se ale v lokalizaci v organismu.

Forma CYP1A1 se vyskytuje především v plicích, mozku, srdci a GIT. Vysoká aktivita tohoto enzymu je spojena s výskytem kolonrektálních nádorů [31].

Forma CYP1A2 je jaterní enzym se širokou substrátovou specifitou. Jeho významnými substráty jsou například aromatické aminy, které jsou pyrolytickými produkty tepelně upravovaných potravin. Tato forma CYP také metabolizuje léčiva jako kofein či theophyllin [32].

1.2.7 Indukce, inhibice a stimulace cytochromů P450

Koncentrace cytochromů P450 v organismu často závisí na vlivu vnějšího prostředí, hladině určitých hormonů a cytokinů v krvi, pohlaví, stáří či na genetických dispozicích.

Z hlediska indukce dělíme cytochromy P450 na inducibilní a konstitutivní. Koncentrace inducibilních cytochromů P450 závisí na působení induktoru, zatímco koncentrace konstitutivních cytochromů P450 je v organismu víceméně stálá. Indukci způsobují substráty, ale i další látky exogenního nebo endogenního původu. Příslušné buněčné receptory aktivují transkripční faktory. Mezi tyto receptory patří například receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR). Komplex ligand-receptor vstupuje do jádra buňky, kde spouští transkripci genu daného enzymu do mRNA a vyvolá tak tvorbu příslušného proteinu.

Inhibici enzymu často způsobuje vazba jiné látky než substrátu do jeho aktivního centra. Tato vazba může být dočasná, ale může enzym i trvale poškodit. Inhibitor se může navázat na komplex enzym-substrát, a tím ho inaktivovat nebo může dojít ke kompetitivní inhibici, kde inhibitor soutěží s enzymem o stejné vazebné místo [33, 34].

Specifická aktivita cytochromů P450 může být stimulována některými chemopreventivními sloučeninami neobsahujícími hydroxylovou skupinu.

O působení chemopreventivních sloučenin je podrobněji pojednáno v kapitole 1.4.1.1.

Některé induktory a inhibitory CYP1A1 a CYP1A2 jsou uvedeny v *Tabulce 1.1*.

Tab.1.1: Přehled CYP1A1 a 1A2 (sestaveno podle [29, 33, 35])

Cytochrom P450	substrát	inhibitor	induktor
1A1	warfarin, steroidní hormony, nikotin, benzo[a]pyren, PAH	PCB, dioxiny, flavonoidy, PAH	retinol, flavonoidy, cholekalciferol
1A2	retinal, PAH, kofein, steroidní hormony	PCB, PAH, TCDD, karbinol, kouření	serotonin, dopamin, tryptofan, flavonoidy

PCB - polychlorované bifenyly, PAH - polycyklické aromatické uhlovodíky, TCDD - 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin

1.3 Kancerogeneze

Civilizační choroby, mezi které patří i rakovina, jsou závažným problémem vyspělých zemí světa. Onkologická onemocnění jsou spjata s životním prostředím, životním stylem, ale i genetickou výbavou jedince. Rakovina je druhou nejčastější příčinou úmrtnosti v České republice [36].

Kancerogeneze je několikastupňový proces, při kterém dochází ke hromadění poruch určitých genů, které vedou k porušení správné funkce jimi kódovaných proteinů. Jako nádor je označována abnormální tkáň, která se neregulovaně dělí. Rakovina má obvykle dlouhou latentní dobu, která může trvat až desítky let.

Na vznik nádorů mají vliv vnější i vnitřní faktory. Mezi vnitřní faktory řadíme věk, dědičnou dispozici, stav hormonálního a imunitního systému. K vnějším faktorům patří rentgenové, UV, kosmické a radioaktivní záření, některé druhy jemných pevných

částic (např. azbestu a sloučenin beryllia) a chemické kancerogeny. Za rakovinu mohou být zodpovědné i některé viry a mikroorganismy, jako například *Helicobacter pylori* způsobující rakovinu žaludku [23, 37].

Kancerogeneze sestává ze tří fází:

- 1. fáze: INICIACE – rychlý a irreverzibilní proces vedoucí k mutaci. Sám obvykle nestačí k vyvolání nádoru.
- 2. fáze: PROMOCE – buňka je vystavena působení další látky – tzv. promotoru, dochází k proliferaci buněk s narušenou diferenciací a buněčnou komunikací. Dochází ke vzniku benigního nádoru.
- 3. fáze: PROGRESE – podobná iniciační fázi. Dochází k nekontrolovatelnému růstu buněk, vzniku maligního nádoru, který infiltruje také do sousedních tkání a ničí je [23].

Většina chemických kancerogenů není ve své původní formě aktivní. Exogenní kancerogeny jsou přeměňovány ve tkáních pomocí oxidačních enzymů na reaktivní elektrofilní formy schopné reagovat s nukleofilními skupinami nukleových kyselin a tvořit tak kovalentní adukty.

1.3.1 Chemické kancerogeny

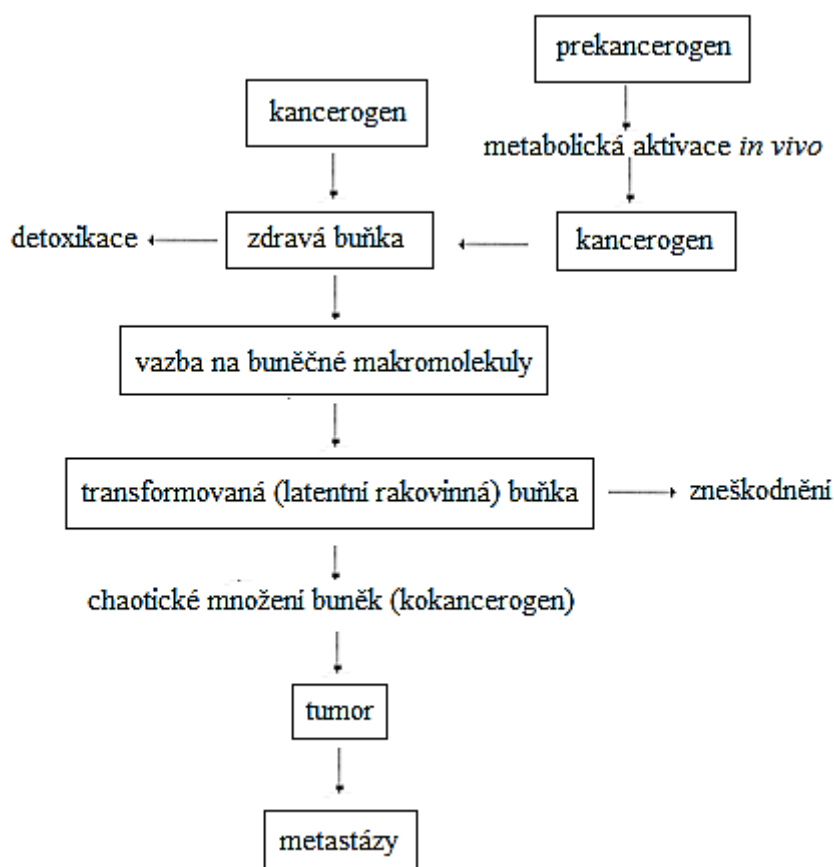
Mezi chemické kancerogeny řadíme látky organické i anorganické, průmyslové produkty, potravinové přísady, pesticidy, ale i některá léčiva a kosmetické přípravky. Kancerogeny mohou být i produkty některých plísní, bakterií a rostlin. Nebezpečné jsou zejména aflatoxiny, které produkují *Aspergillus flavus*, například ve zkažených ořechách a mandlích.

O kancerogenitě chemických látek rozhoduje především jejich chemická struktura.

V lidském organismu existují i pochody, které kancerogen mohou deaktivovat, zneškodnit nebo vyloučit [38]. (*Obr. 1.3*)

Chemické kancerogeny můžeme na základě jejich působení dělit do tří skupin:

- 1) přímo působící – mohou reagovat s druhou molekulou přímo (bez předchozí metabolické aktivace)
- 2) nepřímo působící (prekancerogeny/prokarcinogeny) – málo reaktivní, musí být aktivovány *in vivo*
- 3) anorganické – působí převážně dlouhodobým drážděním sliznic. Patří sem hlavně aerosoly (kapénky, prach)



Obr. 1.3: Schéma reakcí a mechanismů při vzniku rakoviny v organismu (převzato a upraveno z [38])

1.4 Chemoprevence rakoviny

Chemoprevence znamená použití přirozených látek nebo farmaceutických přípravků k inhibici kancerogenního procesu.

Organismus je schopen vlastními obrannými mechanismy kancerogenní proces zastavit a eliminovat patologický buněčný klon. Nejúčinnější chemoprevencí by byla blokáde vzniku mutací, což je prakticky nemožné, jelikož časový prostor od iniciace nádorového procesu ke klinicky zjevnému nádoru je relativně dlouhý. Z tohoto důvodu se využívá jiných metod chemoprevence. Patří sem indukce diferenciací, indukce apoptózy, inhibice angiogeneze, inhibice proliferace, inhibice aktivace kancerogenů nebo stimulace jejich detoxikace.

Chemopreventivní účinnost byla již studována u velkého počtu látek, ale pouze u některých se podařilo získat doklady o jejich klinické účinnosti. Mezi tyto látky patří retinoidy, antiestrogeny, deltanoidy (deriváty vitamínu D3) či nesteroidní antirevmatika [39].

1.4.1 Flavonoidní látky

Flavonoidy jsou fenolické sloučeniny reprezentující jednu z nejrozšířenějších tříd látek, které se vyskytují v zelenině, ořechách, ovoci, čaji, kávě, červeném víně a některých bylinách [40, 41].

Flavonoidy se v přírodě vyskytují hlavně v podobě glykosidů. Dle struktury klasifikujeme flavonoidní látky do osmi skupin: flavany, flavanony, flavonoly, isoflavony, katechiny, anthokyaniny, chalkony a dihydroxyflavonoly.

Sloučeniny s flavonoidní strukturou patří mezi rostlinné vůně a pigmenty, hrají důležitou roli ve vývoji a růstu rostlin, ale i obraně proti mikroorganismům a škůdcům. Mají antioxidační aktivitu, tudíž brání oxidativnímu stresu.

Flavonoidy napomáhají snížení výskytu jaterních a srdečních onemocnění, ale i některých typů rakoviny. Kromě antioxidačního efektu a vylučování reaktivních meziproductů, jsou některé z nich schopny chelatovat dvojmocné kationty kovů (Cu, Fe).

Dosud byla zjištěna široká škála fyziologických a biologických účinků těchto látek (antibakteriální, antioxidační, antialergenní, antimutagenní, antikancerogenní, antivirové a protizánětlivé účinky) [42]. Bohužel ne všechny flavonoidní látky jsou organismu prospěšné. Některé z nich mají prooxidační a mutagenní efekt a mohou zasahovat do metabolismu endogenních sloučenin.

Protinádorová aktivita flavonoidních sloučenin je umožněna například navázáním na estrogenní receptor, čímž dojde ke zpomalení buněčné proliferace nebo inhibici enzymů (například topoisomeras I a II) [43, 44]. Do procesu kancerogeneze tedy mohou vstupovat různými způsoby. Velmi důležitou vlastností některých flavonoidů je jejich schopnost inhibovat metabolickou aktivaci prekancerogenů pomocí enzymů I. fáze (většinou cytochromů P450) nebo následnou interakci s DNA. Potravní flavonoidy (například quercetin) stimuluji detoxikaci kancerogenů pomocí enzymů II. fáze, což vede k jejich vyloučení.

Některé flavonoidy jsou schopny modulovat systém cytochromů P450. Zda půjde o stimulaci či inhibici aktivity závisí na struktuře těchto flavonoidních látek.

1.4.1.1 Modulace aktivity CYP flavonoidními sloučeninami

Některé syntetické a přirozeně se vyskytující flavonoidy jsou účinnými inhibitory cytochromů P450 účastnících se metabolismu xenobiotik: CYP1A1, 1A2, 1B1, 3A4 a steroidogenního CYP19. Inhibice genové exprese enzymů rodiny CYP1 blokadí AhR receptoru je důležitá z hlediska chemopreventivních vlastností flavonoidních látek. Například quercetin (jeden z nejhorněji volně se vyskytujících flavonoidů) se váže jako antagonist na AhR receptor, a tím inhibuje benzo[*a*]pyrenem (B[*a*]P) indukovanou transkripci genu CYP1A1 do mRNA a následnou proteinovou expresi, což nakonec vede k tvorbě B[*a*]P-DNA aduktů [46].

Flavonoidy jsou ale častěji agonisty AhR receptoru – indukují expresi CYP1A1 a CYP1A2 (například syntetický β -naftoflavon). Indukce aktivity CYP probíhá různými mechanismy. Může se jednat o přímou stimulaci genové exprese přes specifický receptor a/nebo CYP protein či o stabilizaci mRNA [47, 48]. Určité flavonoidy, stejně jako některá další xenobiotika, například 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD),

indukují cytochromy P450 vazbou na AhR receptor. Tento proces je spojen s nárůstem aktivity cytochromů rodiny CYP1, které jsou zodpovědné za aktivaci prekancerogenů. Afinitu vazby xenobiotik na AhR receptor určuje jejich struktura – pro vazbu jsou upřednostňované planární aromatické sloučeniny s několika skupinami substituentů, což vysvětluje, proč velké množství flavonoidních sloučenin je ligandem tohoto receptoru [49]. Vliv flavonoidních sloučenin na aktivitu CYP nezávisí pouze na jejich struktuře, ale i na jejich koncentraci v organismu. Při nižších koncentracích může být flavonoidní sloučenina antagonistou AhR receptoru a zároveň při vyšších koncentracích může být stejná látka agonistou AhR modulující genovou expresi [37].

V současné době jsou popsány i případy stimulace cytochromů P450 (zejména CYP3A4) flavonoidními sloučeninami. Bylo zjištěno, že aktivitu cytochromů P450 mohou stimulovat flavonoidní sloučeniny neobsahující hydroxylovou skupinu. Například nesubstituovaný 7,8-benzoflavon je sloučenina stimulující specifickou CYP3A4 aktivitu, zatímco quercetin stimuluje aktivitu CYP1A2 [50, 51, 52].

2 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je určit vliv p.o. podávaných flavonoidních sloučenin: β -naftoflavonu, dihydromyricetinu, myricetinu a léčiva Antistax® na indukci a aktivitu CYP1A1 v tenkém střevě a CYP1A1 a CYP1A2 v játrech experimentálních potkanů.

K dosažení tohoto cíle je zapotřebí splnit následující dílčí úkoly:

- aplikovat potkanům studované flavonoidní sloučeniny gaváží do žaludku
- provést izolaci mikrosomální frakce jater a střev exponovaných zvířat
- stanovit koncentraci proteinů a CYP v mikrosomální frakci
- metodou Western blot analyzovat indukci CYP1A1 a CYP1A2
- stanovit aktivitu CYP1A1 a CYP1A2 pomocí specifických substrátů

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použité přístroje

Aparatura pro „Western blotting“:

Whatman Biometra Fastblot B43 (Německo)

Automatické pipety:

Nichiryo (Japonsko), BioHit (Finsko)

Centrifugy:

Beckman Coulter - Optima™ LE-80K ultracentrifuga (USA, úhlový rotor Ti 45 a Ti 70), Janetzki K23 (Německo), Janetzki K24 (Německo), stolní minicentrifuga Labnet (USA), Eppendorf - Centrifuge 5418 (Německo, úhlový rotor)

Elektroforetická aparatura:

Amersham Biosciences - Hoefer™ miniVE (USA)

Homogenizátory:

skleněné homogenizátory dle Pottera a Elvehjema, různé obsahy

Injekční mikrostříkačka:

Microliter Syringe 702RN - Hamilton (Švýcarsko)

Inkubátor:

IR 1500 Automatic CO₂ Incubator - Flow Laboratories (USA)

Laboratorní míchačka:

Vortex 3 - IKA-Werke GmbH & Co. (Německo)

Laboratorní váhy:

40SM-200 - PESA (Švýcarsko), 440-35N – KERN (Německo), EW 600-2M – KERN (Německo), EK600H - A&D Instruments LTD (Velká Británie)

Luminiscenční spektrofotometr:

LS55 - PerkinElmer (USA)

Magnetická míchačka s ohřevem:

Monotherm - Variomag (Německo)

pH metr:

ATI Orion 370 (USA)

Výrobek ultračisté vody:

Simplicity 185 - Millipore Corp. (USA)

Sonikátor:

Elmasonic E 30H - ELMA (Německo)

Zdroj pro elektroforézu:

EPS 301 Electrophoresis Power Supply - Amersham Pharmacia Biotech (USA)

3.2 Použité chemikálie a materiál

API Chem (Čína):

Dihydromyricetin

BD Gentest™ (USA):

standardy cytochromů s exprimovanou NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou: Rat CYP1A1 + OR, Rat CYP1A2 + OR

Boehringer Ingelheim (Německo):

Antistax – potahované tablety (360 mg účinné látky)

Fluka (Švýcarsko):

akrylamid, α -tokoferol, dodecylsulfát sodný (SDS), 2-merkapt ethanol, methanol, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)

Friesland ČR, a.s. (Česká republika):

Milli – sušené mléko, odtučněné

Lachema Brno (Česká republika):

bromfenolová modř, dekahydrát uhličitanu sodného, dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, dihydrogenfosforečnan draselný, dithioničitan sodný, ethanol, glycerol, hydrogenuhličitan sodný, hydroxid sodný, chlorid draselný, kyselina chlorovodíková, pentahydrát síranu měďnatého, persíran amonný, vinan sodný

Linde (Česká republika):

kapalný dusík, oxid uhelnatý, suchý led

Millipore Corp. (USA):

Immobilon™ – NC transferová membrána (nitrocelulosová),

Immobilon™ – P transferová membrána (PVDF)

Reanal Budapešť (Maďarsko):

glycin

Sevapharma, a.s. (Česká republika):

hovězí sérový albumin (BSA)

Serva (Německo):

Coomassie brilliant blue R-250 (CBB), N,N,N',N'- tetramethyldiamin (TEMED),
Triton X-100

Setuza a.s. (Česká republika):

Vegetol – slunečnicový olej

Sigma (USA):

5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT), 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), 7-ethoxyresorufin, 7-methoxyresorufin, β -naftoflavin, myricetin, redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH), resorufin, sekundární králičí protilátka proti IgY konjugovaná alkalickou fosfatase

Thermo Scientific (USA):

Standard molekulových hmotností pro PAGE: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (10-260 kDa)

Whatman (USA):

chromatografické papíry, č. 3

Protilátky proti CYP1A1/1A2 a CYP1A2 byly připraveny a poskytnuty prof. RNDr. Petrem Hodkem, CSc., Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika.

3.3 Metody

3.3.1 Premedikace potkanů

Samci laboratorních potkanů (váha ~ 200 g, kmen Wistar) byli chováni v Centru pro experimentální biomodely v Praze při 22 °C v klecích, kde měli neomezený přístup ke granulované stravě a vodě a při 12 hodinovém denním režimu. Premedikace byla zahájena po týdenní aklimatizaci. Poslední den před usmrcením byla zvířatům odebrána strava. Pro experimenty byli potkani rozděleni do skupin, kterým bylo podáváno 0,5 ml roztoků studovaných sloučenin ve slunečnicovém oleji nebo ve vodě tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 60 mg na 1 kg potkana. Kontrolní skupině byl podáván slunečnicový olej. Dávkování bylo uskutečněno pomocí žaludeční sondy (gaváží). Potkani byli usmrceni v atmosféře oxidu uhličitého.

Typ expozice:

Kontrolní skupina: podáváno 0,5 ml slunečnicového oleje po dobu 4 dní. Po 24 hodinách od poslední dávky byli potkani usmrceni.

Myricetin: po dobu 4 dní bylo podáváno 0,5 ml roztoku myricetinu ve slunečnicovém oleji. Po 24 hodinách od poslední dávky byli potkani usmrceni.

Dihydromyricetin: po dobu 4 dní bylo podáváno 0,5 ml roztoku dihydromyricetinu ve slunečnicovém oleji. Po 24 hodinách od poslední dávky byli potkani usmrceni.

Antistax: tablety přípravku Antistax obsahujícího anthokyaniny byly rozdrceny v třecí misce tloučkem, dále následovala extrakce vodou. Získaný vodný extrakt byl podáván potkanům po dobu 4 dní v dávkách o objemu 0,5 ml a výsledné koncentraci 60 mg na 1 kg potkana. Den po podání poslední dávky byli potkani usmrceni.

β-naftoflavin: podáno jednorázově 0,5 ml roztoku β-naftoflavonu rozpuštěného ve slunečnicovém oleji. Po 96 hodinách následovalo usmrcení.

3.3.2 Izolace mikrosomální frakce

Mikrosomální frakce z jater a tenkých střev potkanů byly získány metodou diferenční centrifugace [53].

Proces izolace probíhal při 4 °C, přičemž všechny pufrů a nástroje byly na tuto teplotu vychlazeny. Tenká střeva (rozdělena na tři části - proximální, střední a distální) a játra byla promyta a následně zmrazena a uchována při -80 °C.

Střeva i játra byla nejprve zvážena, poté rozstříhána a několikrát promyta v pufru P1 (0,15 M KCl; 0,05 M TRIS/HCl; 50 μM tokoferol; pH bylo upraveno pomocí 1M HCl na hodnotu 7,4), aby došlo k odkrvení. Následovala homogenizace v homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema s pufrům P1 o objemu odpovídajícím čtyřnásobku hmotnosti střevní tkáně.

Homogenáty byly centrifugovány po dobu 10 minut při 2000 RPM a 4 °C (centrifuga K-23, Janetzki, výkyvný rotor 4 x 70 ml). Supernatant byl odlit do kádinky a uchován v chladu. Sediment byl rehomogenizován v Potter-Elvehjemově homogenizátoru s roztokem P1 o objemu odpovídajícím čtvrtině váhy tkáně. Následná centrifugace probíhala za stejných podmínek jako centrifugace předchozí.

Supernatant byl slit do kádinky k supernatantu z předešlé centrifugace a následně byl odstředěn 20 minut při 12 500 RPM a 4 °C (centrifuga K-24, Janetzki) v úhlovém rotoru 6 x 35 ml. Supernatant byl oddělen a ultracentrifugován 75 minut při 35 000 RPM a 4 °C (ultracentrifuga Beckman, úhlový rotor Ti45, 6 x 70 ml). Tento supernatant byl uchován, jelikož se jednalo o cytosolární frakci. Peleta sedimentu byla homogenizována v Potter-Elvehjemově homogenizátoru spolu s pufrům P2 (0,1 M Na₄P₂O₇·10H₂O; pH roztoku bylo upraveno pomocí 1M HCl na hodnotu 7,2), jehož objem odpovídal dvojnásobnému množství hmotnosti tkáně.

Suspence byla ultracentrifugována 75 minut při 60 000 RPM a 4 °C (ultracentrifuga Beckman, úhlový rotor Ti70, 8 x 36 ml). Supernatant byl slit, peleta sedimentu byla homogenizována v pufru P3 (0,15 M KCl; 0,05 M TRIS; 20% glycerol; pH roztoku bylo upraveno titrací 1M HCl na hodnotu 7,4), jehož objem byl roven pětině hmotnosti střevní tkáně. Připravené suspence mikrosomů byly přeneseny po cca 100 μl do mikrozkuumavek dle Eppendorfa a ihned zamrazeny pomocí kapalného dusíku a skladovány při -80 °C.

3.3.3 Stanovení proteinů

Koncentrace proteinů v mikrosomální frakci byla stanovena metodou podle Wiechelmana a kol. [54]. Metoda je založena na schopnosti proteinů redukovat Cu^{2+} na Cu^+ . Mědné ionty jsou následně chelatovány kyselinou bicinchoninovou (BCA) v alkalickém prostředí za vzniku fialového komplexu. Tento komplex je poté stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm. Zabarvení je stabilní po dobu minimálně 45 minut a jeho intenzita je přímo úměrná koncentraci proteinů.

Činidlo A: 2% (w/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1% (w/v) sodná sůl BCA; 0,95% (w/v) NaHCO_3 ; 0,16% (w/v) vínan sodný; 0,4% (w/v) NaOH

Činidlo B: 4% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Činidlo pro stanovení proteinů bylo připraveno smísením činidel A a B v poměru 50:1.

Roztoky mikrosomů, slepého vzorku a standardu byly připraveny do 96-ti jamkové mikrotitrační destičky tak, že bylo odměřeno 9 μl vzorku a smíšeno s 260 μl připraveného činidla. Jako standard sloužil roztok BSA o koncentracích: 0,125; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0 mg/ml. Do jamek příslušících slepým vzorkům bylo pipetováno 9 μl deionizované vody místo roztoku proteinů. Následovala inkubace po dobu 30 minut při 37 °C (IR 1500 Automatic CO_2 incubator). Absorbance vzorků a standardů byly měřeny při vlnové délce 562 nm pomocí čtečky mikrotitračních destiček (Sunrise Absorbance Reader). Data byla vyhodnocena v programu Kim32 [55].

Ze získaných absorbancí standardu byla sestrojena kalibrační přímka, s pomocí jejíž rovnice byla stanovena koncentrace proteinů ve vzorku mikrosomů.

3.3.4 Diskontinuální elektroforéza SDS-PAGE

SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE) slouží k dělení proteinů na základě molekulové hmotnosti [56].

Dodecylsírán sodný (SDS) uděluje všem proteinovým makromolekulám záporný náboj, tudíž se v elektrickém poli proteiny separují na základě své molekulové hmotnosti.

Mezi čistá, odmaštěná a do elektroforetické aparatury uchycená skla byl nanesen roztok pro přípravu 8% separačního gelu o složení: 5,5 ml pufru A (0,375 M TRIS/HCl; 0,1% SDS; pH 8,8); 2 ml polymeračního roztoku A (30% akrylamid; 0,8% BIS; pH 8,8); 75 μ l persíranu amonného (100 mg/ml) a 7,5 μ l TEMEDu. Roztok byl ihned po nalití převrstven destilovanou vodou. Po 30 minutách polymerace byla voda odlita, gel byl opatrně osušen filtračním papírem a převrstven roztokem pro přípravu 3% zaostřovacího gelu o složení: 2,7 ml pufru B (0,125 M TRIS/HCl; 0,1% SDS; pH 6,8); 300 μ l polymeračního roztoku B (30% akrylamid; 0,8% BIS; pH 6,8); 3 μ l TEMED; 60 μ l persíranu amonného (100 mg/ml). Do zaostřovacího gelu byl zasunut hřeben pro vytvoření jamek k aplikaci vzorků. Po 20 minutách polymerace byl hřeben vyjmut a elektrodový prostor byl vyplněn elektrodovým pufrem o složení: 0,025 M TRIS/HCl; 0,195 M glycin; 0,1% SDS, pH 8,3.

Vzorky byly naředěny na koncentraci 2 mg/ μ l smísením se vzorkovým pufrem (0,25 M TRIS /HCl; 8% SDS; 40% glycerol; 20% 2-merkptoethanol; 0,003% bromfenolová modř; pH 6,8) v poměru 3:1 a 5 minut povařeny ve vodní lázni. Do jamek bylo pomocí mikrostřičky aplikováno 20 μ l vzorku a 6 – 8 μ l standardu molekulových hmotností (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder).

Po aplikaci vzorků byla elektroforetická aparatura umístěna do elektroforetické vany, která byla vyplněna elektrodovým pufrem. Na aparaturu bylo umístěno víko a byla připojena ke zdroji. Elektroforéza ve vertikálním uspořádání probíhala při napětí 80 V po dobu prvních 30 minut, poté bylo napětí zvýšeno na 150 V. Aparatura byla odpojena od zdroje, když čelo bromfenolové modři dosáhlo přibližně 0,5 cm od spodního okraje separačního gelu (cca po dalších 90 minutách).

Detekce proteinů byla provedena přenesením na nitrocelulosovou či PVDF membránu a následnou imunodetekcí.

3.3.5 Metoda Western blot

Použité roztoky:

Přenosový pufr: 0,192 M glycin; 0,0235 M TRIS-HCl; pH 8,3

PBS Triton X-100: 0,134 M NaCl; 2,7 mM KCl; 1,8 mM Na₂HPO₄·10H₂O;
1 mM NaH₂PO₄; 0,3% (w/v) Triton X-100; pH 7,2

Blokovací roztok: 5% (w/v) odtučněné mléko v PBS Tritonu X-100

Western blotting je metoda používaná k určení relativního množství proteinů v různých vzorcích. Po elektroforéze jsou oddělené mikrosomální proteiny přeneseny na membránu, na které jsou označeny pomocí specifických protilátek a následně vizualizovány [Towbin et al., 1979].

Po ukončení elektroforézy byl gel inkubován s přenosovým puffrem po dobu 30 minut. Nitroceluloseová membrána byla nastříhána na velikost odpovídající velikosti gelu, smočena v destilované vodě a následně přenesena do přenosového pufru.

Filtrační papíry Whatman 3 (rovněž nastříhané na velikost odpovídající velikosti membrány) byly ponořeny do přenosového pufru a 3 z nich byly položeny na anodu blotovacího přístroje, na ně byla položena nitroceluloseová membrána, gel a další tři filtrační papíry Whatman. Vzduchové bubliny byly odstraněny pomocí skleněné tyčinky, poté byla přiložena katoda blotovacího přístroje. Proudová hustota byla 3,5 mA/cm² gelu a proveden elektropřenos po dobu 50 minut.

Aby se předešlo nespecifickým reakcím, byla membrána po dokončení přenosu vložena do 5% odtučněného mléka (blokovací roztok), kde byla přes noc ponechána při 4 °C za stálého míchání.

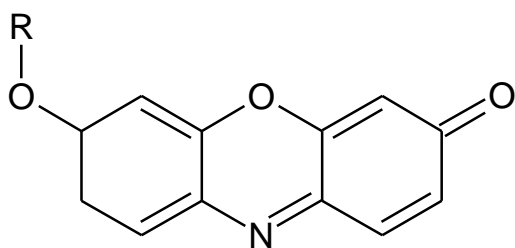
Druhý den byla membrána vložena do roztoku primární slepičí protilátky proti CYP1A1/1A2 nebo proti CYP 1A2 o koncentraci 30 µg/ml, kde byla za stálého třepání inkubována po dobu 2 hodin. Po inkubaci byly membrány třikrát promyty blokovacím roztokem vždy po 5 minutách. Následovala aplikace sekundární králičí IgG protilátky proti IgY konjugované s alkalickou fosfatázou, která byla naředěna blokovacím

roztokem v poměru 1:1 430, a inkubace po dobu jedné hodiny. Dále byla membrána promyta 3 x 5 minut v 5% roztoku odtučněného mléka, PBS Triton X-100 pufru a destilované vodě.

Specificky označené proteiny na membráně byly vyvolány pomocí tablety BCIP/NBT, která byla rozpuštěna v 10 ml vody. Po zvýraznění proteinových zón byla reakce zastavena přenesením membrány do destilované vody, následně byla membrána osušena filtračním papírem.

3.3.6 Stanovení enzymové aktivity 7-ethoxyresorufin-O-deethylasy (EROD) a 7-methoxyresorufin-O-demethylasy (MROD)

Hlavními enzymy, které katalyzují O-deethylaci (demethylaci) 7-ethoxyresorufinu (7-methoxyresorufinu) na resorufin, jsou CYP1A1 a CYP1A2. Resorufin vykazuje fluorescenci, která byla měřena na luminiscenčním spektrometru Perkin Elmer LX-55, kdy jeho emisní vlnová délka byla nastavena 585 nm a excitační vlnová délka 530 nm. Měření bylo provedeno podle metody dle Burka a Mayera (1974) [57].



R	Sloučenina
H	resorufin
CH ₃	7-methoxyresorufin
C ₂ H ₅	7-ethoxyresorufin

Obr 3.4: Struktura resorufinu, 7-methoxyresorufinu a 7-ethoxyresorufinu

Použité roztoky:

Substrát: 0,2 mM 7-methoxyresorufin (7-ethoxyresorufin) v DMSO

Kofaktor: 5 mM NADPH v destilované vodě

Roztok resorufinu: 10 μ M resorufin v methanolu

Ředící pufr: 0,1 M KH_2PO_4 (pH upraveno pomocí 1M KOH na hodnotu 7,4)

Nejprve byly připraveny roztoky standardů o koncentracích: 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 a 0,4 μ M pro sestavení kalibrační křivky. Kontrolní vzorek obsahoval pouze ředící pufr. Všechny roztoky byly promíchány na Vortexu.

Mikrosomální vzorky byly naředěny pufrem na koncentraci 0,5 mg/ml. Specifický substrát byl přidán k roztokům vzorků tak, aby jeho konečná koncentrace byla 2,2 μ M. Připravené roztoky byly preinkubovány po dobu 3 minut za laboratorní teploty, poté bylo z roztoků 150 μ l přeneseno do jamek mikrotitrační destičky. Reakce byla iniciována přidáním 17 μ l NADPH.

Fluorescence byla měřena bez prodlevy v deseti cyklech s intervalem 60 sekund. Aktivity enzymů byly stanoveny srovnáním se standardy resorufinu a následným vztažením na obsah mikrosomálních proteinů v použitém vzorku.

4 VÝSLEDKY

4.1 Izolace mikrosomální frakce a stanovení proteinů

Frakce mikrosomů (MS) byly izolovány z tenkých střev a jater potkanů kmene Wistar, kterým byly podány flavonoidní látky: β -naftoflavon, myricetin, dihydromyricetin nebo léčivo Antistax®. Proteiny byly stanoveny pomocí metody Wiechelmana a kol. (viz kapitola 3.3.3). Výsledky jsou uvedeny v *tabulkách 4.1 a 4.2*.

Tab. 4.1: Hmotnost tkáně a koncentrace proteinů v intestinálních mikrosomálních frakcích kontrolní skupiny a skupin po premedikaci β -naftoflavonem, myricetinem, dihydromyricetinem a léčivem Antistax®

Vzorek	hmotnost tkáně [g]	koncentrace proteinů [mg/ml]	obsah mikrosomálních proteinů [mg]
Kontrola P	2,5	8,3	6,6
Kontrola S	2,5	7,8	5,5
Kontrola D	3,2	10,7	5,4
BNF P	2,9	9,4	5,6
BNF S	4,8	12,4	11,2
BNF D	3,0	7,3	5,1
Antistax P	2,7	8,8	3,5
Antistax S	2,6	8,2	4,1
Antistax D	3,1	10,5	5,3
Myricetin P	3,4	7,3	4,7
Myricetin S	4,0	8,2	6,6
Myricetin D	4,2	10,2	7,1
Dihydromyricetin P	4,9	11,5	8,6
Dihydromyricetin S	5,0	10,1	7,6
Dihydromyricetin D	3,9	13,5	8,8

P – proximální část tenkého střeva, S – střední část tenkého střeva, D – distální část tenkého střeva, BNF – β -naftoflavon

Tab. 4.2: Hmotnost tkáně a koncentrace proteinů v jaterních mikrosomálních frakcích kontrolní skupiny a skupin po premedikaci β -naftoflavonem, myricetinem, dihydromyricetinem a léčivem Antistax®

vzorek	hmotnost tkáně [g]	koncentrace proteinů [mg/ml]	obsah mikrosomálních proteinů [mg]
Kontola	19,9	41,3	107,4
BNF	18,1	56,4	332,8
Antistax	20,5	57,5	172,5
Myricetin	19,1	40,5	186,3
Dihydromyricetin	25,7	38,2	191,0

4.2 Vliv flavonoidních látek na expresi proteinů CYP1A1 a CYP1A2

Expres CYP1A1 a CYP1A2 byla sledována pomocí metody Western blot (viz kapitola 3.3.5). Jako primární protilátky byly použity slepičí anti-CYP1A1/1A2 a anti-CYP1A2. Sekundární protilátky obsahovaly navázanou alkalickou fosfatasu, k vizualizaci byl tedy použit substrát alkalické fosfatasy.

Obrázky 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 a 4.5 znázorňují výsledky získané sledováním vlivu vybraných flavonoidních látek na indukci CYP1A. Z obrázků membrán (*Obr. 4.2, 4.3 a 4.4*) je patrné, že Antistax®, myricetin a dihydromyricetin neindukují CYP1A v tenkém střevě potkanů na rozdíl od aplikace β -naftoflavonu.



Obr. 4.1: Vliv β -naftoflavonu na expresi CYP1A1 ve střevech a játrech potkaních samců. Membrána byla vyvolána primární slepičí protilátkou anti-CYP1A1/1A2.

1: kontrola – proximální část tenkého střeva, 2: kontrola – střední část tenkého střeva, 3: kontrola – distální část tenkého střeva, 4: standard CYP1A1, 5: β -naftoflavon – proximální část tenkého střeva, 6: β -naftoflavon – střední část tenkého střeva, 7: β -naftoflavon – distální část tenkého střeva, 8: β -naftoflavon – játra



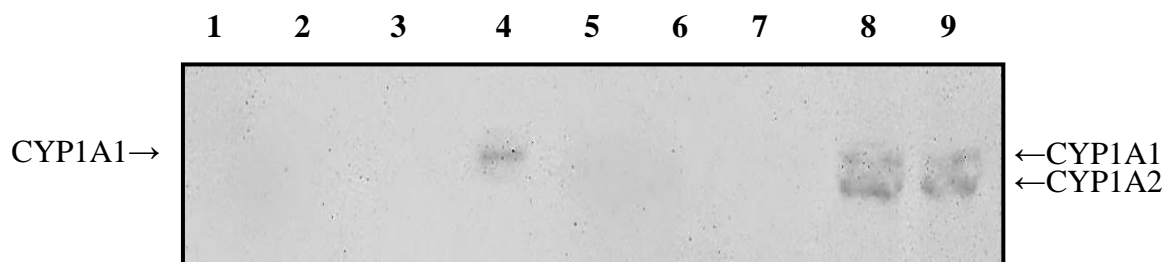
Obr. 4.2: Vliv léčiva Antistax® na expresi CYP1A1 ve střevech a játrech potkaních samců. Membrána byla vyvolána primární slepičí protilátkou anti-CYP1A1/1A2.

1: standard CYP1A1, 2: Antistax – proximální část tenkého střeva, 3: Antistax – střední část tenkého střeva, 4: Antistax – distální část tenkého střeva, 5: Antistax – játra



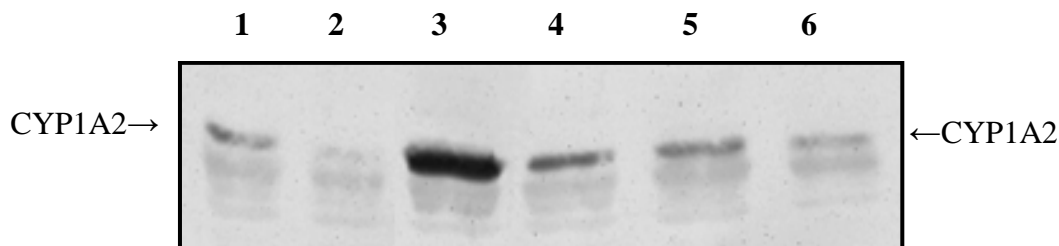
Obr. 4.3: Vliv myricetinu na expresi CYP1A1 ve střevech a játrech potkaních samců. Membrána byla vyvolána primární slepičí protilátkou anti-CYP1A1/1A2.

1: myricetin – játra, 2: myricetin – proximální část tenkého střeva, 3: střední část tenkého střeva, 4: distální část tenkého střeva, 5: standard CYP1A1



Obr. 4.4: Vliv dihydromyricetinu na expresi CYP1A1 ve střevech a játrech potkaních samců. Membrána byla vyvolána primární slepičí protilátkou anti-CYP1A1/1A2.

1: kontrola – proximální část tenkého střeva, **2:** kontrola – střední část tenkého střeva, **3:** kontrola – distální část tenkého střeva, **4:** standard CYP1A1, **5:** dihydromyricetin – proximální část tenkého střeva, **6:** dihydromyricetin – střední část tenkého střeva, **7:** dihydromyricetin – distální část tenkého střeva, **8:** dihydromyricetin – játra, **9:** kontrola – játra



Obr. 4.5: Vliv β -naftoflavonu, dihydromyricetinu, myricetinu a léčiva Antistax® na expresi CYP1A2 v játrech potkaních samců. Membrána byla vyvolána slepičí protilátkou anti-CYP1A2. Jako standard CYP1A2 byl použit vzorek jaterních mikrosomů potkanů, kterým byl podán benzo[a]pyren.

1: kontrola, **2:** β -naftoflavon, **3:** benzo[a]pyren, **4:** dihydromyricetin, **5:** myricetin, **6:** Antistax®

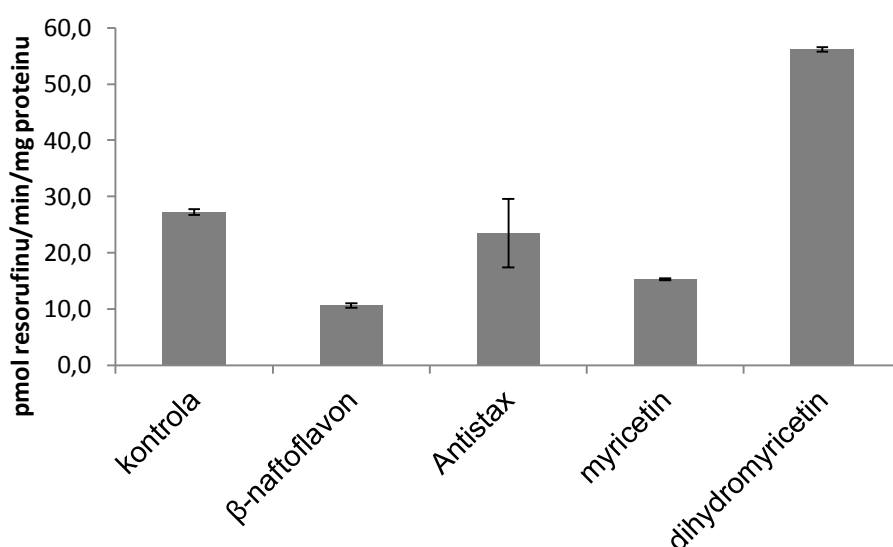
4.3 Vliv flavonoidních látek na enzymovou aktivitu cytochromů P450

V této části bakalářské práce byl sledován vliv premedikace vybranými flavonoidními látkami na aktivity cytochromů P450A. Konkrétně bylo sledováno, zda nárůst či pokles obsahu CYP1A odpovídá jejich enzymové aktivitě.

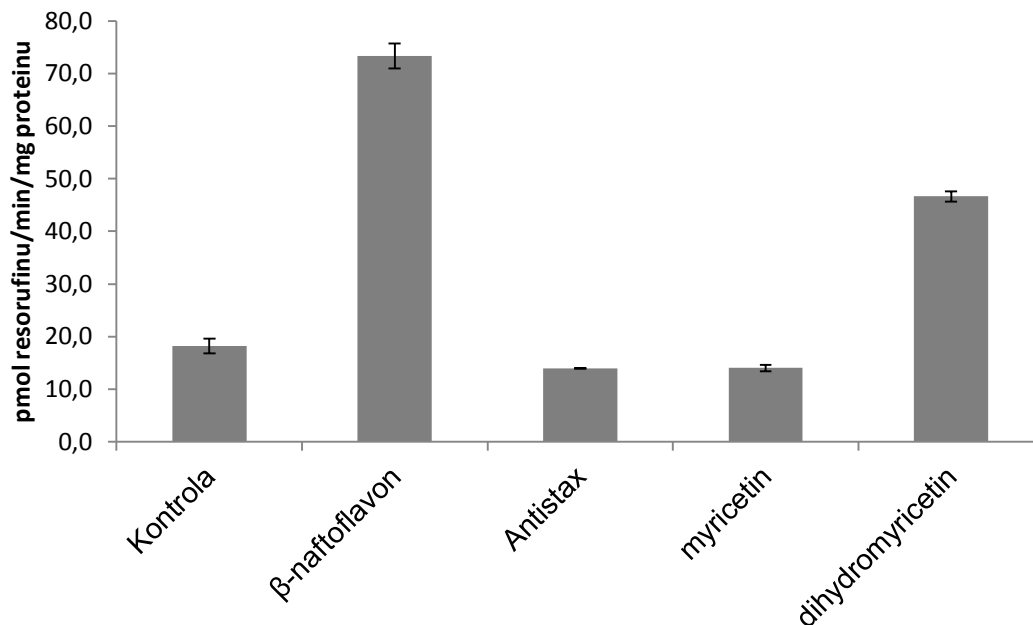
Bylo provedeno stanovení 7-methoxyresorufin-O-demethylasové aktivity (MROD), která je připisována především CYP1A2 a 7-ethoxyresorufin-O-deethylasové

aktivity (EROD), která je charakteristická především pro CYP1A1. V obou případech se jedná o dealkylaci za vzniku fluorescenčního produktu - resorufinu. Aktivita enzymů byla vypočtena s využitím rovnice kalibrační přímky standardů resorufinu.

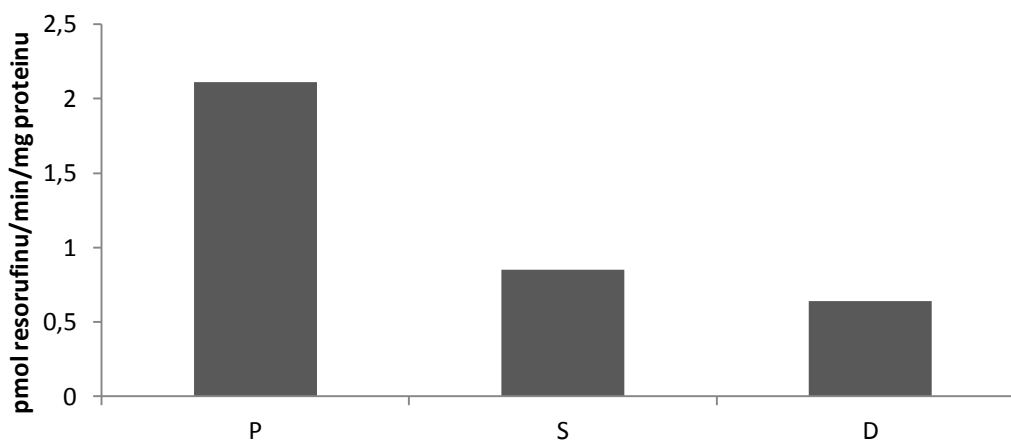
Indukční efekt zkoumaných flavonoidních sloučenin v játrech potkaních samců je znázorněn na *Obr. 4.6 a 4.7*. Indukční efekt β -naftoflavonu v tenkých střevěch potkaních samců zachycuje *Obr. 4.8*. Myricetin, dihydromyricetin a Antistax® v tenkých střevěch potkanů neindukovaly CYP1A, aktivita tedy u těchto vzorků měřena nebyla.



Obr. 4.6: Aktivita CYP1A stanovená jako MROD v játrech kontrolní skupiny potkanů a skupin potkanů po premedikaci flavonoidními látkami: β -naftoflavonem, léčivem Antistax®, myricetinem a dihydromyricetinem (vždy o koncentraci 60 mg/kg tělesné hmotnosti potkana). Hodnoty zaznamenané v grafu jsou průměrnými hodnotami dvou nezávislých měření. Směrodatné odchylky znázorňují chybové úsečky.



Obr. 4.7: Aktivita CYP1A stanovená jako EROD v játrech kontrolní skupiny potkanů a skupin po premedikaci flavonoidními látkami: β-naftoflavonem, léčivem Antistax®, myricetinem a dihydromyricetinem (vždy o koncentraci 60 mg/kg tělesné hmotnosti potkana). Hodnoty zaznamenané v grafu jsou průměrnými hodnotami dvou nezávislých měření. Směrodatné odchytky znázorňují chybové úsečky.



Obr. 4.8: Aktivita CYP1A stanovená jako EROD v tenkých střevěch potkaních samců premedikovaných β-naftoflavonem (60 mg/kg tělesné hmotnosti).

P – proximální část tenkého střeva, S – střední část tenkého střeva, D – distální část tenkého střeva

5 DISKUZE

Flavonoidy patří mezi chemopreventivní látky, které jsou obecně považovány za látky organismu prospěšné. Tyto sloučeniny však mohou ovlivňovat (stimulovat či inhibovat) aktivitu celé škály enzymů účastnících se nejrůznějších metabolických drah v organismu, a tím negativně působit například na hormonální rovnováhu nebo metabolismus léčiv. Indukcí cytochromů P450 může dojít ke stimulaci aktivace prekancerogenů, a tím zvýšení rizika vzniku rakoviny [41].

Tato práce byla zaměřena na sledování indukčního efektu vybraných flavonoidních látek: β -naftoflavonu, dihydromyricetinu, myricetinu a léčiva Antistaxu® na cytochromy P450. Modelovým organismem v této práci byli samci laboratorních potkanů kmene Wistar. Studován byl vliv flavonoidních látek na obsah a aktivitu cytochromů P450 1A1 a 1A2 v játrech a cytochromu P450 1A1 v tenkých střevech potkana. Tyto orgány byly vybrány, protože jsou hlavním místem metabolismu xenobiotik. Expres proteinů CYP1A byla stanovena imunochemicky pomocí metody Western blot a bylo zjišťováno, zda indukce jednotlivých forem CYP vede k nárůstu jejich specifické aktivity měřené za použití specifických substrátů 7-methoxyresorufinu či 7-ethoxyresorufinu.

Pro testování vlivu vybraných sloučenin bylo zvoleno podání gaváží do žaludku v celkovém počtu čtyř dávek po 24 hodinách v množství 60 mg/kg tělesné váhy potkana. Sekvenční podání gaváží do žaludku nejlépe simuluje expozici člověka, a tak může být lépe odhalen vliv chemopreventivních sloučenin na organismus. Výjimkou byl pouze β -naftoflavon, který byl podán potkanům jednorázově a po 96-ti hodinách následovalo usmrcení. V případě β -naftoflavonu, známého induktoru CYP1A1 i 1A2, bylo cílem zjistit odpověď na otázku, jak jeho efekt na organismus s časem klesá.

Ze získaných výsledků je patrné, že β -naftoflavon indukoval expresi CYP1A1 ve všech částech tenkého střeva, přičemž indukce byla silnější v proximální a střední části tenkého střeva než v části distální. Toto zjištění potvrzuje skutečnost, že rozložení CYP proteinů v gastrointestinálním traktu není rovnoměrné, většinou bývá vyšší v proximální části tenkého střeva [58]. Může však docházet i k absorpci (nebo biotransformaci) β -naftoflavonu, a tím k poklesu jeho koncentrace, což způsobí i pokles indukce CYP1A podél délky střeva. V játrech byla po premedikaci β -naftoflavonem zjištěna silná

indukce exprese CYP1A1. Nebyla však zjištěna indukce exprese izoformy CYP1A2, přestože je β -naftoflavon známým induktorem obou forem - CYP1A1 i CYP1A2. Tato skutečnost může být způsobena tím, že izoforma CYP1A2 má kratší poločas života než izoforma CYP1A1, a proto 96 hodin po premedikaci β -naftoflavonem již není CYP1A2 na membráně téměř viditelný [45]. Aktivita EROD v játrech potkanů naměřená po jednorázové premedikaci β -naftoflavonem byla výrazně vyšší v porovnání s aktivitou EROD u kontrolních vzorků. Aktivita CYP1A stanovená jako EROD u střevních vzorků potkaních samců premedikovaných β -naftoflavonem byla nejvyšší v proximální části tenkého střeva, naopak nejnižší aktivita byla naměřena v distální části tenkého střeva. Toto zjištění odpovídá indukci patrné na membráně po Western blotu. Bylo již provedeno několik studií zabývajících se podáním potravních kancerogenů potkanům premedikovaným chemopreventivní flavonoidní látkou indukující CYP. Takovou studií je například studie Hodka a kol. [59], při které byl zkoumán vliv β -naftoflavonu na genotoxicitu potravních kancerogenů - konkrétně benzo[a]pyrenu a 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridinu (PhIP). Bylo zjištěno zvýšené množství DNA aduktů v porovnání s jejich množstvím po požití samotného kancerogenu. Výsledky této studie poukazují na potencionální zvýšení rizika vzniku rakoviny po požití induktoru enzymů podrodiny CYP1A.

Premedikace léčivem Antistax® způsobila v malé míře indukci CYP1A1 v proximální části tenkého střeva. V ostatních částech tenkého střeva nebyla zjištěna indukce CYP1A1 tímto léčivem. V játrech nedošlo k indukci exprese CYP1A1 ani CYP1A2. Stanovená aktivita MROD i EROD jaterních mikrosomálních vzorků po premedikaci léčivem Antistax® byla dokonce nižší než u kontrolních vzorků. Antistax® je léčivo obsahující směs flavonoidních sloučenin, zejména quercetin. Vliv quercetinu na expresi CYP1A byl zkoumán v disertační práci Křížkové [60], přičemž byla zjištěna zvýšená exprese CYP1A1 ve střední části potkaních střev. Aktivita EROD byla v porovnání s kontrolní skupinou vyšší ve střední a distální části tenkého střeva.

Dihydromyricetin neindukoval expresi CYP1A1 v žádné z částí tenkého střeva, ale způsobil v porovnání s kontrolními vzorky slabou indukci exprese CYP1A1 i CYP1A2 v játrech. Aktivita MROD i EROD po premedikaci dihydromyricetinem byla naměřena přibližně dvakrát vyšší než aktivita stanovená u kontrolních vzorků. Dihydromyricetin je flavonoidní sloučenina vyskytující se v jedlých částech asijského

stromu *Hovenia dulcis*, která zabraňuje intoxikaci alkoholem tím, že se váže na GABA receptory. Tato vlastnost dihydromyricetinu byla zveřejněna Liang a kol. [61].

Pro porovnání byl studován i vliv myricetinu. V případě myricetinu také nebyla zjištěna indukce exprese CYP1A1 v žádné z částí tenkého střeva, ale byla zjištěna slabá indukce exprese CYP1A2 v játrech. Exprese CYP1A1 v játrech myricetinem v porovnání s kontrolou indukována nebyla. Stanovená aktivita MROD i EROD jaterních mikrosomálních vzorků po premedikaci myricetinem byla nižší než u kontrolních vzorků. Roku 2006 Chaudhary a Willett uskutečnili studii prokazující inhibiční vliv myricetinu na EROD aktivitu v buňkách rakoviny prostaty [62]. V našem případě mohl být myricetin stále přítomen v membránách mikrosomů, a tím působit inhibičně.

Skutečnost, že premedikace myricetinem a Antistaxem® snížila EROD i MROD aktivitu CYP1A1 a 1A2 v játrech v porovnání s kontrolními vzorky a zároveň nedošlo k indukci CYP1A, je pozitivním zjištěním. Opačný výsledek by mohl znamenat zvýšené riziko aktivace kancerogenů cytochromy P450 podrodiny 1A se všemi negativními důsledky. Myricetin a Antistax® lze tedy z hlediska studovaných vlivů na CYP1A1/1A2 považovat za sloučeniny bezpečné pro organismus a potenciálně využitelné z hlediska prevence rakoviny.

6 ZÁVĚR

Vytčený cíl práce se podařilo splnit a dosáhnout následujících výsledků:

- Z jater a střev samců laboratorních potkanů kmene Wistar premedikovaných vybranými flavonoidními sloučeninami gaváží do žaludku byly připraveny mikrosomální frakce.
- β -Naftoflavon indukoval expresi CYP1A1 ve všech částech tenkého střeva. Indukce CYP1A2 v jaterní mikrosomální frakci 96 hodin po premedikaci β -naftoflavonem nebyla zaznamenána. Aktivita EROD v jaterní mikrosomální frakci po premedikaci β -naftoflavonem v porovnání s kontrolou byla čtyřikrát vyšší. Aktivita CYP1A stanovená jako EROD v tenkých střevech potkanů byla nejvyšší v proximální části a klesala směrem k distální části.
- Antistax® způsobil slabou indukci CYP1A1 v proximální části tenkého střeva, neindukoval ale expresi CYP1A v játrech. Aktivity MROD a EROD v porovnání s aktivitami kontrolní skupiny byly dokonce nižší.
- Myricetin neindukoval expresi CYP1A1 v žádné z částí tenkého střeva ani nezvýšil aktivitu MROD a EROD v játrech potkanů.
- Dihydromyricetin neindukoval expresi CYP1A1 v žádné z částí tenkého střeva, způsobil ale slabou indukci exprese CYP1A1 a CYP1A2 v játrech. Aktivita MROD v játrech po premedikaci dihydromyricetinem byla dvakrát vyšší než aktivita kontrolních vzorků. Aktivita stanovená jako EROD v játrech po premedikaci dihydromyricetinem byla dva a půlkrát vyšší než aktivita kontrolních vzorků.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Stiborová M., Hudeček J., Páca J.Jr., Martínek V., Páca J.: Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické Listy*, 98, 876–890 (2004).
- [2] Knejzlík Z., Káš J., Ruml T.: Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické Listy*, 94, 913–918 (2000).
- [3] Okey A.B., Roberts E.A., Harper P.A., Denison, M.S.: Induction of drugmetabolizing enzymes: mechanisms and consequences. *Clinical Biochemistry*, 19, 132–141 (1986).
- [4] Lamb D.C., Lei L., Warrilow A.G.S., Lepesheva G.I., Mullins J.G.L., Waterman M.R., Kelly S.L.: The first virally encoded cytochrome P450. *Journal of Virology* 83, 8266–8269 (2009).
- [5] Jakoby W.B., Ziegler D.M.: The enzymes of detoxication. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 20715–20718 (1990).
- [6] Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M.: Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chemické Listy*, 95, 212–222 (2001).
- [7] Kalgutkar A.S., Gardner I., Obach R.S., Shaffer C.L., Callegari E., Henne K.R., Mutlib A.E., Dalvie D.K., Lee J.S., Nakai Y., O'Donnell J.P., Boer J., Harriman S.P.: A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. *Current Drug Metabolism*, 6, 161–225 (2005).
- [8] Hannemann F., Bichet A., Ewen K.M., Bernhardt R.: Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770, 330–344 (2007).

- [9] Stiborová M., Mikšanová M., Martínek V., Frei E.: Heme Peroxidases: Structure, Function, Mechanism and Involvement in Activation of Carcinogens. *A Review of Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 65, 297–325 (2000).
- [10] de Wildt S.N., Kearns G.L., Leeder J.S., van den Anker J.N.: Glucuronidation in humans. Pharmacogenetic and developmental aspects. *Clinical Pharmacokinetics*, 36, 439–452 (1999).
- [11] Armstrong, S.C., Cozza, K.L.: Pharmacokinetic drug interactions of morphine, codeine, and their derivatives: theory and clinical reality, Part II. *Psychosomatics*, 44, 515–520 (2003).
- [12] Armstrong S.C., Cozza K.L.: Pharmacokinetic drug interactions of morphine, codeine, and their derivatives: theory and clinical reality, part I. *Psychosomatics*, 44, 167–171 (2003).
- [13] Garfinkel D.: Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 77, 493–509 (1958).
- [14] Klingenberg M.: Pigments of rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 75, 376–386 (1958).
- [15] Omura T., Sato R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *Journal of Biological Chemistry*, 239, 2370–2378 (1964).
- [16] Anzenbacher P., Dawson J. H., Kitagawa T.: Towards a unified concept of oxygen activation by heme enzymes: the role of the proximal ligand. *Journal of Molecular Structure*, 214, 149–158 (1989).

- [17] Hudeček J., Baumruk V., Anzenbacher P., Munro A.W.: Catalytically self-sufficient P450 CYP102 (Cytochrome P-450 BM-3) : resonance Raman spectral characterization of the heme domain and of the holoenzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243, 811–815 (1998).
- [18] Nelson D.R., Strobel H.W.: Evolution of cytochrome P-450 proteins. *Molecular Biology Evolution*, 4, 572–593 (1987).
- [19] Danielson P.B.: The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current Drug Metabolism*, 3, 561–597 (2002).
- [20] Jungermann K., Katz N.: Functional specialization of different hepatocyte populations, *Physiological Reviews*, 69, 708–764 (1989).
- [21] Guengerich F.P.: Role of cytochrome P450 in drug-drug interactions, *Advances in Pharmacology*, 43, 7–35 (1997).
- [22] Nebert D.W., Nelson D.R., Adesnik M., Coon M.J., Estabrook R.W., Gonzalez F.J., Guengerich F.P., Gunsalus I.C., Johnson E.F., Kemper B., Lewin V., Phillips J.R., Sato R., Waterman M.R.: The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci, *DNA*, 8, 1–13 (1989).
- [23] Stiborová M.: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace, *Sborník multioborového semináře „Otevřená věda“ z 22. – 29.10., 2005, Praha*
- [24] Sakaguchi M., Mihara K., Sato R.: Signal recognition particle is required for co-translational insertion of cytochrome P-450 into microsomal membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 3361–3364 (1984).

- [25] Murakami K., Mihara K., Omura T.: The transmembrane region of microsomal cytochrome P450 identified as the endoplasmic reticulum retention signal. *Journal of Biochemistry*, 116, 164–175 (1994).
- [26] Oprea T.I., Hummer G., García A.E.: Identification of a Functional Water Channel in Cytochrome P450 Enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 2133–2138 (1997).
- [27] Testa B., Krämer S.D.: The biochemistry of drug metabolism-an introduction: Part 2. Redox reactions and their enzymes. *Chemistry and Biodiversity*, 4, 257–405 (2007).
- [28] Omura T.: Recollection of the early years of the research on cytochrome P450. In: *Proceedings of the Japan Academy*, ed. Otsuka M.. Tokyo: Terra Scientific Publishing Company, 2011, 617–640.
- [29] Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví, *Chemické Listy*, 93, 229–237 (1999).
- [30] <http://www.pnas.org/content/107/44/18783/F1.large.jpg> (přístup 9. května 2013)
- [31] Sivaraman L., Leatham M.P., Yee J., Wilkens L.R., Lau A.F., Le Marchand L.: CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer, *Cancer Research*, 54, 3692–3695 (1994).
- [32] Brosen K.: Drug interactions and the cytochrome P450 systém. The role of cytochrome P450 1A2., *Clinical Pharmacokinetics*, 29, 20–25 (1995).
- [33] Pelkonen O., Turpeinen M., Hakkola J., Honkakoski P., Hukkanen J., Raunio H.: Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of Toxicology*, 82, 667–715 (2008).

- [34] Pelkonen O., Abass K.: The inhibition of major human hepatic cytochrome P450 enzymes by 18 pesticides: Comparison of the N-in-one and single substrate approaches. *Toxicology in Vitro*, 27, 1584–1588 (2013).
- [35] Rendic S.: Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metabolism Reviews*, 34, 83–448 (2002).
- [36] http://www.czso.cz/csu/2012edicniplan.nsf/kapitola/4017-12-r_2012-01 (přístup 18. května 2013) – Zemřelí podle seznamu příčin smrti, pohlaví a věku v ČR, krajích a okresech 2002 až 2011
- [37] Hodek P., Křížková J., Burdová K., Šulc M., Kizek R., Hudeček J., Stiborová M.: Chemopreventive compounds-View from the other side, *Chemico-Biological Interactions*, 180, 1–9 (2009).
- [38] Vavruch I.: Rakovina a chemické karcinogeny, *Chemické Listy*, 87, 504–508 (1993).
- [39] Klener P.: Chemoprevence nádorových onemocnění, *Klinická onkologie*, 12, 78–81 (1999).
- [40] Hollman P.C., Katan M.B.: Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedical Pharmacotherapy*, 51, 305–310 (1997).
- [41] Moon Y.J., Wang X., Morris M.E.: Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro*, 20, 187–210 (2006).
- [42] Huang M.T., Chang R.L., Fortner J.G., Conney A.H.: Studies on the mechanism of activation of microsomal benzo[a]pyrene hydroxylation by flavonoids. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 1111–1117 (1981).

- [43] Primiano T., Yu R., Kong A.N.T.: Signal transduction events elicited by natural products that function as cancer chemopreventive agents. *Pharmaceutical Biology*, 39, 83–107 (2001).
- [44] Knowles L.M., Zigrossi D.A., Tauber R.A., Hightower C., Milner J.A.: Flavonoids suppress androgen-dependent human prostatic tumor proliferation. *Nutrition and Cancer*, 38, 116–122 (2000).
- [45] Zhang Q.-Y., Wikoff J., Dunbar D., Fasco M., Kaminsky L.: Regulation of Cytochrome P4501A1 Expression in Rat Small Intestine. *Drug Metabolism and Disposition*, 25, 21–26 (1997).
- [46] Kang Z.C., Tsai S.J., Lee H.: Quercetin inhibits benzo[a]pyrene-induced DNA adducts in human Hep G2 cells by altering cytochrome P-450 1A1 expression. *Nutrition and Cancer*, 35, 175–179 (1999).
- [47] Lin J.H., Lu A.Y.H.: Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics*, 35, 361–390 (1998).
- [48] Shih H., Pickwell G.V., Quattrochi L.C.: Differential effects of flavonoid compounds on tumor-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373, 287–294 (2000).
- [49] Waller C.L., McKinney J.D.: Three-dimensional quantitative structure–activity relationships of dioxins and dioxin-like compounds: model validation and Ah receptor characterization. *Chemical Research in Toxicology*, 8, 847–858 (1995).
- [50] Ueng Y.-F., Kuwabara T., Chun Y.-J., Guengerich F.P.: Cooperativity in oxidations catalyzed by cytochrome P450 3A4. *Biochemistry*, 36, 370–381 (1997).

- [51] Boek-Dohalská L., Hodek P., Sulc M., Stiborová M.: Naphthoflavone acts as activator and reversible or irreversible inhibitor of rabbit microsomal CYP 3A6. *Chemico-Biological Interactions*, 138, 85–106 (2001).
- [52] Tsyrllov I.B., Mikhailenko V.M., Gelboin H.V.: Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P-450s to different flavonoids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1205, 325–335 (1994).
- [53] van der Hoeven T. A., Coon M. J.: Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 6302–6310 (1974).
- [54] Wiechelman K.J., Braun R.D., Fitzpatrick J.D.: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, 175, 231–237 (1988).
- [55] <http://www.ok.cz/dkitt/> (přístup 9. května 2013) – popis softwaru Kim
- [56] Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685 (1970).
- [57] Burke M.D., Mayer R.T.: Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition*, 2, 583–588 (1974).
- [58] Thelen K., Dressman J.B.: Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61, 541–558 (2009).
- [59] Hodek P., Křížková J., Frei E., Singh R., Arlt V.M., Stiborová M.: Impact of beta-naphthoflavone on genotoxicity of food derived carcinogens. *Neuroendocrinology Letters*, 32, 25–34 (2011).

- [60] Křížková, J.. Effects of chemopreventive compounds on cytochrome P450s. Praha 2010. Doktorská dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.
- [61] Shen Y., Lindemeyer A.K., Gonzalez C., Shao X.M., Spigelman I., Olsen R.W., Liang J.: Dihydromyricetin as a novel anti-alcohol intoxication medication. *Journal of Neuroscience*, 32, 390–401 (2012).
- [62] Chaudhary, A., Willett, K.L. Inhibition of human cytochrome CYP1 enzymes by flavonoids of St. John's wort. *Toxicology*, 217, 194–205 (2006).