

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

**MODULAČNÍ ÚČINKY QUERCETINU A RUTINU NA
AKTIVITU A EXPRESI CYTOCHROMU P4501A VE
STŘEVNÍCH BUŇKÁCH**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Hradec Králové 2010

Marie Volková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Ráda bych poděkovala Doc. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za odborné vedení práce, ochotu a všestrannou pomoc. Velice také děkuji Veronice Forstové, Ph.D. za významnou spolupráci a informace, které mi poskytla. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem pracovníkům katedry biochemických věd za ochotu, se kterou mi pomohli, kdykoliv jsem potřebovala a za možnost zde pracovat a využívat špičkové vybavení této katedry.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Marie Volková

Školitel: Doc. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Název diplomové práce: Modulační účinky quercetinu a rutinu na aktivitu a expresi cytochromu P4501A ve střevních buňkách

Flavonoidy vznikají jako sekundární metabolity rostlin a jsou denně konzumovány v ovoci a zelenině. Vykazují antioxidační, protizánětlivé, antikarcinogenní a další prospěšné vlastnosti. Jejich potenciální antikarcinogenní vliv je zprostředkován silným antioxidačním působením, může ale zahrnovat i inhibici enzymů metabolizujících xenobiotika na karcinogenní sloučeniny.

V této práci byl zkoumán potenciální inhibiční vliv flavonoidů rutinu a quercetinu na aktivitu a expresi cytochromu P4501A (CYP1A) ve střevních buňkách. Quercetin je nejčastěji se vyskytující zástupce flavonoidů a rutin jeho nejběžnější glykosidická forma. CYP1A je zodpovědný za aktivaci řady prekarcinogenních látek přijímaných potravou. Studie byla provedena na střevní linii HCT-8. Enzymová aktivita CYP1A byla měřena stanovením EROD/MROD aktivity, množství proteinu CYP1A bylo stanoveno pomocí Western blottingu.

Quercetin v koncentraci 1 μM způsoboval mírné zvýšení EROD/MROD aktivity, vyšší koncentrace quercetinu však aktivitu EROD/MROD výrazně snižovaly. Quercetin při současné aplikaci s modelovými induktory CYP1A (methylcholantren, MCH; β -naftoflavon, β -NF) výrazně omezoval MCH i β -NF zprostředkovanou indukci EROD/MROD aktivity. Quercetin také inhiboval EROD/MROD aktivitu v buňkách, kde CYP1A byl předem naindukován expozicí s MCH nebo β -NF. Vliv rutinu byl ve všech experimentech mnohem nižší a prakticky nevýznamný.

Quercetin v potravě může částečně omezovat aktivaci prekarcinogenů ve střevních buňkách.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Marie Volková

Supervisor: Doc. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Modulatory effects of Quercetin and Rutin on the activity and expression of cytochrome P4501A in the intestinal cells

Flavonoids originate as the secondary metabolites of plants and they are daily consumed in fruits and vegetables. They show the antioxidant, antiinflammatory, anticarcinogenic and other healthy effects. A potential anticarcinogenic effect is mediated by the strong antioxidant activity, but it can also include an inhibition of xenobiotica - metabolizing enzymes to the carcinogenic compounds.

This work has examined the potential inhibition effect of the flavonoids Rutin and Quercetin on an activity and expression of cytochrome P4501A (CYP1A) in the intestinal cells. Quercetin is the most abundant flavonoid and Rutin is its most abundant glycosidic form. CYP1A is responsible for an activation of many pre - carcinogenic ingested substances. The study was conducted on the intestinal cell line HCT-8. CYP1A's enzymatic activity was measured by EROD/MROD activity; quantity of CYP1A's protein was set by Western blotting.

Quercetin at the concentration of 1 μ M caused slightly increased EROD/MROD activity but higher concentration of Quercetin decreased EROD/MROD activity substantially. During a synchronous application with model inductors CYP1A (Methylcholantren, MCH; β -naftoflavon, β -NF), Quercetin significantly reduced induction of EROD/MROD activity mediated by MCH or β -NF. Quercetin also inhibited EROD/MROD activity in those cells where CYP1A had been induced by exposure with MCH or β -NF in advance. Rutin's effect, on the other hand, was substantially weaker and virtually insignificant in all conducted experiments.

Quercetin contained in food can partially reduce the activation of the pre-carcinogenics in the intestinal cells.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	FLAVONOIDY	8
2.1.1	Quercetin a rutin.....	8
2.1.2	Mutagenita, toxicita a karcinogenita quercetinu a rutinu	16
2.2	CYTOCHROM P450	17
2.2.1	Cytochrom P450 1A1.....	18
2.2.2	Cytochrom P450 1A2.....	19
2.2.3	Receptor aromatických uhlovodíků (aryl hydrocarbon receptor, AhR).....	20
2.3	BUNĚČNÁ LINIE HCT-8.....	22
3	CÍL PRÁCE	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	25
4.1	MATERIÁL, PŘÍSTROJE, POMŮCKY, CHEMIKÁLIE	25
4.1.1	Biologický materiál.....	25
4.1.2	Přístroje	25
4.1.3	Pomůcky.....	25
4.1.4	Chemikálie	26
4.2	METODIKA	27
4.2.1	Kultivace buněčných linií	27
4.2.2	Test cytotoxicity – barvení neutrální červení (Neutral Red uptake test).....	29
4.2.3	Měření aktivity CYP1A metodou EROD/MROD	32
4.2.4	Western blotting.....	35
5	VÝSLEDKY	46
5.1	TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY R, Q.....	46
5.2	TESTOVÁNÍ ZHÁŠENÍ FLUORESCENCE RESORUFINU R, Q.....	49
5.3	TESTOVÁNÍ VLIVU R a Q NA AKTIVITU EROD/MROD.....	50
5.4	TESTOVÁNÍ VLIVU R a Q NA INDUKCI EROD/MROD β -NAFTOFLAVONEM	54
5.5	TESTOVÁNÍ VLIVU Q a R NA EROD/MROD AKTIVITU CYP 1A INDUKOVANÉHO β -NAFTOFLAVONEM	59
5.6	TESTOVÁNÍ VLIVU R A Q NA INDUKCI EROD/MROD METYLCHOLANTRENEM.....	64
5.7	TESTOVÁNÍ VLIVU Q A R NA EROD/MROD AKTIVITU CYP 1A INDIKOVANÉHO METYLCHOLANTRENEM.....	69
5.8	TESTOVÁNÍ VLIVU Q A R NA EXPRESI CYP 1A METODOU WESTERN BLOTTINGU.....	74
6	DISKUSE.....	75
7	ZÁVĚR	83
8	ZKRATKY.....	84
9	SEZNAM LITERATURY	85

1 ÚVOD

Nejvyšší výskyt rakoviny kolonu a rekta je v západní Evropě, tedy v zemích vyspělých. Tato skutečnost je zaviněna především špatnou potravou. Pro západoevropskou stravu je typický vysoký obsah živočišných a nízký podíl rostlinných produktů a častá úprava smažením a grilováním. Na rozdíl od rozvojových zemí obsahuje navíc naše denní jídlo a pití umělá dochucovadla, konzervancia, barviva a další látky, které sice často přispívají ke zvýšení gurmánského dojmu, ale v našem těle mohou vykazovat toxické vlastnosti. Lidské tělo je vybaveno mnoha reparativními mechanismy, ale při nahromadění chyb a spoluúčasti dalších faktorů se některé vady stávají neopravitelné. Bylo by dobré se vyhnout působení různých mutagenů, ale náš život je jimi již tak prostoupen, že to prakticky není možné. Člověk proto musí hledat nové cesty, které se zaměřují na eliminaci jejich vlivu v těle.

Jednou z možností přispění ke zdravému životnímu stylu je konzumace ovoce a zeleniny. Obecně dobře známy jsou účinky obsažených vitamínů, vlákniny, ale stále více se hovoří o dalších sloučeninách – flavonoidech. Flavonoidy vznikají jako sekundární metabolity rostlin a podílí se na jejich růstu, zbarvení, antioxidačních vlastnostech a mnohých dalších. Řada studií prokázala, že flavonoidy přijímané s rostlinnou stravou mají příznivé působení i na lidský organismus. Nejčastěji byla studována jejich antikarcinogenní aktivita, která je způsobena zejména silnými antioxidačními vlastnostmi a schopností modulovat aktivity některých enzymů. V tenkém střevě je dosažitelná koncentrace flavonoidů přijímaných v potravě mnohonásobně vyšší než v plasmě a jiných tkáních, a tak by se zde potenciální antikarcinogenní účinky flavonoidů mohly projevit nejnáze. V tenkém střevě se také odehrává aktivace řady prokarcinogenů na aktivní karcinogeny. Modulační aktivita flavonoidů, která by ovlivňovala právě ty enzymy, jež se na aktivaci prokarcinogenů podílejí, by mohla působit antikarcinogenně.

V předložené diplomové práci byl studován vliv flavonoidů na aktivitu a expresi cytochromů P4501A, které jsou zodpovědné za metabolickou aktivaci (toxikaci) řady prokarcinogenů přijímaných s potravou. Jako zástupci flavonoidů byly vybrány rutin a quercetin, protože jejich výskyt v potravě je ze všech flavonoidů nejvyšší. Chtěli jsme zjistit, zda by zvýšený příjem těchto flavonoidů mohl blokovat metabolickou aktivaci v potravě obsažených prokarcinogenů enzymy v lumenu tenkého střeva.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 FLAVONOIDY

Flavonoidy jsou rozsáhlou skupinou látek, kterou tvoří více jak 8000 flavonoidních sloučenin, přičemž se stále objevují nové. Flavonoidy jsou rostlinné sekundární metabolity a hrají důležitou roli v jejich vývoji, růstu, obraně rostliny proti mikroorganismům a škůdcům. Flavonoidní látky se také podílejí na zbarvení, vůni a chuti rostlin. V nejvyšší koncentraci se nacházejí v semenech, ovocné slupce, kůře a v květech.

Jejich biosyntéza je iniciována kondenzací 4-kumaryl-koenzymu A se třemi molekulami malonyl-koenzymu A za vzniku chalkonu, jež je prekurzorem všech flavonoidů [1]. Struktura se skládá ze dvou benzenových kruhů s heterocyklickým pyranovým nebo pyronovým kruhem. Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě glykosidů (glukosidy, rhamnosidy, rutinosidy...), ale jejich struktura může být i komplexnější (estery a ethery). V závislosti na substituci kruhu C v pozici 2,3 nebo 4 je můžeme dělit do osmi skupin: flavany, flavanony, isoflavanony, flavony, isoflavony, anthokyanidy, chalkony a flavonolignany.

Význam těchto polyfenolických sloučenin pro člověka spočívá v jejich farmakologických účincích. Jejich efekt je popisován jako antialergický, protizánětlivý, protimutagenní, protikarcinogenní a enzymo-modulační. Antioxidační efekt flavonoidů je spojován se snížením rizika degenerativních chorob, které vznikají působením volných radikálů [2]. Jejich průměrný denní příjem potravou činí 1 – 2 g denně [3]. Stále více studií ukazuje, že zvýšený příjem flavonoidů může korelovat se sníženým rizikem onemocnění rakovinou prsu, plic a žaludku [4,5,6].

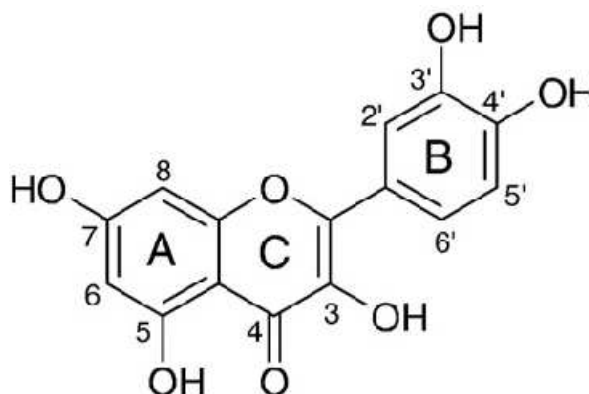
2.1.1 Quercetin a rutin

Quercetin je flavonoidní sloučenina, jež patří do skupiny flavonů, které mají v poloze 3 navázanou hydroxylovou skupinu (viz obrázek 1). Tyto sloučeniny jsou souhrnně nazývány jako flavonoly. Flavonoly jsou v rostlinném metabolismu zahrnuty do procesu tvorby energie, poskytují rostlině silný antioxidační efekt a pravděpodobně ji chrání proti škodlivému ultrafialovému záření.

Quercetin je jeden z nejčastěji se vyskytujících flavonolů v potravě a tvoří aglykon celé řady důležitých glykosidů. Je obsažen zejména v cibuli, pórků, česneku, jablcích, citrusech a bobulovinách. Černý čaj, stejně jako červené víno a různé ovocné džusy jsou také jeho bohatým zdrojem [7].

Průměrný světový příjem quercetinu je 5 - 40 mg denně, ale lidé zvýšeně konzumující zeleninu a ovoce mohou dosáhnout množství až 200 - 500 mg na osobu denně, přičemž záleží na stravovacích návycích a složení potravy v jednotlivých státech [7].

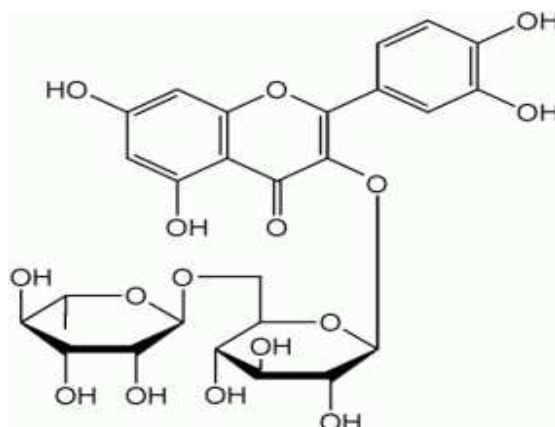
Quercetin vykazuje antioxidační [8], antivirové, protizánětlivé, antibakteriální a antiproliferativní účinky. Různé studie provedené *in vitro* popisují efekt quercetinu jako indukce apoptózy, inhibice uvolnění histaminu, antimutagenita, inhibice protein kinázy C, inhibice lipooxygenázy, modulace buněčného cyklu, inhibice angiogeneze a inhibice angiotensin konvertujícího enzymu II [9]. Díky jeho vysokému zastoupení v potravě, nízké toxicitě a pozitivním účinkům proti rakovinnému bujení má tato sloučenina potenciál pro využití v prevenci rakoviny.



Obr. 1: Struktura quercetinu; 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon

Nejběžnější forma výskytu quercetinu je rutin [3]. Rutin je flavonolový glykosid, jehož struktura je tvořena quercetinem a cukernou částí-rutinózou. Chemická struktura je znázorněna na obrázku 2. Je nazýván také jako vitamín P [10]. Má výrazně žlutou barvu.

Rutin byl objeven roku 1842 v listech routy vonné (*Ruta graveolens*). Mezi jeho nejvýznamnější zdroje patří pohanka obecná (*Fagopyrum vulgare*), ruta vonná a jerlín japonský (*Sophora japonica*). Jeho vysoký obsah můžeme nalézt rovněž v chřestu, šípcech, ve slupkách rajčat, v kůře citrusových plodů, v jablečné slupce, zeleném a černém čaji.



Obr. 2: Chemická struktura rutinu- 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon-3-rutinosid

Na našem území je nejvýznamnějším zdrojem rutinu pohanka. Nejvyšší množství obsahují květy, ale nachází se i v celé rostlině. Průmyslově se zpracovávají semena, obsahující okolo 20 mg rutinu ve 100 g sušiny, přičemž množství rutinu je závislé na druhu, varietě a přírodních podmínkách [11]. Na našem trhu se setkáváme zejména s tepelně opračovanou a loupanou pohankou, která v důsledku této úpravy ztrácí část rutinu.

Rutin má výrazné antioxidační vlastnosti, je silnějším antioxidantem než kyselina askorbová, jeho účinek je ale koncentračně závislý [12]. Spolu s dalšími flavonoidy zvyšuje hladinu vitamínu C v těle. Kromě antioxidačního působení vykazuje ještě účinky protizánětlivé, antialergické a protivirové [10]. Protože rutin zvyšuje pevnost cévní stěny, používá se jako prevence křečových žil. Podle studií je rutin potenciálním antikarcinogenním flavonoidem, protože je schopný vysoce redukovat tvorbu zlomů DNA způsobenou mutageny [13] a inhibovat lipidovou peroxidaci [11]. Jeho denní příjem potravou je odhadován asi na 2 mg denně [14].

2.1.1.1 Absorbce rutinu a quercetinu

Rutin a quercetin se ve vysokém množství vyskytují jen v tenkém střevě [15]. Rutin je mikroorganismy rozkládán na absorbovatelné fenolické kyseliny srovnatelné biologické aktivity [14]. Rutin je na rozdíl od quercetinu vysoce hydrofilní a v tenkém střevě uvolňuje svůj aglykon, zatímco quercetin je chemicky a biochemicky stabilní, alespoň v horní části tenkého střeva [16]. Výsledky z laboratoří Walleho a kol. (2004) [17] ukazují, že některé flavonoidní glykosidy mohou být štěpeny již v ústní dutině.

Pro biodostupnost quercetinových glykosidů je zásadní druh cukerné skupiny navázané na fenolickou skupinu. Glukosové glykosidy jsou více absorbovatelné než ostatní. Výsledky získané na buněčné linii CaCo2 ukazují, že ačkoliv quercetinové glykosidy jsou schopné přecházet přes epiteliální buněčnou monovrstvu, jejich účinnost je mnohem nižší než u quercetinových aglykonů [1]. Cukerné části flavonoidů zvyšují hydrofilitu, a tak mohou být flavonoidní glykosidy jen těžce absorbovány z tenkého střeva. Jednou z možností je jejich rozklad enterobakteriemi na volné aglykony, které pak mohou být jednoduše absorbovány v tenkém střevě, protože jejich lipofilita usnadňuje pasáž přes fosfolipidovou bariéru. Podstatnou roli v průchodu lipofilických sloučenin pasivní difúzí hraje také afinita glykosidů k epiteliální buněčné membráně. Quercetinové glykosidy tak vykazují nižší lipofilitu a nižší afinitu k liposomální membráně než samotný quercetin [18]. Absorbce rutinu z jejunu byla podle některých studií označována jako dobrá. Část rutinu se ale může vázat na komponenty ve střevní stěně a tím značně snížit hladinu dosažené koncentrace v krevní plazmě [19].

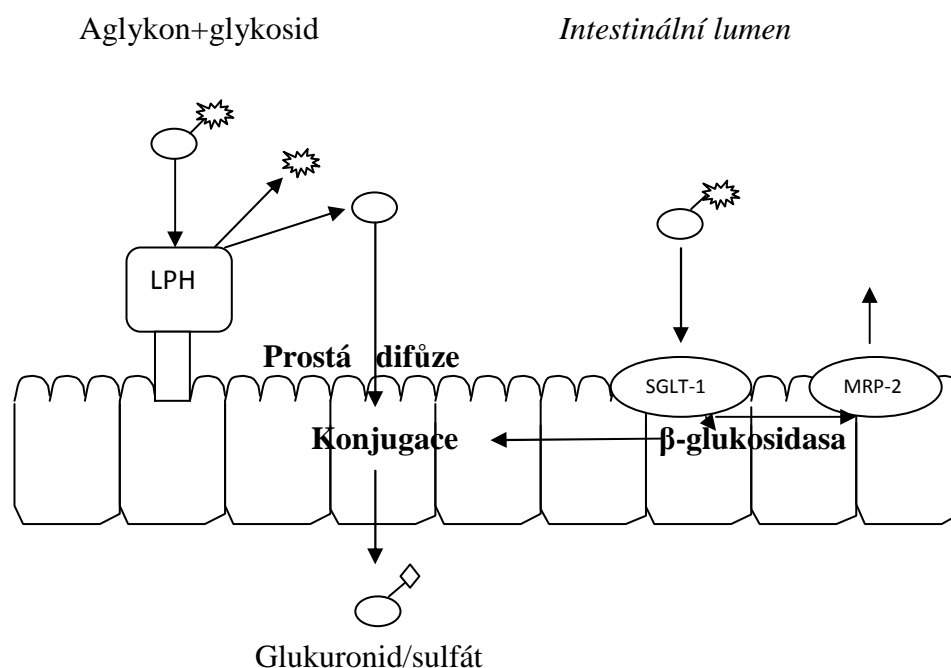
Enzymem, jenž je schopný štěpit quercetin, je laktasa phlorizinhydrolasa (LPH), která je navázána na lumenální stěnu kartáčového lemu. Díky tomuto enzymu je člověk schopen hydrolyzovat mléčnou laktózu během prvních let. Jeho aktivita je geneticky regulována a v dospělosti klesá. Avšak díky tomu, že Evropané mají příjem mléka denně, zůstává u nich zachována až do dospělosti.

LPH je enzym se dvěma aktivními místy. Použitím kontrolované inaktivace phlorizinhydrolasy bylo zjištěno, že quercetinové glykosidy jsou hydrolyzovány *in vitro* hlavně v místě aktivní laktasy [18]. Laktasa preferuje hydrofilní substráty, zásadním požadavkem je dostupný hydroxyl ve správné orientaci k aktivnímu místu. LPH však nehydrolyzuje quercetin-3-rhamnoglukosid [20, 21].

Objevením sodíkově závislého glukózového transportéru - 1 (SGLT - 1) byl dán předpoklad vyšší absorpce flavonoidních glykosidů, ale objevení refluxního transportéru tuto hypotézu vyvrací [17]. Ačkoliv flavonolové glykosidy jsou transportovány malým množstvím SGLT - 1, deglykosilace a následná difúze aglykonu je hlavní cestou absorpce [18]. Možný mechanismus absorpce flavonoidů do střevní stěny je znázorněn na obrázku 3.

Refluxním transportérem je multidrug-resistance-protein (MRP 2). Tento přenašeč má 17 transmembránových úseků. Nachází se v mnoha rakovinných buněčných liniích a nádorech získaných z pacientů, např. z kolorektálního adenokarcinomu. MRP 2 je exprimován v kartáčovém lemu proximálního segmentu a

jeho sekrece se postupně snižuje z jejunu do distálního ilea. Jeho funkce na ovlivnění biodostupnosti léčiv není dosud uspokojivě objasněna, ale obecně se nabízí, že MRP 2 přispívá k rezistenci na léčbu chemoterapeutiky. Mezi flavonoidy patřící k substrátům zahrnujeme genistein, chrysin a epigallokatechin-3-gallát [22].



Obr. 3: Schéma prostupu quercetinového glykosidu přes intestinální bariéru. SGLT - 1 sodíkově závislý glukózosý transportér, MRP - 2 multidrug – rezistence - asociated protein 2

V experimentu, který provedl M. Carbonaro a G. Grant (2005) [15], byl myším podáván quercetin a rutin, přimíchané v potravě. Většina absorpce látek probíhala v prvních pěti minutách po podání dávky, přičemž 33 - 62,5 % quercetinu bylo vázáno ve střevní stěně, zbytek byl nalezen v lumbálním obsahu. V tenkém střevě probíhal nadměrný metabolismus, ale velmi limitovaný transport (2,5 %) do krevního řečiště. Quercetin byl nejen rychleji absorbován, ale i jeho přijmuté množství bylo vyšší [15]. V obdobném experimentu nebyl detekován žádný rutin v krevním oběhu, jen isorhamnetin, a rutin byl absorbován jen jako volný quercetin [23].

V pokusu prováděném na izolovaném potkaním tenkém střevě se přibližně 10 % podaného rutinu objevilo na vaskulární straně, především jako volný rutin (5,6 %).

Většina lumbálně podaného rutinu opouštěla orgán lumbálním efluxem. Hlavní složkou lumbálního efluxu byl rutin [14].

V pokusu, kdy dobrovolníci orálně přijali 500 mg čistého rutinu, byl tento rutin identifikován v krevní plazmě s maximem po pěti hodinách po přijmutí dávky, avšak v nízkém množství (63,22 ng/ml plazmy) [24].

Z experimentů prováděných s rutinem můžeme usoudit, že není v tenkém střevě úplně rozložen na svůj aglykon a glykosid, ale že se dostává do oběhu v původní struktuře.

2.1.1.2 Metabolismus rutinu a quercetinu

Metabolismus flavonoidů byl dlouho neznámým procesem. Pro potenciální využití flavonoidů bylo nutné vyřešit, jak metabolismus probíhá a jakých koncentračních hladin mohou flavonoidy v organismu člověka dosáhnout. Byl proto proveden poměrně velký počet studií na potkanech, lidech i potkaních izolovaných orgánech. První studie narážely na absenci přístroje, který by byl schopný tak malá množství v krvi detekovat. Tento problém byl později odstraněn s rozvinutím HPLC analýzy.

Metabolická konverze quercetinu zahrnuje komplex kombinací deglykosilace, glukuronidace, sulfatace, metylace a pravděpodobně deglukuronidace. Kde v těle se tyto procesy odehrávají a posloupnost, se kterou se objevují po iniciální deglykosilaci, je stále předmětem spekulací [25].

Nejnovější studie jednoznačně prokázaly existenci β - glukosidasové aktivity v epitelu tenkého střeva lidí i potkanů, která deglykosiluje quercetinové glykosidy [26]. Její aktivita se však nevztahuje na quercetin-3-rhamnoglukosidy [18, 21]. Intestinální β - glukosidasa preferuje cukerné zbytky v poloze 4' více než v poloze 3 [9].

Ve studii W.Mullena a kol. (2006) [25] konzumovali zdraví dobrovolníci 250 g osmažené cibule. Po HPLC analýze plazmy bylo detekováno sedm quercetinových metabolitů. V plazmě se kumulují dva hlavní metabolity, quercetin-3'-sulfát a quercetin-3-glukuronid. U obou sloučenin byl t_{max} méně než jedna hodina po podání cibule. V moči bylo detekováno 12 metabolitů, přičemž hlavním metabolitem byl quercetin diglukuronid. Z výsledků vyplývá, že na syntéze těchto metabolitů quercetinu se podílejí enzymy glukuronosyltransferasa, sulfottransferasa a O-methyltransferasa [25].

Podle jedné z teorií jsou hlavní metabolity (quercetin-3'-sulfát a quercetin-3'-glukuronid) produkovány v tenkém střevě, procházejí portální žílou a v játrech jsou přeměňovány na menší sloučeniny - quercetin glukuronid sulfát, quercetin diglukuronid a isorhamnetin-3-glukuronid. Tato teorie byla zkoumána a potvrdilo se, že v epiteliálních buňkách tenkého střeva dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou a hlavními produkty, které procházející do serózní části, jsou 3- a 7-glukuronidy quercetinu. Ty jsou portální žílou přiváděny do jater. Výsledky indukují, že běžný potravní příjem quercetinu je usnadněn úplnou konjugací v tenkém střevě [27]. Pravděpodobný metabolický průběh po transportaci z tenkého střeva do jater, kde jsou konjugáty dále metabolizovány, a jejich následná exkrece ledvinami do moče, je velmi složitý proces, na kterém se podílejí glukosyltransferasy a methyltransferasy [25].

Při pokusu na izolovaném tenkém střevě potkanů tvořilo množství absorbovaného rutinu jen 10 %. Přibližně 24 % přijmutého množství bylo konjugováno se sulfátem a 20 % bylo konjugováno s kyselinou glukuronovou, zbytek tvořil samotný rutin [14].

2.1.1.3 Biodostupnost rutinu a quercetinu

Zásadní podíl na biodostupnosti flavonoidů má forma, kterou jsou do těla transportovány. Například nelze vyloučit, že quercetin dodaný do těla jako suchý prášek bude mít nižší biodostupnost než quercetin přijímaný z cibule [28]. Obecně lze říci, že vyšší biodostupnost mají glykosidy než čisté aglykony.

Ze studie z roku 1975, kdy byly podány 4 g quercetinu perorálně a 100 mg quercetinu intravenózně, byl určen jeho nízký distribuční objem 0,34 l/kg. Vazebnost na bílkoviny, především albumin, je extrémně vysoká, téměř 99,1 % [17]. Množství rutinu, jež se vyskytuje v plazmě u zdravého člověka, je 0,72 - 0,76 μM , přičemž po konzumaci cibule byly detekovány hladiny quercetinu v plazmě 0,74 μM a rutinu 0,3 μM .

Poločas eliminace je dlouhý kolem 25 hodin. Tato skutečnost vnukla myšlenku, že při opakovaném přísunu rutinu a quercetinu by měly koncentrace v plazmě stoupat. Byl proto proveden experiment, kdy zdraví dobrovolníci polykali denně jednu kapsli obsahující 1 g čistého quercetinu. Dosažená plazmatická koncentrace však byla za 28 dní pouze 1,5 μM [29]. Vzhledem k tomu, že běžný denní přísun quercetinu je daleko nižší, není zde pravděpodobnost dosažení vyšší, ani stejné hodnoty jeho koncentrace.

2.1.1.4 Význam quercetinu a rutinu v prevenci nádorového onemocnění

Většina forem rakovinného onemocnění je dnes spojována se špatnými stravovacími návyky, nevyváženým složením potravy a jejím obsahem. DNA reaktanty jsou přítomny v potravě v různých zdrojích, jako jsou aditiva (sacharin, butylovaný hydroxyanisol), kontaminanty, nebo látky které vznikají procesem vaření [30]. Běžně se vyskytující DNA reaktivní genotoxiny jsou benzo[a]pyren, vysoce zkoumaný aflatoxin B₁, vodou přijímaný akrylamid, převážně v alkoholu obsažený ethylkarbamát [31]. Genotoxinové vlastnosti mají i sloučeniny rostlinného původu. Kyselina aristocholová obsažená v čajích a rostlinných medicínách, safarol s hepatokarcinogenními účinky a další [30]. Mezi látky, které se dnes řadí k potenciálním mutagenům, patří heterocyklické aromatické uhlovodíky, které vznikají grilováním a smažením masa a ryb [32].

Pro stravování západní Evropy je charakteristický vysoký příjem energeticky bohaté stravy, její celková nevyváženost a vysoké množství látek zatěžujících organismus. Kromě evropských zemí je nejvyšší výskyt rakoviny kolonu a rekta v Austrálii, Severní Americe a nejnižší naopak v Africe a Asii, tedy vyjma Japonska [33]. Proto lze obecně říci, že výskyt kolorektální rakoviny je vyšší v rozvinutých zemích než v zemích rozvojových. Kromě geografické polohy, se výskyt rakoviny mění i na základě rozdílného pohlaví - kolorektální karcinom je celosvětově třetí nejběžnější rakovinou u mužů a druhou nejběžnější u žen.

Jednou z možností, jak snížit riziko výskytu rakoviny, je příjem potravy bohaté na rostlinné produkty, tzn. ovoce a zeleniny. Pozitivní efekt na trávení má nejenom vláknina, ale také vitamíny a další látky, mezi které se řadí i flavonoidy. Jejich potenciálnímu antikarcinogennímu využití brání skutečnost, že dosažená koncentrace v plazmě je příliš nízká pro možné projevení účinku. Tenké střevo je však vystaveno jejich nejvyšším koncentracím, a proto se zde potenciální antikarcinogenní účinek může projevit významnou měrou.

Významným mechanismem antikarcinogenního účinku je antioxidační schopnost flavonoidů. Přírodní flavonoidy silně vychytávají kyslíkové radikály *in vitro* i *in vivo*, které vyvolávají závažné změny na buněčné úrovni vedoucí k buněčné smrti. Díky své extrémní aktivitě atakují nezbytné buněčné součásti a indukují peroxidaci membránových lipidů. Toto vede k utváření toxických sloučenin, jako jsou epoxidy, aldehydy a nové radikály [34]. Rutin i quercetin mají antioxidační účinky, aktivita

rutinu je však obecně mnohem nižší než ostatních flavonoidů [12]. Naproti tomu quercetin je jedním z nejsilnějších antioxidantů mezi flavonoidy. Antioxidační aktivita je přisuzována přítomnosti dvou farmakoforů uvnitř molekuly, které mají optimální konfiguraci pro vychytávání volných radikálů. Těmito místy jsou katecholová skupina na B kruhu a OH skupiny na A, C kruhu [35]. Podle některých studií je pro antioxidační efekt důležitá i dvojná vazba C₂ - C₃ [12, 23].

Ze dvou studií případů a kontrol provedených v Itálii a ve Skotsku, kde je výskyt této rakoviny nejvyšší v Evropě, vyplývá, že zvýšený příjem flavonoidů může redukovat výskyt tohoto onemocnění. V obou případech byly přítomny mezi flavonoidy zařazeny i flavonoly. Zdrojovými potravinami flavonoidů byl ze 46 % čaj, 14 % pocházelo z cibule a 10 % z jablek. Zdrojový nosič flavonoidů hraje důležitou roli v jejich biodostupnosti, proto mohou být výsledky těchto studií ovlivněny tímto faktem. Bylo např. zjištěno, že flavonoly obsažené v čaji nejsou signifikantně spojeny se schopností protektivního účinku proti kolorektální rakovině [5].

Podle další studie, kterou provedl G. Agulla roku 1994 [6], jež zkoumala antiproliferační účinek flavonoidu quercetinu na nádorové linie, quercetin inhibuje proliferaci buněk rakoviny tlustého střeva v buněčné linii CaCo2 a HT 29 [6].

Při středně dlouhém multiorgánovém karcinogenním modelu u potkanů, inhiboval 1 % quercetin podávaný v potravě rakovinnou propagaci v tenkém střevě. Podle *in vitro* studií prováděných na různých typech buněčných linií, vykazoval quercetin pozitivní korelaci s nižším výskytem rakoviny úst, prsou, plic, prostaty, tlustého střeva a kostní dřeně [4].

2.1.2 Mutagenita, toxicita a karcinogenita quercetinu a rutinu

Při zkoumání protektivních účinků rutinu a quercetinu musela být prověřena také otázka jejich negativního působení. Rutin i quercetin jsou účinné antioxidanty (viz výše), což přispívá k jejich protinádorové účinnosti, ale díky této vlastnosti mohou vytvářet ortho - quinon a quinon - methidinové intermediáty, které jsou schopné kovalentně se vázat k DNA. Tato skutečnost je velice pravděpodobně hlavním přispívatelem k mutagenicitě zprostředkované quercetinem [7]. Další problematickou vlastností quercetinu je schopnost kompetitivně inhibovat topoisomerázu II a IV, což může vést ke zlomům DNA, které vyústí ve ztrátu genetické informace [3].

Významným mechanismem, který může způsobit karcinogenezi nebo být potenciálně strumigenní, je schopnost quercetinu působit jako alternativní substrát pro jodaci tyrosinu a ireverzibilně blokovat i thyroïdperoxidasu [36].

Quercetin byl pro své potenciální karcinogenní účinky studován v mnoha dlouhodobých experimentech na zvířatech. Většina z nich nevykazovala žádný příznak zvýšení tvorby neoplazmů, změny váhy ledvin ani srdce, nebyly pozorovány žádné toxikologicky signifikantní nepříznivé účinky spojované s reprodukcí nebo vývojem zárodku. Nevyskytovaly se ani žádné teratologické abnormality. Pouze v dvouleté studii na samčích potkanech, při podávání, v přepočtu na člověka 150 mg na 70 kg váhy, došlo ke zvýšenému výskytu adenomů močových cest a adenokarcinomů [7]. Vzhledem k vysokým dávkám quercetinu, které jsou čtyřikrát vyšší než horní hranice průměru světového příjmu, není toto riziko v populaci vysoké. Vyšší pravděpodobnost projevení se těchto negativních dopadů tak může hrozit pouze u vegetariánů nebo u konzumentů potravních doplňků.

2.2 CYTOCHROM P450

Metabolismus xenobiotik probíhá ve třech fázích. Produkty I. fáze metabolismu jsou často reaktivnější intermediáty, které ve II. fázi reagují s endogenními sloučeninami za vzniku méně reaktivních, ve vodě rozpustných konjugátů [37]. Transport xenobiotik, jejich metabolitů a konjugátů přes membrány je považován za III. fázi metabolismu xenobiotik. Principem metabolické přeměny xenobiotik je dosažení hydrofilních, netoxických substrátů, které jsou jednoduše z těla vylučovány. Metabolická přeměna však může vést i k aktivaci promutagenů a k tvorbě více toxických substrátů.

Na většině reakcí I. fáze se podílí nadrodina cytochromu P450. Různé formy tohoto cytochromu hrají klíčovou roli také v metabolismu hydrofobních endogenních substrátů. Reakcemi, jako je C - oxidace, N - oxidace, S - oxidace a dealkylace, cytochromy P450 přetváří své substráty jak na inaktivní metabolity, tak i na reaktivní intermediáty (toxické volné radikály), které se kovalentně váží k DNA a mohou indukovat maligní transformaci. Hem obsahující cytochrom P450 je lokalizován v mitochondriích a v endoplazmatickém retikulu. K reakcím, které cytochrom

katalyzuje, je jako koenzym potřeba NADPH a je nezbytná přítomnost dalšího enzymu NADPH - cytochrom P450 - reduktasy. Různé isoformy cytochromu P450 se nachází v játrech, gastrointestinálním traktu, plicích, ledvinách a dalších tkáních.

Nadrodina cytochromu P450 se dělí na rodiny a podrodiny v závislosti na jejich aminokyselinové sekvenci. U člověka hraje zásadní roli pět P450 cytochromálních (CYP) rodin - CYP1, CYP2, CYP3, CYP4 a CYP7. Rodina CYP1 zahrnuje isoformy CYP1A (CYP1A1 a CYP1A2) a CYP1B1. Podrodina CYP1A je zodpovědná za aktivaci karcinogenů benzo[a]pyrenu, 7,12-dimethylbenz[a]anthracenu, aflatoxinu B₁ a z masa odvozených heterocyklických aromatických aminů. Proteiny cytochromu P450 jsou s flavonoidy propojeny třemi cestami. (i) Flavonoidy indukují biosyntézu mnoha forem P450, (ii) modulují jejich enzymatickou aktivitu (iii) a jsou cytochromem metabolizovány [1].

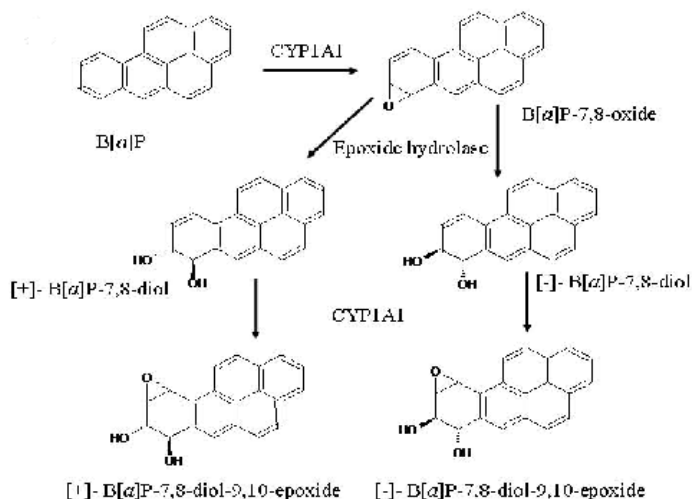
2.2.1 Cytochrom P450 1A1

CYP1A1 je jedním z nejvíce zkoumaných enzymů nadrodiny cytochromu P450. Je studován hlavně pro svou schopnost aktivovat kontaminanty životního prostředí na sloučeniny s karcinogenními vlastnostmi. CYP1A1 však hraje také významnou roli v detoxikaci karcinogenů a metabolické aktivaci sloučenin působících preventivně. CYP1A1 metabolizuje prekarcinogeny na epoxidové intermediáty, které jsou dále metabolizovány na diolové epoxidy enzymem epoxidhydrolasa. Modelovou látkou, u které byl studován metabolický vliv CYP1A1 na aktivaci proonkogenů, byl benzo[a]pyren. Schéma aktivace proonkogenů je znázorněno na obrázku 4.

CYP1A1 je pouze minimálně exprimován v lidských játrech, ale jeho syntéza může být výrazně indukována a to zvláště v mnoha extrahepatálních tkáních. Stálá expozice inhalovaným sloučeninám a karcinogenům přírodního prostředí zvyšuje jeho expresi. Současné studie prokazují, že se CYP 1A1 nachází v endoplazmatickém retikulu a vnitřní membráně mitochondrií a jeho přítomnost závisí na tkáni, věku a přítomnosti induktoru [38]. Protein a mRNA byly ve zvýšené míře nalezeny v placentě a plicích kuřáků. Hladina mRNA CYP1A1 se výrazně sníží v případě, kdy kuřák několik týdnů nekouří [39].

Role CYP1A1 při vzniku rakoviny plic je stále studována, ale v současné době výzkumy ukazují, že defekt alely CYP1A1 v kombinaci s deficitem glutathion-S-

transferasy má spojitost s vyšším výskytem rakoviny plic [39]. Vysoká aktivita cytochromu je asociována s kolorektálním karcinomem [38, 32], zvýšený výskyt byl také identifikován u nádoru prsní žlázy [40].



Obr. 4: Metabolická aktivace benzo[a]pyrenu CYP1A1 [40]

2.2.2 Cytochrom P450 1A2

CYP1A2 je jaterně specifický enzym. Původně se myslelo, že jeho exprese je omezena pouze na játra, ale nové studie ukazují, že je exprimován s CYP1A1 v plicích [41]. V játrech je konstitutivně exprimován a může být indukován xenobiotiky. CYP1A2 metabolizuje důležité látky jako je phenacetin, theophylin, kofein, imipramin a propanolol. Také aktivuje některé prokarcinogeny na karcinogeny, např. 4-aminobifenyl a heterocyklické arylaminy z jídla [38]. Sekvence CYP1A2 je z 72 % identická se sekvencí P4501A1 [42].

CYP1A2 se vyskytuje u všech jedinců, ale jeho aktivita je různá – např. u kuřáků zvýšená. Jeho vyšší aktivita je spojována i s karcinomy extrahepatálními, což je způsobeno transportem N - hydroxy metabolitů CYP1A2 do tkání, kde transferasy dokončují aktivační proces [39]. Důsledkem působení těchto metabolitů vzniká pravděpodobně i rakovina močového měchýře [42]. Role P4501A2 se prokázala i u tabákem indukovaných rakovin [38].

2.2.3 Receptor aromatických uhlovodíků (aryl hydrocarbon receptor, AhR)

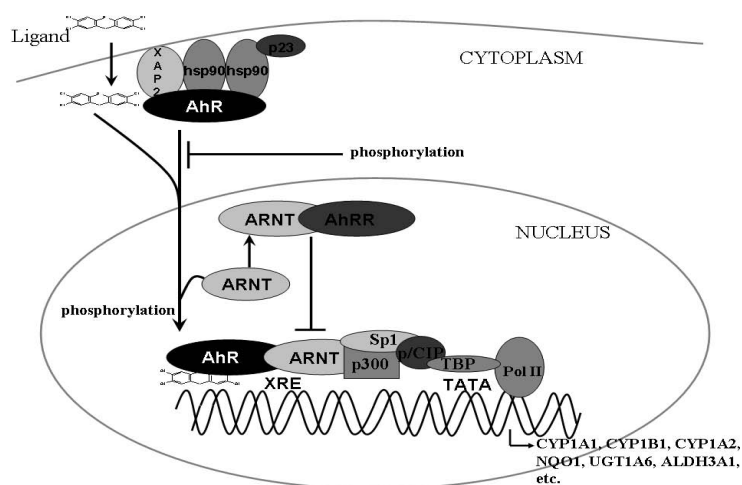
AhR je ligandově závislý cytoplazmatický transkripční faktor, který reguluje expresi mnoha genů ve všech tělních tkáních. Zprostředkovává adaptivní buněčnou odpověď na celou řadu xenobiotik, ale je bezpodmínečně nutný i pro normální fyziologický vývoj [41]. Je zahrnut do regulace buněčného růstu, apoptózy, signalizované hypoxie a buněčné adheze [40]. Transrepreseční funkce AhR zasahuje například geny pro cytokiny z rodiny TGF- β (transformující růstový faktor β), cytokin A, cdk 2 (cyklín dependentní kinasa 2) a mnohé jiné. Nejvíce prostudované geny regulované AhR jsou ty, které metabolizují xenobiotika, jako je CYP1A1. Indukce CYP1A1 je jedna z AhR dependentních odpovědí. Kontaminanty životního prostředí - kam patří i halogenované aromatické uhlovodíky a nehalogenované polycyklické aromatické uhlovodíky - jsou největší skupinu ligandů AhR, avšak ligandy mohou být i přírodně se vyskytující látky [43]. AhR upřednostňuje sloučeniny, které jsou hydrofobní, planární a mají van der Waalsovy rozměry 14*12*5 Å [29].

AhR je součástí cytosolického multiproteinového komplexu, který se skládá ještě ze dvou Hsp - 90 (heat shock protein 90 kDa), p23 Hsp - 90-interagující ko-shaperon a XAP2 imunophilin - like protein [40]. Ligand AhR vstupuje do buňky, v cytosolu se naváže na AhR, který podléhá konformační změně a dochází k translokaci komplexu AhR - ligand do jádra. V jádře se následně váže ke svému nukleárnímu translokátoru (AhR nuclear translocator, ARNT). ARNT je lokalizován vždy výhradně v jádře [37] ve formě heterodimerického komplexu s represorem AhR (aryl hydrocarbon receptor repressor, AhRR) [40]. ARNT se váže na receptorovou část komplexu AhR - ligand. Tím dojde k vytvoření vysoce afinitní formy vázající DNA v místě specifického rozpoznávajícího místa tzv. DRE nebo XRE (drug response elements resp. xenobiotics response elements) a k stimulaci transkripce genů pro CYP1A1 a dalších AhR responzivních genů [43]. AhR zprostředkovanou transkripci genů enzymů I. a II. fáze znázorňuje obrázek 5.

Na zvýšené expresi genů CYP1A1 se podílí další transkripční faktory, jako jsou Sp - 1 (undekapeptidová substance P - 1) a NF - 1 (neurofilamentová podjednotka - 1). Jako ko - aktivátoři působí SRC - 1 (ko-aktivátor steroidního receptoru), NcoA2 (nukleární ko - aktivátor 2), p/CIP (p cyklická imidová peptidomimetická sloučenina) a p300 (sloučenina spojená s tvorbou potenciálu v mozku). Množství dalších transkripčních

faktorů je ještě vyšší, ale dosud není jasné, zda se vyskytují vždy všechny ve všech tkáních, kde je CYP1A1 indukovatelný [40].

Negativní regulace dráhy AhR může probíhat minimálně třím způsobem. První z těchto mechanismů zahrnuje expresi AhR represoru (AhRR) Heterodimer AhRR/ARNT působí jako represor zastavením transkripce iniciované XRE a kompetuje s AhR ve vytvoření heterodimeru a ARNT [40]. Transkripce AhRR je pod kontrolou AhR, který tvoří negativní zpětnou vazbu. Druhým způsobem je export AhR z jádra po odkrytí nukleární expertní sekvence (NES). Třetím mechanismem je ubiquitinace karboxylového konce molekuly AhR a její proteozomální degradace systémem 26S [43].



Obr. 5: AhR zprostředkovaná aktivace genů enzymů I. a II. fáze [40]

2.2.3.1 Ligandy AhR

Ligandy AhR jsou hydrofóbní stereoplanární struktury, s van der Waalsovými rozměry 14*12*5 Å [29]. Můžeme je rozdělit do dvou hlavních kategorií; přírodně se vyskytující a uměle syntetizované. Látky s vyšší afinitou k AhR patří mezi uměle syntetizované a jsou to především planární a hydrofobní halogenované aromatické uhlovodíky (např. dibenzofurany, bifenyly, polyhalogenované dibenzo-p-dioxiny) a polycyklické aromatické uhlovodíky (např. 3-methylcholantren, benzo[a]pyren, benzantracen). Hydrofobní halogenované aromatické uhlovodíky jsou sloučeniny méně stabilní a představují silnější ligandy AhR.

Protože AhR signalizační cesta byla aktivní i v případě, že tomu nepředcházela žádná expozice exogenním ligandům, byla předpokládána existence endogenních fyziologických ligandů. Po studiu AhR - knockoutovaných zvířat byly jako ligandy určeny tetrapyroly, metabolity kyseliny arachidonové, karotenoidy, retinoidy a další [34].

Většina AhR ligandů je přijímaná v potravě. Flavonoidy představují největší skupinu přírodně se vyskytujících, v potravě obsažených AhR ligandů. Flavonoidy jsou jak AhR agonisty, indukující expresi CYP1A1 a CYP1A2, tak i antagonisty, blokující vazbu ligandu na AhR. Účinek flavonoidů na AhR závisí na struktuře a koncentraci. Antagonistický efekt flavonoidů může být seřazen: Flavony>flavonoly>flavanony>katechiny. Strukturní oblast flavonoidů s afinitou k hydrofobní kapse AhR představuje 7. a 8. uhlík, pyran a B kruh [29].

2.3 BUNĚČNÁ LINIE HCT-8

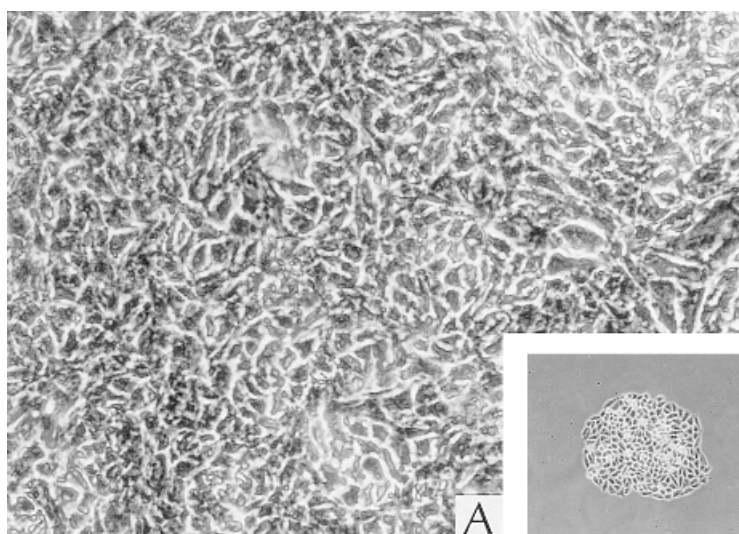
Nádorové linie jsou charakteristické ztrátou nějakých nebo všech faktorů schopných regulovat růst, diferenciaci a apoptózu. V nádorových tkáních je obvykle snížena strukturní a funkční specializace. Maligní nádorové buňky mají schopnost invaze do přilehlého mezenchymu a nakonec migrují i do vzdálených tkání, metastazují. V nejjednodušším případě může být tento proces rozdělen do dvou fází, jejichž první částí je iniciace. Dochází zde k poškození buněčné DNA, které zůstává neopravené anebo se stává neopravitelné. Toto poškození vyústí v somatickou mutaci a je reflektováno při mitóze. Iniciační událostí je často tvorba aduktu DNA - genotoxin, ale mohou to být i endogenní produkty, či volné radikály. Druhou částí je promoce, která usnadňuje plnou transformaci do invazivního stádia [44].

Zásadní výhodou při používání nádorových buněčných linií je jejich vlastnost neomezeného počtu dělení. Při dodržení nezbytných podmínek pro růst (optimální pH, živiny, 37°C, přísuv vzduchu a vlhkost), tvoří nádorová linie obnovitelný zdroj biologického materiálu. Některé rysy buněčné linie se můžou při vyšším počtu pasáží měnit, ale obecně docházíme při opakujících se pokusech ke stejným závěrům. Toto je výhodou např. oproti práci s lidskými hepatocyty, kdy je obtížné nejen jejich získání a krátká životnost, ale i různorodost odpovědi na studované induktory vzorek od vzorku.

Nevýhodou většiny buněčných linií je jejich metabolická inkompetentnost. Buňky linie HCT-8 při běžných podmínkách neexprimují mRNA CYP1A1 a nebyl identifikován ani protein CYP1A1 [45].

Buněčná linie HCT-8 je pravděpodobně stejného genetického základu jako linie DLD-1, HCT-15 a HRT-18. Tato shoda byla dokázána metodou tzv. DNA otisku prstu, který se pro tyto linie ukázal být identický [46]. Linie pochází z 67 letého muže. Jedná se o epitelální buňky získané z kolorektálního karcinomu, které při růstu tvoří monovrstvu (jejich struktura je vidět na obrázku 6). Počet dělení není omezen, ale se vzrůstajícím počtem pasáží může docházet ke ztrátě určitých rysů. Buněčnou linii lze tedy rozmrazit, rozpasážovat a znovu zamrazit, čímž se zachovává obnovitelnost zdroje buněčného materiálu.

Buněčná linie prochází při růstu třemi fázemi. Pro desintegraci narostlé monovrstvy se používá proteolytický enzym trypsin. Buňky se po pasáži musí reparovat a přisednout k podkladu. Jejich kulovitý tvar se mění na charakteristicky protáhlý. Tato fáze se nazývá jako *lag* fáze. Buňky narůstají poměrně pomalu. Následuje fáze *log*, kdy buňky jsou již přisedlé a aktivně se dělí, až do dosažení tzv. saturační koncentrace. Buňky vytvořily monovrstvu a nemají dost místa na další dělení. Narůstají proto v další vrstvě, jejich tvar se částečně mění. Tato fáze se nazývá *plató* a je charakterizována pomalým nárůstem buněk. Bylo vypořádováno, že čím déle trvá fáze *plató*, tím déle pak trvá *lag* fáze [36].



Obr. 6: Buněčná linie HCT-8 [46]

3 CÍL PRÁCE

- a)** Určit cytotoxicitu flavonoidů rutin a quercetinu na buněčné linii HCT-8
- b)** Zjistit, zda flavonoidy rutin a quercetin ovlivňují aktivitu cytochromu P4501A (CYP1A) v buněčné linii HCT-8
- c)** Zjistit, zda rutin a quercetin zvyšují expresi proteinu CYP1A u buněk linie HCT-8
- d)** Zjistit, zda rutin a quercetin ovlivňují indukci CYP1A navozenou modelovými induktory (metylcholantrenem nebo β -naftoflavonem)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 MATERIÁL, PŘÍSTROJE, POMŮCKY, CHEMIKÁLIE

4.1.1 Biologický materiál

Buněčná linie HCT-8 (lidské epitelové buňky kolorektálního karcinomu)
European Collection of Cell Cultures

4.1.2 Přístroje

- CO₂ inkubátor HeraCell
- Laminární box BioAir AURA 2000 M.A.C
- Mikroskop Nikon Eclipse TS 100
- Vodní lázeň Memmert
- Třepačka mikrotitračních destiček Thermomixer Comfort
- Desková třepačka
- Zmrazovací kontejner NALGENE
- Gel doc
- Digitální pH metr Viriomag Mono
- Analytické váhy Scaltec SBC 22
- Multifunkční snímač Tekan
- Mrazící box Heraeus
- Zdroj napětí BioRad PowerPac 200
- Centrifuga pro mikrozkušavky Biofuge Stratos Heraeus

4.1.3 Pomůcky

Sterilní kultivační lahve 75 cm² a 25 cm², sterilní pipety, multikánálové pipety, automatické pipety, elektrický pipetovací nástavec, sterilní pipetovací špičky, pipetovací špičky mikrozkušavky, sterilní nádoby, stojánek na mikrozkušavky,

stojánek na nádobky, sterilní vaničky, parafilm, sterilní kádinky, Búrkerova komůrka, Petriho misky, sterilní škrabky, sterilní mikrotitrační destičky s plochým dnem pro buněčné kultury, navažovací kopistka, latexové rukavice, nitrilové rukavice, mikrotitrační destičky s kulatým dnem pro stanovení proteinu, nalévací stojánek na gely, 75 mm spacerová skla, skla, spony, hřeben, jehla, stojan na elektroforézu, vana na elektroforézu, nanášecí blok, klíny na rozevírání gelů, ledítko, nerezová miska, bílé houbičky, silné filtrační papíry, nitrocelulósová membrána, skleněná tyčinka, blotovací zařízení, potravinová folie, kancelářská folie, kazeta pro vyvíjení filmů, RTG filmy, fotopinzeta, pinzeta, nůžky, zamrazovací ampule, odměrné baňky, odměrný válec, magnetické míchadlo, lžička, lahve pro uchovávání roztoků.

4.1.4 Chemikálie

β -naftoflavon (Sigma-Aldrich Praha, ČR), dikumarol (Sigma-Aldrich Praha, ČR), dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich Praha, ČR), ethanol 95% (Merck spol.s.r.o., ČR), ethoxyresorufin (Merck spol.s.r.o., ČR), fetální koňské sérum (Sigma-Aldrich Praha, ČR), fetální telecí sérum (Sigma-Aldrich Praha, ČR), chemiluminiscenční/fluorescenční substrát pro alkalickou fosfatázu (Vector Laboratories, CA, USA), methoxyresorufin (Merck spol.s.r.o., ČR), methycholanthren (Fluka, ČR), myší monoklonální Anti CYP 1A1/1A2 protilátka (Novus Biologicals, CO, USA), N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (Merck spol.s.r.o., ČR), penicilin/streptomycin (Lonza, Švýcarsko), polyklonální kozí protilátka proti myší IgG1 (Novus Biologicals, CO, USA), quercetin (Sigma-Aldrich Praha, ČR), RPMI 1640 médium (Sigma-Aldrich Praha, ČR), rutin (Sigma-Aldrich Praha, ČR), sodium pyruvát (Sigma-Aldrich Praha, ČR), sterilní roztok neutrální červeně 3,3 mg/ml v DPBS + MgCl₂ + CaCl₂ (Sigma-Aldrich Praha, ČR), tablety na fosfátový pufr se solemi (PBS) (Sigma-Aldrich Praha, ČR), tris(hydroxymethyl) – aminomethan (Penta a.s., ČR), trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich Praha, ČR)

4.2 METODIKA

4.2.1 Kultivace buněčných linií

4.2.1.1 Příprava fosfátového pufru se solemi (PBS), roztoku Trypsin-EDTA a média pro kulturu HCT-8

Tableta pro přípravu PBS byla rozpuštěna v 200 ml redestilované vody. Takto byl získán 0,01 M fosfátový pufr s 0,0027 M KCl a 0,137 M NaCl o pH 7,4.

Zakoupený roztok Trypsin-EDTA byl rozpipetován po 10 ml do sterilních nádobek a do každé z těchto nádobek bylo přidáno 90 ml PBS. Výsledné roztoky byly rozděleny po 10 ml do sterilních 15 ml nádobek a uchovávány při - 18°C. Takto byl získán roztok Trypsin-EDTA (0,25 %).

Buňky byly kultivovány v médiu RPMI-1640 , obsahující L - glutamin. Médium bylo obohaceno o 5 % inaktivovaného fetálního bovinního séra, 5 % inaktivovaného koňského séra, 1 % pyruvátu sodného a 0,5 % penicilinu/streptomycinu.

4.2.1.2 Rozmrazení buněčné linie dlouhodobě uchovávané v tekutém dusíku

Do připravené kultivační lahve 25 cm² bylo sterilně napipetováno 8 ml kultivačního média, předeřátého na 37°C. Médium bylo opakovaně nabíráno pipetou z kultivační lahve a přidáváno do zamrazovací zkumavky s buňkami. Zde docházelo k rychlému tání horní vrstvy buněk a naředění buněčné suspenze. Vytvořená suspenze byla rychle odsávána a přenášena do kultivační lahve. Rozmrazení je třeba provést co nejrychleji, aby se předešlo toxickému vlivu dimethylsulfoxidu (DMSO), který tvoří 10 % roztok ve zmražené zkumavce. Buněčná suspenze byla v kultivační lahvi mírným protřepáním zhomogenizována a umístěna do CO₂ inkubátoru.

Po adhezenci buněk (min. za 6 hodin, resp. druhý den) bylo měněno médium a poté následovala rutinní kultivace, již za použití 75 cm² kultivačních lahví.

4.2.1.3 Kultivace buněčných linií

Kultivační lahev byla uzavřena a vyjmuta z CO₂ inkubátoru. Bylo slito médium a sterilně napipetováno 13 ml nového média. Pasáž buněk byla prováděna podle růstu buněk, při dosažení 90 % konfluency, obvykle jednou až dvakrát týdně. Médium bylo měněno každý druhý den.

4.2.1.4 Pasážování adherentních buněk (HCT-8 linie)

Kultivační lahev byla uzavřena a vyjmuta z CO₂ inkubátoru. Médium bylo slito a buňky byly sterilně dvakrát opláchnuty 7 ml PBS. PBS odstraní vápník z buněčných spojů, což je důležité pro správnou funkci trypsinu. Čím důkladněji jsou buňky opláchnuty PBS, tím kratší je enzymatické působení a tím úspěšnější pasáž. Po přidání 1 ml roztoku Trypsin-EDTA (0,25 %) byla lahev uzavřena a mírným kýváním byl roztok rozprostřen po celém povrchu dna kultivační lahve. Buňky byly umístěny do CO₂ inkubátoru, aby mohl enzym účinkující při 37°C dobře působit. Doba inkubace závisí na důkladnosti opláchnutí a na konfluenci buněk. Průběh enzymatického uvolňování adherentních buněk ze dna může být pozorován v mikroskopu. Ve chvíli, kdy měla většina buněk kulovitý tvar a volně putovaly po dně, byla suspenze jedním prudkým pohybem setřepána do spodní části lahve. Tímto se zabraňuje vzniku shluků a udržuje jednobuněčná suspenze. V co nejkratší době bylo sterilně přidáno 5 ml média, tím se zastavilo enzymatické působení a opakovaným nabíráním a vypouštěním pipety o dno byla suspenze homogenizována. Většina suspenze byla z lahve odebrána a použita pro experimenty. 0,5 ml bylo vráceno do lahve a sterilně doplněno médiem do 13 ml. Lahev byla umístěna do inkubátoru a byl povolen uzávěr.

4.2.1.5 Zmrazení buněčné linie pro dlouhodobé uchování v tekutém dusíku

Pasáží byly získány buňky ve formě suspenze. Byly naředěny tak, aby v 1,2 ml média byl počet buněk odpovídající přibližně 80 – 90 % konfluenci na ploše 25 cm², tj. přibližně 3 - 5 miliónů buněk v 1 ml. Buněčná suspenze byla napipetována do zamrazovacích zkumavek o objemu 1,5 ml po 1,2 ml. Do každé zkumavky bylo přidáno 150 µl sterilního fetálního bovinního séra. Nakonec bylo přidáno 150 µl sterilního

DMSO, zkumavky uzavřeny a několikrát promíchány, aby bylo dosaženo rovnoměrné koncentrace 10 % toxicky působícího DMSO. Zkumavky byly umístěny do zmrazovacího kontejneru, který byl naplněn isopropanolem, a co nejrychleji byly umístěny do mrazicího boxu. Kontejner naplněný isopropanolem zajišťuje gradientové chlazení - 1°C/min.

Druhý den byly zamražené buněčné suspenze ve zkumavkách přeneseny do kontejneru s tekutým dusíkem pro dlouhodobé uchování.

4.2.2 Test cytotoxicity – barvení neutrální červení (Neutral Red uptake test)

Princip testu cytotoxicity je založen na schopnosti zdravých buněk udržovat ve svých lysozomech pH nižší než má okolní cytoplazma. Barvivo neutrální červeně je při fyziologickém pH bez náboje a prostupuje do lysozomu. Zde však získává náboj a již nemůže prostupovat zpět. Buňky se jeví jako sytě červené. Při poškození buňky však dochází i k porušení pH gradientového rozdílu na membráně lysozomu, protože jeho udržení je pro buňku energeticky náročné. Barvivo může prostupovat jak dovnitř, tak i ven a buňky se jeví jako světle zbarvené.

4.2.2.1 Příprava roztoků testovaných látek, neutrální červeně, fixačního a lyzačního roztoku

Testované roztoky byly připraveny z roztoků zásobních, jejich naředěním v médiu podle tabulky 1. Různé koncentrace R byly nanášeny na jednu destičku, Q na druhou, každý roztok v 6 paralelních jamkách. Objem připravovaného roztoku R nebo Q v médiu byl 700 µl. Připravované roztoky byly dvakrát koncentrovanější než je výsledná expoziční koncentrace, protože byly přidávány v množství 100 µl do jamek s buňkami, kde již 100 µl média bylo.

Tab. 1: Příprava roztoků testovaných látek

Koncentrace zásobních roztoků Q nebo R	DMSO	5 mM	10 mM	10 mM	50 mM	0,1 M	0,1 M	0,2 M	0,2 M
Objem přidaného zás. roztoku Q nebo R do média	1,4 μ l	1,4 μ l	1,4 μ l	2,8 μ l	1,4 μ l	1,4 μ l	2,8 μ l	2,1 μ l	3,5 μ l
Koncentrace Q nebo R v médiu	0 μM	10 μM	20 μM	40 μM	0,1 mM	0,2 mM	0,4 mM	0,6 mM	1 mM
Expoziční koncentrace Q nebo R	0 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	0,1 mM	0,2 mM	0,3 mM	0,5 mM

Kontrola byla na destičce nanášena ve dvou sloupcích, tj. 12 paralelních vzorků.

Neutrální červeně

Zakoupený roztok neutrální červeně o koncentraci 3,3 mg/ml byl naředěn médiem na výslednou koncentraci 40 μ g/ml.

Fixační roztok

1g/100 ml CaCl₂ v 0,5 % formaldehydu

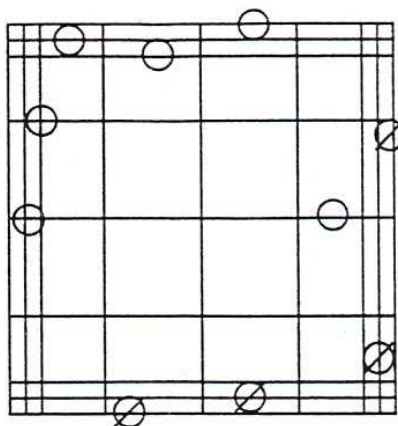
Lyzační roztok

1 % CH₃COOH v 50 % etanolu

4.2.2.2 Nasazení buněčné suspenze na mikrotitrační destičky

Kultivační lahve s konfluencí cca 80 - 90 % byly vyjmuty z CO₂ inkubátoru a běžným způsobem zpasážovány. Sterilní pipetou bylo odebráno 100 μ l buněčné suspenze do 0,5 ml mikrozkuhavky, přidáno 100 μ l trypanové modři a necháno inkubovat 3 min při pokojové teplotě. Byla připravena Bürkerova komůrka a do každé poloviny komůrky byla pipetována kapka suspenze ze samostatného odběru. Pod mikroskopem bylo počítáno množství buněk ležící unitř deseti čtverců. Počítaly se

buňky ležící uvnitř a dotýkající se horního a levého rozhraní jednotlivých čtverců. Buňky dotýkající se dolního a levého rozhraní počítány nebyly – viz obrázek 7.



Obr. 7: Čtverec Bürkerovy komůrky o délce strany 1 mm. Počítají se buňky ležící uvnitř, dotýkající se horního a levého rozhraní jednotlivých čtverců (O). Buňky dotýkající se dolního a levého rozhraní se nepočítají (Ø).

Množství buněk v naředěné suspenzi bylo vypočítáno podle vzorce:

$$c = x \cdot 10^4$$

(c – počet buněk v suspenzi, x – průměrný počet buněk v jednom čtverci, 10^4 – přepočet na jeden ml)

Buněčná suspenze byla nasazována o hustotě 20 000 buněk/100 μ l. Do jedné jamky bylo pipetováno 100 μ l suspenze. Do postraních jamek bylo pipetováno 100 μ l PBS, který pomáhá udržovat dostatečnou vlhkost, aby nedocházelo k vysychání jamek v průběhu kultivace. Buňky byly vloženy do CO₂ inkubátoru a nechány 24 hodin inkubovat.

4.2.2.3 Postup práce

Po 24 popř. 48 hodinové inkubaci by měly buňky dosáhnout 20 – 30 % konfluence a na mikroskopu se jeví jako protáhlé a jednojaderné. Byly připraveny roztoky testovaných látek v médiu a do každé jamky s buňkami přidáváno 100 μ l. Každý roztok byl přidáván do 6 jamek pod sebou, tedy 6 paralelních vzorků. Nesmí být zapomenuto na kontrolu, jíž je v tomto případě samotný DMSO, ve kterém jsou R a Q

rozpuštěny. Následovala 48 hodinová inkubace v inkubátoru, po níž by měly buňky dosáhnout 100 % konfluence.

Opatrně bylo odsáto všechno médium, aniž byl poškrabán povrch buněk a přidáno 200 μ l roztoku neutrální červeně v médiu o koncentraci 40 μ g/ml. Buňky byly nechány 3 hodiny inkubovat v inkubátoru.

Médium bylo odsáto a buňky fixovány 15 min na destičkách přidavkem 100 μ l fixačního roztoku při pokojové teplotě. V této fázi již roztoky nemusíme odsávat pipetou, ale stačí obsah opatrně vyklepnout nad umyvadlem. Buňky byly opláchnuty 50 μ l nesterilního PBS, přidáno 200 μ l lyzačního roztoku a 30 min třepány na třepáče mikrotitračních destiček.

Destičky byly vyhodnocovány na multifunkčním snímači mikrotitračních destiček Tekan Infinite M200 programem Megellan. Výsledné hodnoty absorbance byly vztaženy k hodnotám kontroly, kdy kontrola má životnost 100 %.

4.2.3 Měření aktivity CYP 1A metodou EROD/MROD

Pro CYP 1A1 je charakteristická ethoxyresorufin-O-deethylasová aktivita. CYP1A katalyzuje deetylaci ethoxyresorufinu (ER) za vzniku fluoreskujícího resorufinu, jehož fluorescence se měří.

Obdobně CYP 1A2 svoji methoxyresorufin-O-demethylasovou aktivitou štěpí methoxyresorufin (MR) za vzniku resorufinu.

4.2.3.1 Měření vlivu R a Q na aktivitu CYP 1A

Na mikrotitrační destičky s kulatým dnem byla nasazena buněčná suspenze podle návodu popsaného v kapitole 4.2.2.2. Za 24 hodin byly připravovány testované roztoky. Každá látka byla nasazena na samostatnou destičku, jednotlivé koncentrace do celých řádků, tj. 10 paralelních vzorků. Testované roztoky byly připraveny z roztoků zásobních jejich naředěním v médiu podle tabulky 2. Roztoky byly připraveny v množství 1200 μ l, dvakrát koncentrovanější než byla výsledná expoziční koncentrace, protože byly přidávány v množství 100 μ l do jamek s buňkami, kde již 100 μ l média bylo.

Tab. 2: Příprava roztoků testovaných látek

Koncentrace zásobních roztoků	DMSO	1 mM	5 mM	10 mM	50 mM
Objem přidaného zás. roztoku Q nebo R	2,4 μ l	2,4 μ l	2,4 μ l	2,4 μ l	2,4 μ l
Koncentrace Q nebo R v médiu	0 μM	2 μM	10 μM	20 μM	100 μM
Expoziční koncentrace	0 μM	1 μM	5 μM	10 μM	50 μM

Buňky byly nechány 48 hodin inkubovat v CO₂ inkubátoru. Po skončení inkubace bylo odsáto médium, buňky opláchnuty 50 μ l předeřátého PBS a poté přidáváno inkubační médium. Do každé jamky bylo pipetováno 100 μ l inkubačního média obsahujícího ER nebo MR. Na přípravu 1 ml inkubačního média bylo použito 5 μ l roztoku ER/MR v DMSO (1 mM), 6 μ l roztoku Dicoumarolu v DMSO (10 mM) a doplněno 0,1 M fosfátovým pufrem, pH 7,4.

Buňky byly nechány 60 min inkubovat v CO₂ inkubátoru. Následně bylo přidáno do všech jamek 20 μ l 0,1 M NaOH a destičky nechány 60 min třepat na třepačce mikrotitračních destiček při laboratorní teplotě.

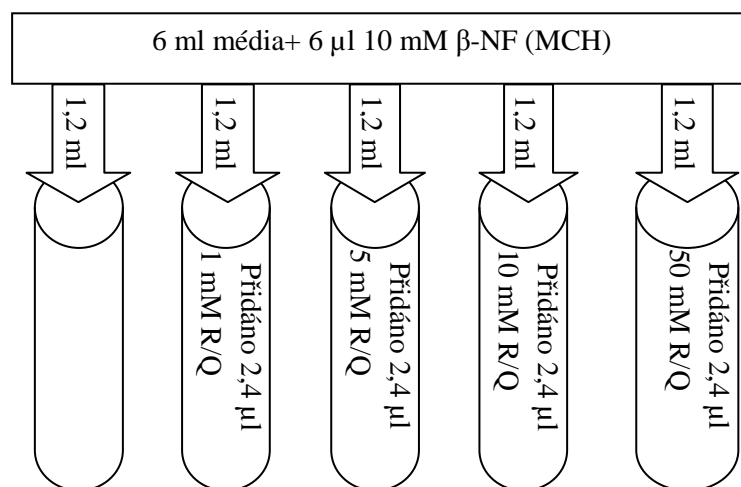
Vyhodnocování destiček se provádělo na přístroji Tekan Infinite M200 programem Megellan metodou Resorufin, kdy je měřena spodní fluorescence. Výsledná intenzita fluorescence vzorků byla přepočtena na průměrnou intenzitu fluorescence kontroly.

4.2.3.2 Měření vlivu R a Q na indukci CYP 1A β -naftoflavonem a metylcholantrenem

β -naftoflavon (β -NF) a metylcholantren (MCH) jsou významné induktory CYP1A. V tomto experimentu bylo zjišťováno, zda Q nebo R ovlivní indukci CYP1A β -NF nebo MCH.

Nejdříve byla na mikrotitrační destičky nasazena buněčná suspenze podle návodu v kapitole 4.2.2.1. Za 24 hodin byly připraveny testované roztoky. Každá látka byla nasazena na samostatnou destičku, jednotlivé koncentrace do celých řádků, tj. 10 paralelních vzorků. Testované roztoky byly připraveny z roztoků zásobních v množství

1200 μ l jejich naředěním v médiu s 5 μ M β -NF nebo MCH. Bylo postupováno podle obrázku 8.



Obr. 8: Ředění testovaných roztoků na mikrotitrační destičky.

Posledním roztokem byl roztok 2,4 μ l DMSO v 1,2 ml média. Ten byl na destičce nanesen v prvním řádku jako kontrola.

Roztoky byly připraveny dvakrát koncentrovanější než je výsledná expoziční koncentrace, protože byly přidávány v množství 100 μ l do jamek s buňkami, kde již 100 μ l média bylo. Buňky nechány 48 hodin inkubovat v CO₂ termostatu. Pokračovalo se podle návodu v kapitole 4.2.3.1. Výsledná intenzita fluorescence vzorků byla přepočtena na průměrnou intenzitu fluorescence jamek, kde byl samotný 5 μ M β -NF nebo MCH.

4.2.3.3 Měření vlivu Q a R na EROD/MROD aktivitu CYP 1A indukovaného β -NF nebo MCH

Na mikrotitrační destičky byla nasazena buněčná suspenze podle návodu v kapitole 4.2.2.1. Za 24 hodin byl připraven roztok 10 μ M β -NF nebo MCH v médiu, roztok byl tedy dvakrát koncentrovanější než byla výsledná expoziční koncentrace, protože byl přidáván do jamky v množství 100 μ l, kde již 100 μ l média bylo. Tento roztok byl v množství 100 μ l nanesen do všech jamek na mikrotitrační destičce, kromě prvního řádku, kam byl nanesen roztok 0,05 % DMSO v médiu, který byl na desce pro kontrolu. Následovala 48 hodinová inkubace v inkubátoru.

Bylo odsáto médium, buňky opláchnuty 50 μ l přehřátého PBS a poté přidáváno inkubační médium. Do každé jamky pipetováno 100 μ l inkubačního média obsahující ER nebo MR. Testované roztoky R a Q byly přidány společně s inkubačními roztoky - ER i MR. Na přípravu 1 ml inkubačního média bylo použito 5 μ l roztoku ER/MR v DMSO (1 mM), 6 μ l roztoku Dicoumarolu v DMSO (10 mM), 1 μ l roztoku 1 mM/ 5 mM/ 10 mM/ 50 mM R či Q a doplněno 0,1 M fosfátovým pufrům, pH 7,4.

Buňky nechány 60 min inkubovat v CO₂ inkubátoru. Následně bylo přidáno do všech jamek 20 μ l 0,1 M NaOH a destičky nechány 60 min třepat na třepačce mikrotitračních destiček při laboratorní teplotě.

Vyhodnocování destiček se provádělo na přístroji Tekan Infinite M200 programem Megellan metodou Resorufin, kdy je měřena spodní fluorescence. Výsledná intenzita fluorescence vzorků byla přepočtena na průměrnou intenzitu fluorescence jamek, kde byl samotný 5 μ M β -NF nebo MCH.

4.2.4 Western blotting

4.2.4.1 Příprava roztoků pro Western blotting

4 M HCl

Do 150 ml redestilované vody bylo přilito 88 ml koncentrované HCl a roztok byl doplněn destilovanou vodou do 250 ml. Uchováno v ledničce.

Příprava Ripa pufru s inhibitory

Příprava proběhla podle schématu v tabulce 3.

Tab. 3: Příprava Ripa pufru s inhibitory

Igepal CA-630	2 ml	}	Ripa pufr
Deoxycholát sodný	1 g		
SDS	0,2 g		
Fosfátový pufr 0,1 M, pH 7,4	200 ml		
10 mg/ml PMSF v isopropanolu	10 μ l/ml Ripa	}	Inhibitory
Aprotinin (5-10 TIU/ml)	10 μ l/ml Ripa		
100 mM Orthovanadát sodný	10 μ l/ml Ripa		

Zásobní roztok AA+bis AA

Bylo naváženo 30 g AA a 0,8 g bis AA. Látky byly rozpuštěny v malém množství destilované vody a doplněny destilovanou vodou do 100 ml. Uchováváno v ledničce.

1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8

Bylo naváženo 18,5 g Trisu, přidáno 75 ml redestilované vody. pH bylo upraveno pomocí 4 M HCl na pH metru. Redestilovanou vodou bylo doplněno do 100 ml. Uchováváno v ledničce.

0,5 M Tris-HCl pufr, pH 6,8

Bylo naváženo 6,0 g Trisu, přidáno 75 ml redestilované vody. pH bylo upraveno pomocí 4 M HCl na pH metru. Redestilovanou vodou bylo doplněno do 100 ml. Uchováváno v ledničce.

10 % SDS

Bylo naváženo 10 g SDS a rozpuštěno v 80 ml redestilované vody. Destilovanou vodou bylo doplněno do 100 ml. Uchováváno při laboratorní teplotě.

Koncentrovaný elektrodový pufr

Bylo naváženo 72 g glycinu, 15 g Trisu, 5 g SDS. Vše bylo rozpuštěno v 900 ml redestilované vody. pH bylo upraveno na 8,3 pomocí 4 M HCl na pH metru. Bylo doplněno destilovanou vodou v odměrné baňce do 1000 ml a rozlito po 100 ml do plastických nádobek a dáno zamrazit.

10 % APS

Připraveno v čas potřeby. 10 mg persíranu amonného bylo rozpuštěno ve 100 μ l redestilované vody.

0,5 % BFB

Bylo naváženo 50 mg BFB a přidáno 10 ml redestilované vody. Uchováváno při laboratorní teplotě.

Zásobní vzorkový pufr

1,3 ml redestilované vody bylo smícháno s 1,0 ml 0,5 M Tris-HCl pufru pH 6,8; 2,0 ml glycerolu; 3,0 ml 10 % SDS a 0,6 ml 0,5 % BFB. Uchováváno v ledničce.

Vzorkový pufr

Připraveno v čas potřeby. K potřebnému množství zásobního vzorkového pufru přidáno 2-merkaptoetanol (50 μ l/1 ml).

Blotovací pufr

Bylo naváženo 6,06 g Trisu; 28,8 g glycinu a rozpuštěno ve vodě. Bylo přidáno 400 ml methanolu a bylo doplněno v odměrné baňce destilovanou vodou do 2000 ml. Uchováváno v ledničce.

0,1 M Tris pufr, pH 8,0

Bylo naváženo 12,11 g Trisu, rozpuštěno v 800 ml redestilované vody. pH bylo upraveno na 8,0 pomocí 4 M HCl na pH metru. Redestilovanou vodou bylo doplněno do 1000 ml. Uchováváno v ledničce.

TBST

Bylo naváženo 8,77 g NaCl, rozpuštěno v 300 ml redestilované vody. Byly přidány 3 ml Tweenu 20 a 100 ml 0,1 M Tris pufru pH 8,0. Redestilovanou vodou bylo doplněno 1000 ml. Uchováváno v ledničce.

TBS

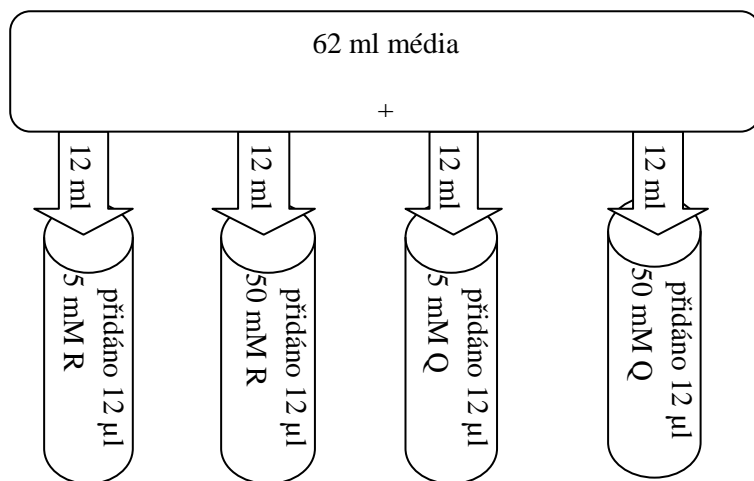
Bylo naváženo 2,19 g NaCl, rozpuštěno ve 100 ml redestilované vody. Bylo přidáno 25 ml 0,1 M Tris pufru pH 8,0; a doplněno redestilovanou vodou do 250 ml. Uchováváno v ledničce.

AP pufr

Bylo naváženo 6,06 g Trisu a 508 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. Bylo rozpuštěno ve 300 ml redestilované vody. Pomocí 4 M HCl bylo pH upraveno na 9,5 na pH metru. Bylo doplněno redestilovanou vodou v odměrné baňce do 500 ml. Uchováváno v ledničce.

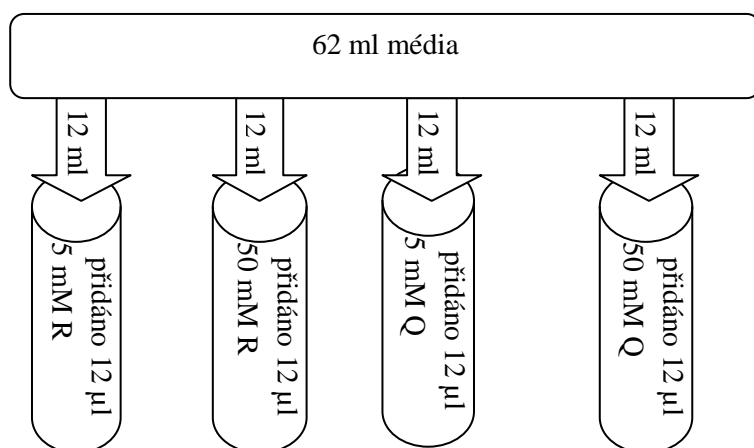
4.2.4.2 Zpracování proteinu pro Western blotting

Buněčná suspenze byla naředěna podle návodu popsaného v kapitole 4.2.2.1 na hustotu 300 000 buněk na ml. Suspenze byla sterilně pipetována po 4 ml na Petriho misky s průměrem 6 cm. Nechána 24 hodin kultivovat v inkubátoru. Druhý den byly připraveny roztoky testovaných látek ze zásobních roztoků podle obrázku 9 – 11.



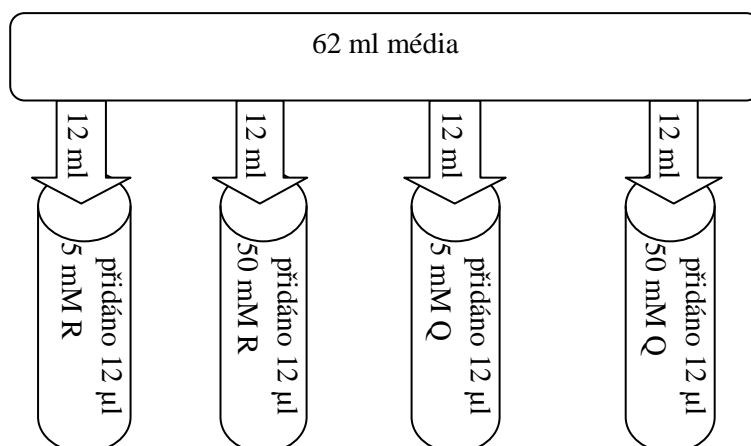
Obr. 9: Příprava testovaných roztoků na Petriho misky – roztok 5 μ M β -NF

Roztok s MCH byl připravován analogicky k roztoku s β -NF, ale na rozdíl od něj byl přidáván zásobní roztok 10 mM MCH.



Obr. 10: Příprava testovaných roztoků na Petriho misky - roztok 5 μ M MCH

Roztoky samotných testovaných látek pouze v médiu.



Obr. 11: Příprava testovaných roztoků na Petriho misky – samotné látky

Posledním roztokem byl roztok kontroly, obsahující 12 ml média a 12 µl DMSO.

Každý roztok byl pipetován po 4 ml na 3 předem odsáté Petriho misky, aby bylo získáno potřebné množství proteinu. Následovala 48 hodinová inkubace v CO₂ inkubátoru.

Bylo odsáto živné médium a pipetováno 0,5 ml vychlazeného fosfátového pufru 0,1 M, pH 7,4 na každou misku. Pomocí sterilních škrabek byly seškrabány buňky k jednomu okraji a suspenze přenesena do 1,5 ml mikrozkuřavky umístěné v ledové lázni. Jedna Petriho miska byla seškrabána do jedné mikrozkuřavky. Buňky byly stočeny za chlazení při 40 g 5 min na centrifuze a pipetou byl odstraněn supernatant. Peleta byla resuspendována ve 40 µl pufru Ripa s inhibitory – tabulka 3, na vortexu promícháno a inkubováno 30 min v ledové lázni.

Po skončení inkubace buňky stočeny za chlazení při 10 300 g 5 min a supernatant ze 3 paralelních vzorků opatrně odsán a přenesen do jedné společné 1,5 ml mikrozkuřavky umístěné v ledové lázni. Z každého vzorku odebráno do dvou malých mikrozkuřavek 10 µl pro stanovení bílkoviny ve vzorku. Všechny mikrozkuřavky zamraženy.

4.2.4.3 Stanovení bílkoviny pomocí bicinchonové kyseliny (BCA)

Proteiny ve vzorku reagují s Cu^{2+} ze soli síranu za vzniku Cu^{1+} , který tvoří při pH 10 s BCA stabilní modrofialový komplex. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny a je měřitelná na přístroji pro měření absorbance při 562 nm.

Oba odebrané vzorky po skončení získání proteinu byly rozmrazeny a jeden naředěn vodou desetkrát, druhý dvacetkrát. Každé ředění bylo nanášeno na samostatnou mikrotitrační destičku s kulatým dnem. Jednotlivé vzorky byly pipetovány po 10 μl ve čtyřech paralelních vzorcích na pravou část mikrotitrační destičky.

Jako standard pro vytvoření kalibrační křivky sloužil 1 % roztok albuminu, který byl naředěn na 0 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 600 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$ a 1000 $\mu\text{g/ml}$. Pro ověření byla provedena dvě ředění. Roztoky albuminu byly pipetovány po 10 μl na levou část každé destičky ve čtyřech paralelních vzorcích.

Do všech jamek bylo pipetováno 200 μl roztoku, který vznikl smícháním NaHCO_3 , Na_2CO_3 , kyseliny bicinchonové v 0,1 M NaOH s 4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ v poměru 50:1. Následovala 30 minutová inkubace v inkubátoru.

Destičky byly vyhodnocovány snímačem mikrotitračních destiček Tekan Infinite M200 programem Megellan při vlnové délce 562 nm, kdy je měřena absorbance. Z hodnot roztoků albuminu byla vytvořena kalibrační křivka a z té odečítány výsledné koncentrace proteinu v jednotlivých vzorcích.

4.2.4.4 Elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu

Princip metody je založen na separaci proteinů pouze díky své molekulové hmotnosti, protože díky reakci s SDS ztrácí náboj molekuly proteinu na významu.

Příprava polyakrylamidového gelu

24 hodin před samotným provedením elektroforézy byly připraveny polyakrylamidové gely. Práce byla provedena v rukavicích. 75 mm spacerová skla, skla i hřeben byly omyty jarem, vodou, destilovanou vodou a lihometanolem a nechány oschnout. Suchá skla se na sebe těsně přiložila, spojila sponami, postavila na gumovou podložku do stojánku a přitlačila vrchním kolíkem. V malé kádince byl namíchán roztok na rozdělovací gel – tabulka 4.

Tab. 4: Příprava roztoku na rozdělovací gel – rozpis na jeden gel

Redestilovaná voda	1,6 ml
Pufř 1,5 M Tris – HCl pH 8,8	1,25 ml
10% SDS	0,05 ml
AA+bis AA	2,1 ml
Roztok APS	29 μ l
TEMED	2 μ l

Roztok byl promíchán a ihned pipetou nalíván mezi skla zhruba do výšky 4,5 cm od spodního okraje. Horní hladina byla převrstvena cca 200 μ l isoutanolu nasyceným vodou a nechána 45 min polymerovat.

Isobutanol byl odlit, gel propláchnut destilovanou vodou, prostor opatrně vysušen filtračním papírem. V malé kádince byl namíchán roztok na zaostřovací gel – tabulka 5.

Tab. 5: Příprava roztoků na zaostřovací gel – rozpis na jeden gel

Redestilovaná voda	1,563 ml
Pufř 1,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,625 ml
10% SDS	0,025 ml
AA+bis AA	0,25 ml
Roztok APS	15 μ l
TEMED	2 μ l

Roztok byl lehce promíchán a pipetou nalit mezi skla na rozdělovací gel až po horní okraj skel. Hřeben byl zasunut do rozdělovacího gelu až po drážky tak, aby nezůstaly postranní zuby hřebenu venku. Necháno přes noc polymerovat v lednici.

Elektroforéza

Vzorky proteinu byly naředěny destilovanou vodou na koncentraci 10 μ g/ μ l, smíchány se vzorkovým pufřem 1:1 v mikrozkuvkách s propíchnutým víčkem a povařeny 3 minuty na třepače mikrotitračních destiček.

Gely byly vyndány z ledničky, opatrně vytáhnutý hřebeny a propláchnuty jamky destilovanou vodou. Skla vloženy silnějšími skly ven do vnitřní části stojánku na elektroforézu. Ten byl zasunut do vnější části stojánku a skla přitáhnuty sponami. Stojánek byl vložen do vany. Do horního elektrodového prostoru byl nalit pufr – 70 ml elektrodového pufru smícháme s 280 ml redestilované vody, a co zbylo, bylo nalito do spodního elektrodového prostoru. Na okraj skel byl nasazen nanášecí blok a do každé jamky nanášeno 10 μ l vzorku. Nanášecí blok byl vyndán, vana ponořena do ledové lázně, přiklopena víkem a připojena ke zdroji. Na zdroji bylo nastaveno konstantní napětí 100 V, které bylo na začátku rozdělovacího gelu zvýšeno na 200 V. Elektroforéza byla zastavena v okamžiku, kdy čelo doběhlo až ke spodnímu okraji gelu.

Imunoblotting

Skla s gelem byla vyndána a ponořena do blotovacího pufru nalitého v nerezové misce. Pomocí klínu byla skla rozevřena, zaostřovací gel byl odříznut a odstraněn. Separační gel byl uvolněn od spacerů a v místě nanášení prvního vzorku odříznut roh. Gel byl ponechán v pufru několik minut.

Mezitím byl složen blotovací sendvič. Všechny součásti byly nejdříve ponořeny do blotovacího pufru. Na černou část blotovacího zařízení byla položena bílá houbička a na ni jeden silný filtrační papír. Gel byl vyndán z pufru a rozprostřen na filtrační papír. Opatrně byla nastřížena ve velikosti gelu nitrocelulózová membrána, odstřížen levý horní roh a membrána byla položena na gel. Druhý bílý filtrační papír byl položen na membránu a poválením skleněné tyčinky po povrchu byly odstraněny vzduchové bublinky. Navrch byla položena bílá houbička, sendvič byl uzavřen a vložen do blotovací vany. Ta byla dolita až po vrch blotovacím pufrem a po straně bylo vloženo ledítko s ledem.

Blotovací vana byla vložena do ledové lázně, připojena ke zdroji a na zdroji bylo nastaveno konstantní napětí 100 V. Blotting probíhal 90 min.

Po skončení blottingu byl otevřen blotovací sendvič a membrána byla přenesena pomocí pinzety do Petriho misky s 25 ml 8 % mléka v TBST (2g odtučněného sušeného mléka / 25 ml TBST). Miska byla uložena přes noc do lednice.

Promývání membrán

Všechny roztoky, jež oplachovaly membránu, musely mít pokojovou teplotu. Jedna membrána byla oplachována vždy v 25 ml roztoku. Petriho miska byla umístěna na kývačku, rychlost kyvu byla nastavena na stupeň 5.

Membrána byla opláchnuta dvakrát 5 minut TBST. Následovala dvouhodinová inkubace s primární protilátkou. Jednalo se o myšší monoklonální Anti CYP 1A1/1A2 protilátku. Doporučené ředění pro Western blot od výrobce bylo 1:500. Protilátka byla pipetována do 25 ml TBST se 125 mg odtučněného sušeného mléka. Po inkubaci byla odsáta a zamražena pro další použití.

Membrána byla šestkrát opláchnuta pět minut v TBST. Následovala hodinová inkubace se sekundární protilátkou. Jednalo se o polyklonální kozí protilátku proti myšší IgG1. Tato protilátka byla konjugována s alkalickou fosfatázou. Doporučené ředění od výrobce pro Western blot bylo 1:100 až 1:1000. Zvoleno bylo ředění stejné jako u primární protilátky a to 1:500. Protilátka byla pipetována do 25 ml TBST se 125 mg odtučněného sušeného mléka. Po inkubaci byla odsáta a uložena do lednice pro další použití.

Následovalo šest pětiminutových oplachů TBST, dvě pětiminutová opláchnutí TBS a nakonec dvě pětiminutové inkubace s AP pufrem.

Chemiluminiscenční detekce

Membrána byla přenesena do temné komory a následné práce byly uskutečňovány při ochranném světle. Membrána byla vyndána z AP pufru a na Petriho misce potažené potravinovou fólií na ní bylo napipetováno 1,5 ml chemiluminiscenčního/fluorescenčního substrátu pro alkalickou fosfatázu. Následovala pětiminutová inkubace, během které byly RTG filmy ustřiženy na formát membrány. Pinzetou byla membrána přenesena do kancelářské folie a vložena do kazety pro exponování filmů. Doba osvitů se pohybovala kolem 12 až 15 minut. Film byl fotonpinzetou ponořen do vývojky (ředění podle návodu na obale 1:25) a za neustálého kývání bylo sledováno vyvíjení. Jakmile začal film tmavnout, byl vytáhnut a opláchnut v destilované vodě. Poté byl ponořen na několik minut do ustalovače (ředění podle návodu na lahvi 1:10), následovalo opláchnutí destilovanou vodou a sušení.

Filmy byly vyhodnocovány na přístroji Gel Doc programem Quantity One – 4.6.1. Intenzita fluorescence byla přepočítávána na hodnotu fluorescence kontroly.

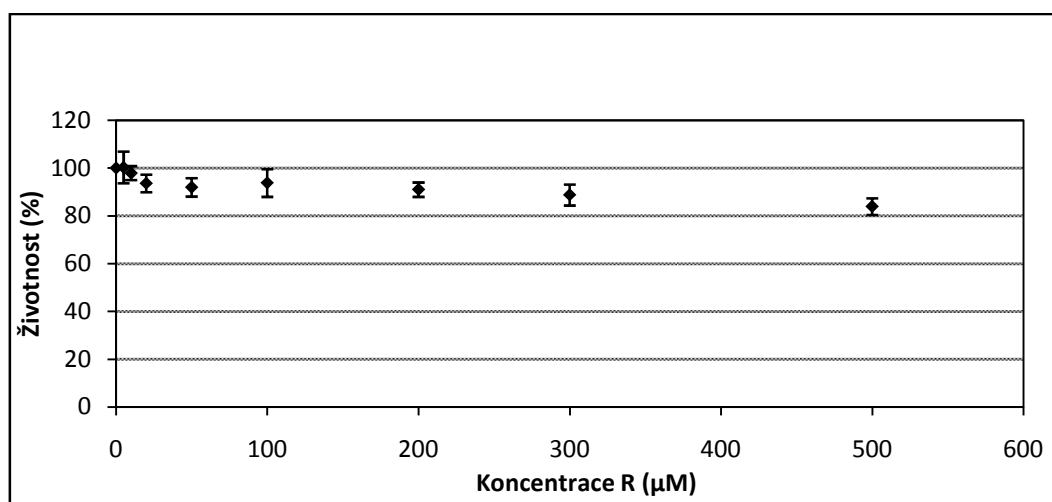
5 VÝSLEDKY

5.1 TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY R, Q

K testování cytotoxicity bylo využito barvení neutrální červení (neutral Red uptake test). Test byl proveden podle návodu popsaného v kapitole 4.2.2. s každou látkou třikrát. Kontrola obsahovala 0,05 % DMSO, protože testované látky (Q,R) byly v DMSO rozpuštěny. V předběžném experimentu bylo zjištěno, že DMSO není pro buňky HCT-8 v koncentraci 0,05 % toxický. Kontrola byla nanášena na destičce ve dvou sloupcích, krajním a prostředním. Každá testovaná koncentrace Q nebo R byla nanášena do jednoho celého sloupce tj. v šesti paralelních vzorcích. Výsledné hodnoty absorbance vzorků byly vztaženy k průměrné hodnotě absorbancí kontrol. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 6, 7 a na obrázcích 12, 13.

Tab. 6: Cytotoxicita R pro buněčnou linii HCT-8. První tři řádky představují výsledky ze tří pokusů, poslední řádek průměrné hodnoty

K(DMSO)	Rutin životnost (%)± SD							
c=0μM	c=5μM	c=10μM	c=20μM	c=50μM	c=100μM	c=200μM	c=300μM	c=500μM
100,0	100,8±3,4	98,1±1,5	89,3±2,3	88,7±2,8	90,4±7,0	85,2±2,5	84,3±2,3	80,4±2,7
100,0	99,3±11,7	97,2±1,5	97,0±3,3	95,8±2,4	93,5±3,2	92,2±1,1	92,0±1,7	91,5±1,0
100,0	99,7±4,7	97,6±6,0	97,9±5,4	95,2±6,3	97,1±7,2	96,7±5,5	93,2±9,2	87,2±6,9
100,0	100,3±6,6	97,9±2,9	93,6±3,7	92,0±3,9	93,8±5,8	91,0±3,0	88,7±4,4	83,8±3,5

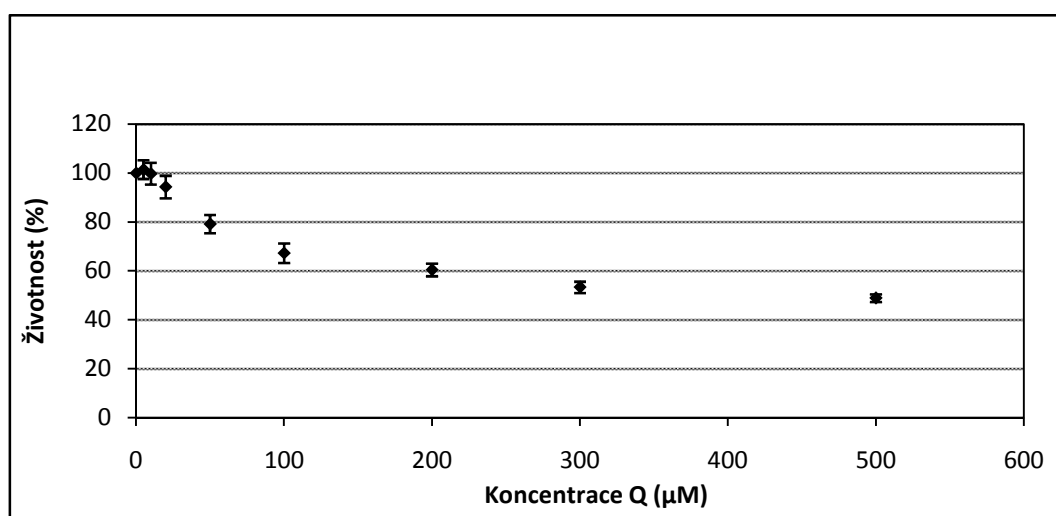


Obr. 12: Cytotoxicita R pro buněčnou linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že R není pro buněčnou linii HCT-8 příliš toxický. K mírnému úbytku buněk došlo až při použití koncentrace 300 μM a vyšších, a to jen o 11 %.

Tab. 7: Cytotoxicita Q pro buněčnou linii HCT-8. První tři řádky tvoří výsledky ze tří pokusů, poslední řádek průměrné hodnoty

K(DMSO)	Quercetin životnost (%) \pm SD							
c=0 μ M	c=5 μ M	c=10 μ M	c=20 μ M	c=50 μ M	c=100 μ M	c=200 μ M	c=300 μ M	c=500 μ M
100,0	101,9 \pm 2,7	98,3 \pm 3,8	94,4 \pm 3,4	81,3 \pm 4,0	65,7 \pm 2,1	54,4 \pm 1,4	49,7 \pm 1,1	40,7 \pm 1,2
100,0	102,4 \pm 3,1	100,9 \pm 2,5	93,4 \pm 6,3	78,0 \pm 1,3	67,0 \pm 2,5	61,1 \pm 3,4	51,0 \pm 1,5	50,3 \pm 1,8
100,0	100,0 \pm 5,7	100,1 \pm 7,1	95,2 \pm 4,1	78,2 \pm 5,9	69,0 \pm 7,4	65,8 \pm 2,9	59,2 \pm 4,4	55,5 \pm 1,8
100,0	101,4\pm3,8	99,8\pm4,4	94,3\pm4,6	79,2\pm3,7	67,2\pm4,0	60,4\pm2,6	53,3\pm2,3	48,8\pm1,6



Obr. 13: Cytotoxicita Q pro buněčnou linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že Q je pro buněčnou linii HCT-8 ve vyšších koncentracích toxický. Signifikantní snížení životnosti buněk (o 21 %) působil Q již při koncentraci 50 μ M.

5.2 TESTOVÁNÍ ZHÁŠENÍ FLUORESCENCE RESORUFINU R, Q

Test byl proveden pouze jednou podle návodu popsaného v kapitole 4.2.4. Testované látky (R,Q) byly nanášeny do celých sloupců, tj. šesti paralelních vzorků. Fluorescence vzorků byla vztažena na průměrnou fluorescenci roztoku samotného resorufinu a vyjádřena v %.

Výsledky testování jsou uvedeny v tabulce 8, 9.

Tab. 8: Vliv Q a R na fluorescenci 0,5 μM resorufinu (100 %)

0,5 μM resorufin +				
	5 μM R	50 μM R	5 μM Q	50 μM Q
Flourescence (%)	94,4 \pm 1,5	88,2 \pm 2,2	94,0 \pm 3,0	91,1 \pm 2,8

Tab. 9: Vliv Q a R na fluorescenci 0,05 μM resorufinu (100 %)

0,05 μM resorufin +				
	5 μM R	50 μM R	5 μM Q	50 μM Q
Flourescence (%)	95,5 \pm 5,5	90,7 \pm 2,1	90,70 \pm 4,1	85,8 \pm 4,4

Z hodnot vyplývá, že Q a R mírně zhášejí fluorescenci resorcinu.

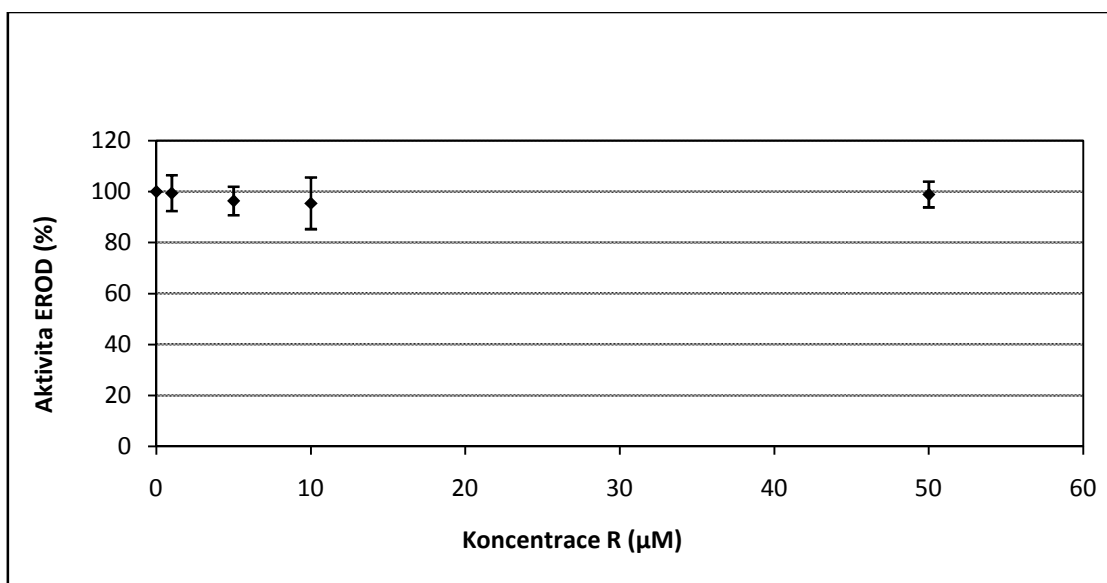
5.3 TESTOVÁNÍ VLIVU R a Q NA AKTIVITU EROD/MROD

Buňky byly 48 hodin exponovány Q nebo R. Po skončení expozice byla měřena aktivita EROD/MROD odpovídající aktivitě CYP1A podle návodu popsaného v kapitole 4.2.3.1. Každý test byl proveden třikrát. Kontrola, obsahující 0,05 % DMSO, byla nanesena na destičce v prvním řádku. Každá koncentrace Q nebo R byla testována v celém řádku, tj. v dvanácti paralelních vzorcích. Výsledná intenzita fluorescence vzorků byla vztažena na průměrnou intenzitu fluorescence kontroly.

Výsledky testování vlivu R na EROD a MROD aktivitu jsou uvedeny v tabulce 10, 11 a na obrázcích 14, 15.

Tab. 10: Vliv 48-hodinové expozice R na aktivitu EROD v buněčné linii HCT-8

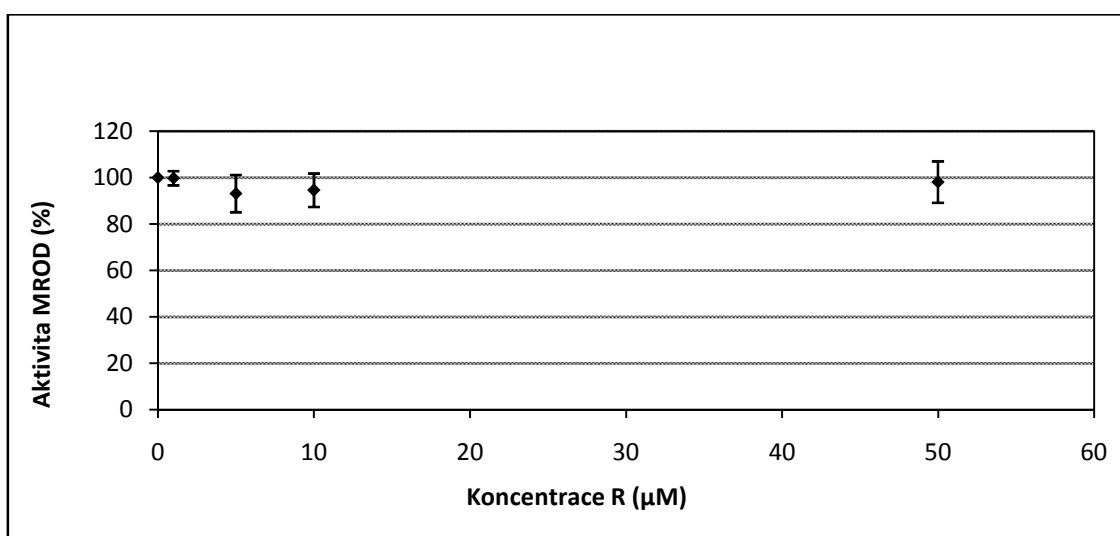
Aktivita EROD (%) \pm SD				
	1.experiment	2.experiment	3.experiment	průměr
K(DMSO)	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0\pm0,0
1μM R	103,4 \pm 7,5	97,4 \pm 7,2	97,3 \pm 6,5	99,4\pm7,0
5μM R	97,0 \pm 5,7	99,9 \pm 6,7	92,0 \pm 4,4	96,3\pm5,6
10μM R	90,1 \pm 10,6	99,4 \pm 6,1	96,7 \pm 13,7	95,4\pm10,1
50μM R	97,3 \pm 4,4	105,3 \pm 5,8	94,0 \pm 5,0	98,9\pm5,1



Obr. 14: Vliv 48-hodinové expozice R na aktivitu EROD v buněčné linii HCT-8

Tab. 11: Vliv 48-hodinové expozice R na aktivitu MROD v buněčné linii HCT-8

Aktivita MROD (%) ± SD				
	1.experiment	2.experiment	3.experiment	průměr
K(DMSO)	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
1μM R	101,7±4,6	97,6±4,7	86,5±17,6	99,8±3,1
5μM R	96,6±1,7	96,4±4,8	85,0±11,9	93,1±8,0
10μM R	100,1±4,1	98,6±5,6	84,6±16,1	94,6±7,2
50μM R	103,3±4,2	106,5±5,9	86,9±19,7	98,1±8,9



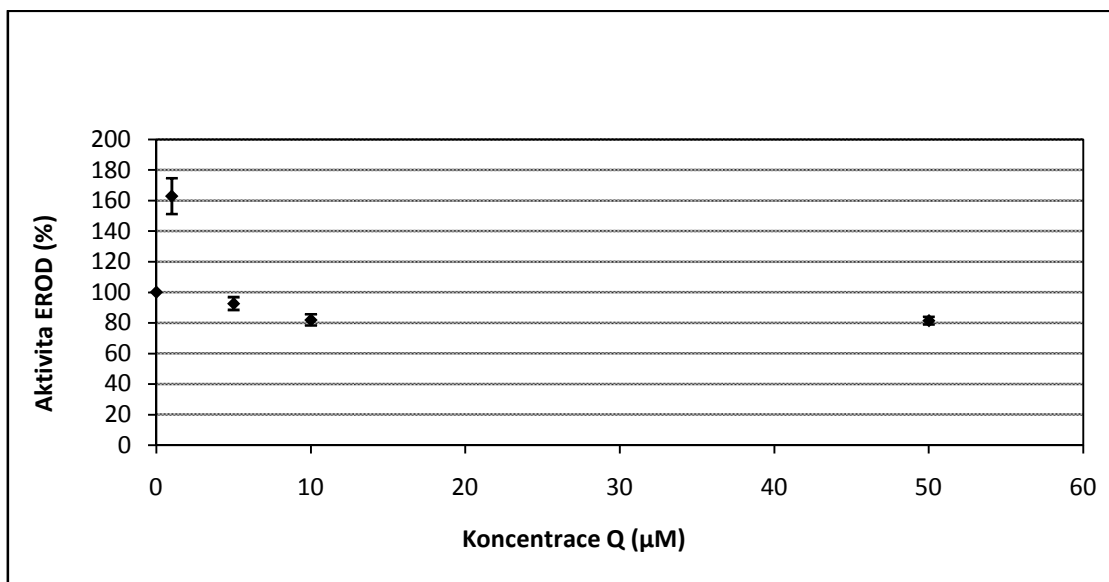
Obr. 15: Vliv 48-hodinové expozice R na aktivitu MROD v buněčné linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že R při 48-hodinové expozici neinhibuje aktivitu EROD i MROD.

Výsledky testování vlivu Q na EROD a MROD aktivitu jsou uvedeny v tabulce 12, 13 a na obrázcích 16, 17.

Tab. 12: Vliv 48-hodinové expozice Q na aktivitu EROD v buněčné linii HCT-8

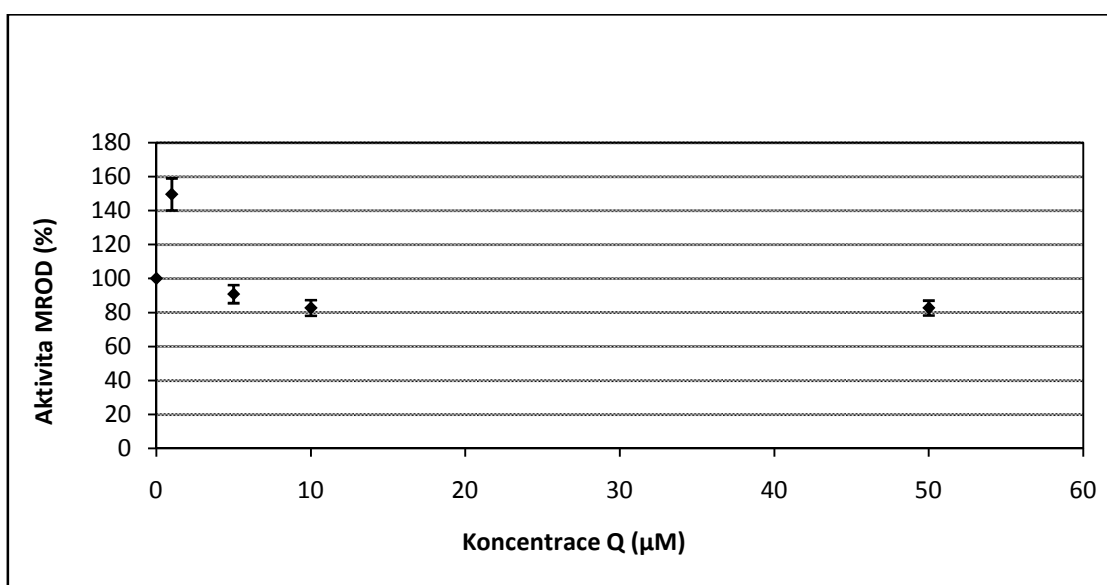
Aktivita EROD (%) ± SD				
	1.experiment	2.experiment	3.experiment	průměr
K(DMSO)	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
1μM Q	143,2±14,6	185,8±7,8	159,7±12,7	162,9±11,7
5μM Q	127,9±4,0	72,6±1,5	77,3±7,1	92,6±4,2
10μM Q	91,5±2,6	73,3±2,5	80,9±5,8	81,9±3,7
50μM Q	88,0±3,0	72,8±0,7	83,6±3,7	81,5±2,5



Obr. 16: Vliv 48-hodinové expozice Q na aktivitu EROD v buněčné linii HCT-8

Tab. 13: Vliv 48-hodinové expozice Q na aktivitu MROD v buněčné linii HCT-8

Aktivita MROD (%) ± SD				
	1.experiment	2.experiment	3.experiment	průměr
K(DMSO)	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
1μM Q	140,4±9,4	158,0±7,8	150,3±11,3	149,6±9,5
5μM Q	113,7±6,0	78,8±3,7	80,3±6,4	90,9±5,3
10μM Q	89,0±2,4	81,1±4,0	78,1±7,4	82,7±4,6
50μM Q	89,4±2,9	79,3±3,8	79,3±6,4	82,7±4,4



Obr. 17: Vliv Q na aktivitu MROD v buněčné linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že 48-hodinová expozice Q v koncentraci 1 μM signifikantně zvyšuje aktivitu EROD/MROD v buňkách HCT-8. Ve vyšších koncentracích Q je však aktivita EROD/MROD inhibována.

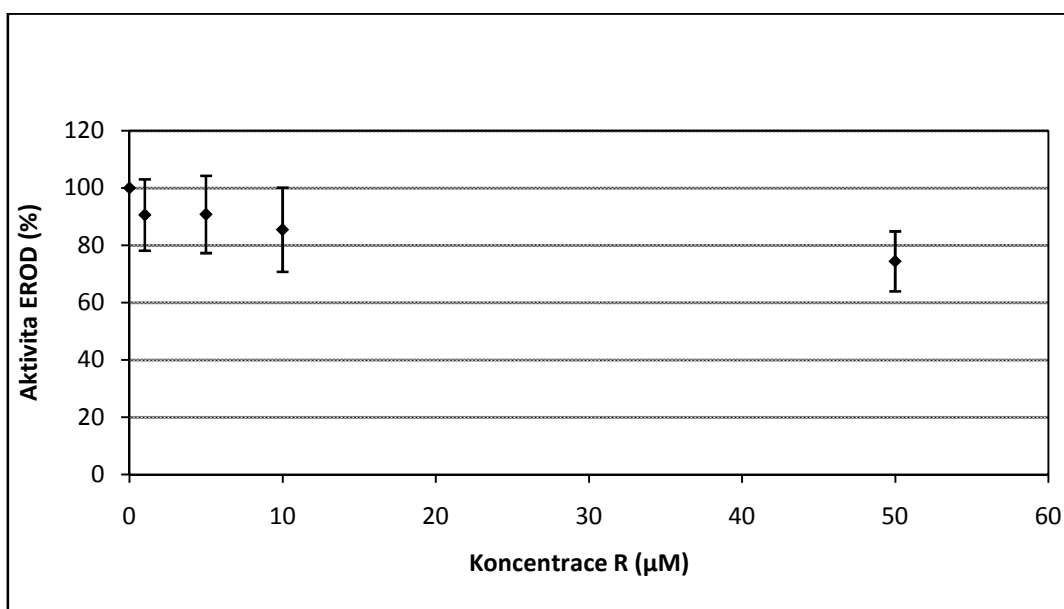
5.4 TESTOVÁNÍ VLIVU R a Q NA INDUKCI EROD/MROD β -NAFTOFLAVONEM

Aktivita EROD/MROD odpovídající aktivitě CYP1A byla měřena podle návodu popsaného v kapitole 4.2.3.2. Každý test byl proveden třikrát. Pozitivní kontrolou byly buňky exponované samotným 5 μ M β -NF. V ostatních vzorcích byly buňky exponované současně β -NF (5 μ M) a R nebo Q v různých koncentracích. Každá koncentrace Q nebo R byla testována ve dvanácti paralelních vzorcích. Výsledná intenzita fluorescence vzorků byla vztažena na průměrnou intenzitu fluorescence pozitivní kontroly.

Výsledky testování vlivu R na indukci EROD a MROD β -NF jsou uvedeny v tabulce 14, 15 a na obrázcích 18, 19.

Tab. 14: Vliv R na indukci EROD β -NF v buněčné linii HCT-8

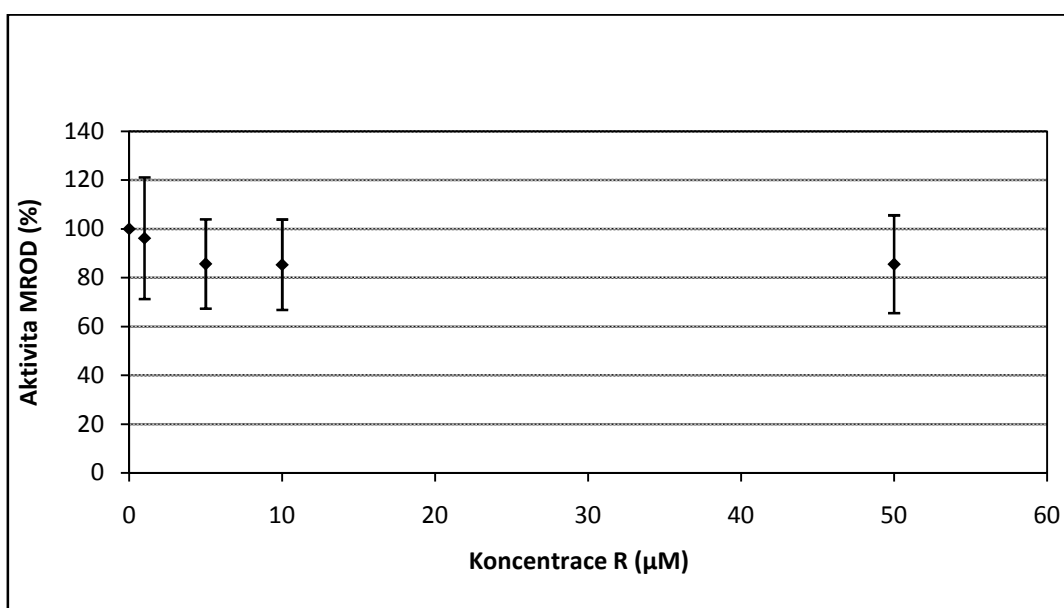
Aktivita EROD (%) \pm SD				
	1.experiment	2.experiment	3.experiment	průměr
5μM β-NF	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0\pm0,0
5μM β-NF+1μM R	97,0 \pm 9,0	75,5 \pm 15,1	99,4 \pm 13,2	90,6\pm12,4
5μM β-NF+5μM R	99,4 \pm 14,0	70,5 \pm 16,2	102,5 \pm 10,3	90,8\pm13,5
5μM β-NF+10μM R	83,9 \pm 10,1	70,9 \pm 16,4	101,5 \pm 17,5	85,4\pm14,7
5μM β-NF+50μM R	68,6 \pm 5,5	71,6 \pm 15,2	83,1 \pm 10,8	74,4\pm10,5



Obr. 18: Vliv R na indukci EROD β -NF v buněčné linii HCT-8

Tab. 15: Vliv R na indukci MROD β -NF v buněčné linii HCT-8

Aktivita MROD (%) \pm SD				
	1.experiment	2.experiment	3.experiment	průměr
5μM β-NF	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0\pm0,0
5μM β-NF+1μM R	92,1 \pm 25,6	100,8 \pm 30,0	95,7 \pm 19,2	96,2\pm24,9
5μM β-NF+5μM R	97,0 \pm 22,9	64,6 \pm 15,0	95,3 \pm 17,1	85,6\pm18,3
5μM β-NF+10μM R	89,9 \pm 18,1	65,1 \pm 16,8	100,8 \pm 20,7	85,3\pm18,5
5μM β-NF+50μM R	72,9 \pm 10,2	88,1 \pm 27,0	95,4 \pm 22,8	85,5\pm20,0



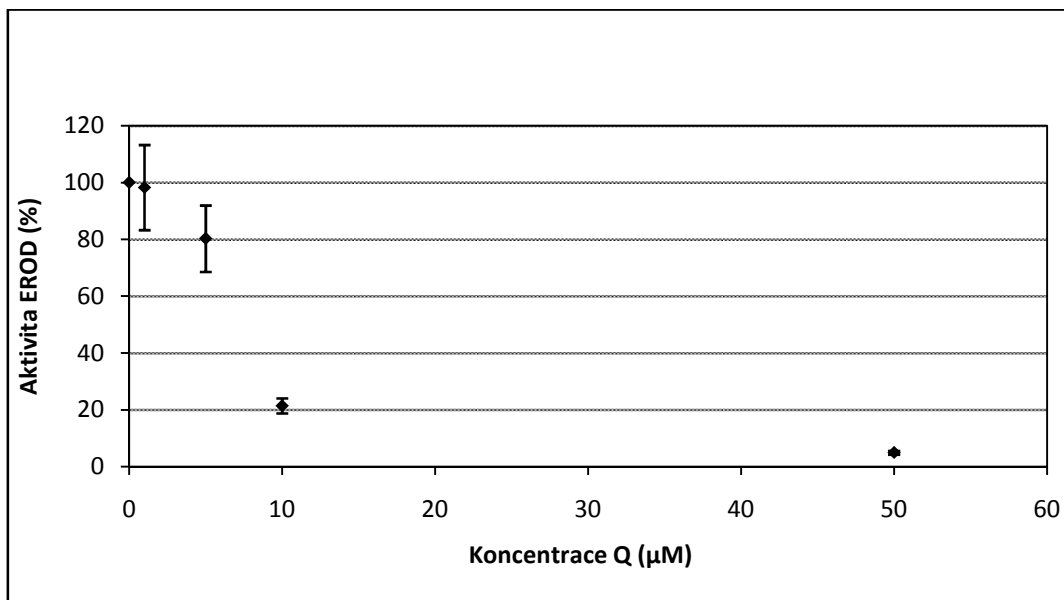
Obr. 29: Vliv R na indukci MROD β -NF v buněčné linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že R mírně snižuje indukci EROD/MROD β -NF.

Výsledky testování vlivu Q na EROD a MROD aktivitu jsou uvedeny v tabulce 16, 17 a na obrázcích 20, 21.

Tab. 16: Vliv Q na indukci EROD β -NF v buněčné linii HCT-8

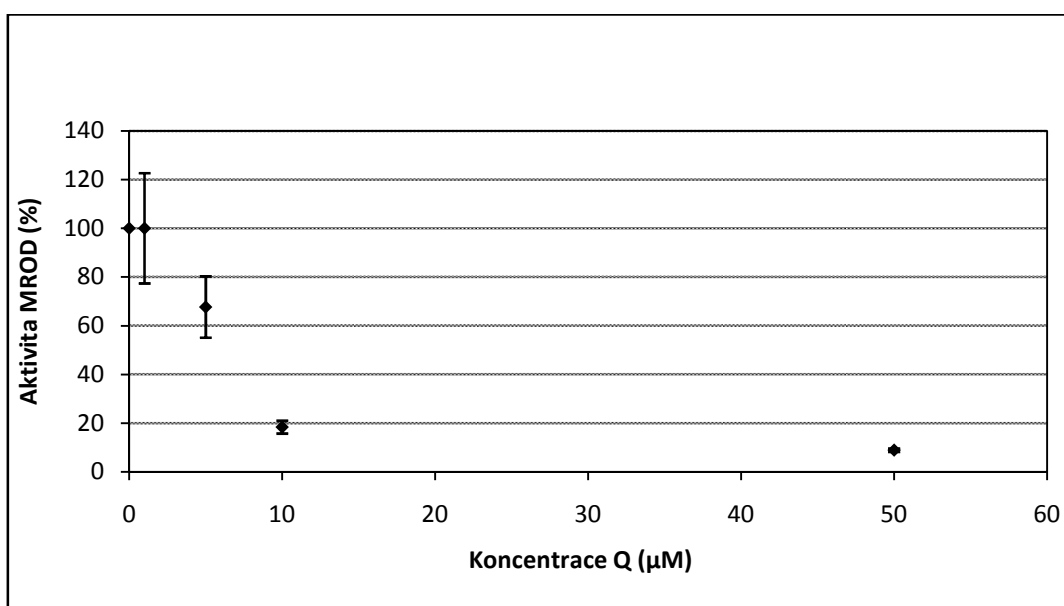
Aktivita EROD (%) \pm SD				
	1.experiment	2.experiment	3.experiment	průměr
5 μ M β -NF	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0\pm0,0
5 μ M β -NF+1 μ M Q	108,7 \pm 12,3	94,6 \pm 20,6	91,5 \pm 12,1	98,3\pm15,0
5 μ M β -NF+5 μ M Q	60,3 \pm 5,2	90,3 \pm 14,8	90,1 \pm 15,2	80,3\pm11,7
5 μ M β -NF+10 μ M Q	18,6 \pm 1,3	18,5 \pm 1,6	27,1 \pm 5,1	21,4\pm2,6
5 μ M β -NF+50 μ M Q	5,9 \pm 0,7	5,2 \pm 0,8	3,8 \pm 0,5	5,0\pm0,6



Obr. 20: Vliv Q na indukci EROD β -NF v buněčné linii HCT-8

Tab. 17: Vliv Q na indukci MROD β -NF v buněčné linii HCT-8

Aktivita MROD (%) \pm SD				
	1.experiment	2.experiment	3.experiment	průměr
5μM β-NF	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0\pm0,0
5μM β-NF+1μM Q	94,5 \pm 36,4	104,3 \pm 23,3	101,2 \pm 7,1	100,0\pm22,6
5μM β-NF+5μM Q	44,2 \pm 6,1	85,3 \pm 12,1	73,5 \pm 19,6	67,7\pm12,6
5μM β-NF+10μM Q	20,3 \pm 1,1	23,9 \pm 2,8	10,7 \pm 3,9	18,3\pm2,6
5μM β-NF+50μM Q	15,9 \pm 0,6	6,6 \pm 0,8	4,1 \pm 0,5	8,9\pm0,7



Obr.21: Vliv Q na indukci MROD β -NF v buněčné linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že Q výrazně snižuje indukci EROD/MROD β -NF a to již v koncentraci 5 μ M.

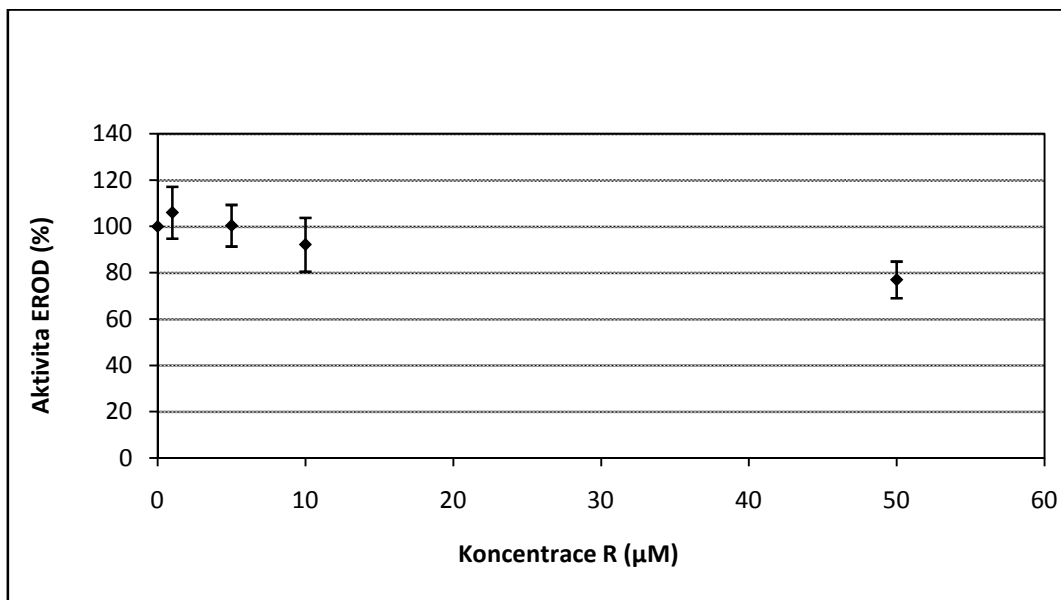
5.5 TESTOVÁNÍ VLIVU Q a R NA EROD/MROD AKTIVITU CYP 1A INDUKOVANÉHO β -NAFTOFLAVONEM

Aktivita EROD/MROD odpovídající aktivitě CYP1A byla měřena podle návodu popsaného v kapitole 4.2.3.3. Každý test byl proveden třikrát. Buňky byly 48 hodin exponovány 5 μ M β -NF. Q nebo R (v různých koncentracích) byl přidán k buňkám až těsně před skončením expozice, tj. bezprostředně před zahájením měření aktivity EROD/MROD. Každá koncentrace Q nebo R byla testována ve dvanácti paralelních vzorcích. Výsledná intenzita fluorescence vzorků byla vztažena na průměrnou intenzitu fluorescence 5 μ M β -NF.

Výsledky testování vlivu R na EROD/MROD aktivitu CYP 1A indukovaného β -NF jsou uvedeny v tabulce 18, 19 a na obrázcích 22, 23.

Tab. 18: Vliv R na EROD aktivitu CYP 1A indukovaného β -NF v buněčné linii HCT-8

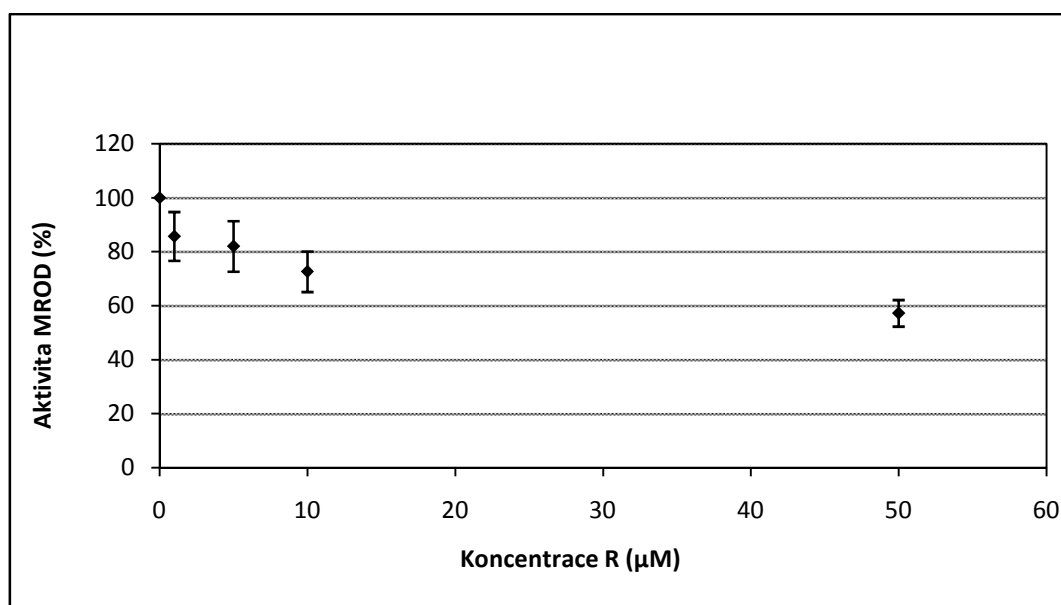
Aktivita EROD (%) \pm SD				
	1.experiment	2.experiment	3.experiment	průměr
5μM β-NF	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0\pm0,0
5μM β-NF+1μM R	111,7 \pm 10,2	102,5 \pm 10,8	103,8 \pm 12,6	106,0\pm11,2
5μM β-NF+5μM R	101,2 \pm 4,4	106,8 \pm 9,7	93,3 \pm 12,9	100,4\pm9,0
5μM β-NF+10μM R	93,6 \pm 16,4	94,0 \pm 8,2	88,8 \pm 10,4	92,1\pm11,7
5μM β-NF+50μM R	62,3 \pm 7,1	93,9 \pm 9,9	74,7 \pm 6,8	77,0\pm7,9



Obr. 22: Vliv R na EROD aktivitu CYP 1A indukovaného β -NF v buněčné linii HCT-8

Tab. 19: Vliv R na MROD aktivitu CYP 1A indukovaného β -NF v buněčné linii HCT-8

Aktivita MROD (%) \pm SD				
	1.experiment	2.experiment	3.experiment	průměr
5μM β-NF	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0\pm0,0
5μM β-NF+1μM R	89,2 \pm 6,4	84,4 \pm 6,8	83,6 \pm 13,9	85,8\pm9,0
5μM β-NF+5μM R	97,9 \pm 16,7	73,3 \pm 3,1	74,9 \pm 8,4	82,0\pm9,4
5μM β-NF+10μM R	80,6 \pm 7,9	67,6 \pm 5,8	69,8 \pm 8,8	72,7\pm7,5
5μM β-NF+50μM R	56,5 \pm 6,4	60,1 \pm 2,4	55,2 \pm 6,0	57,3\pm4,9



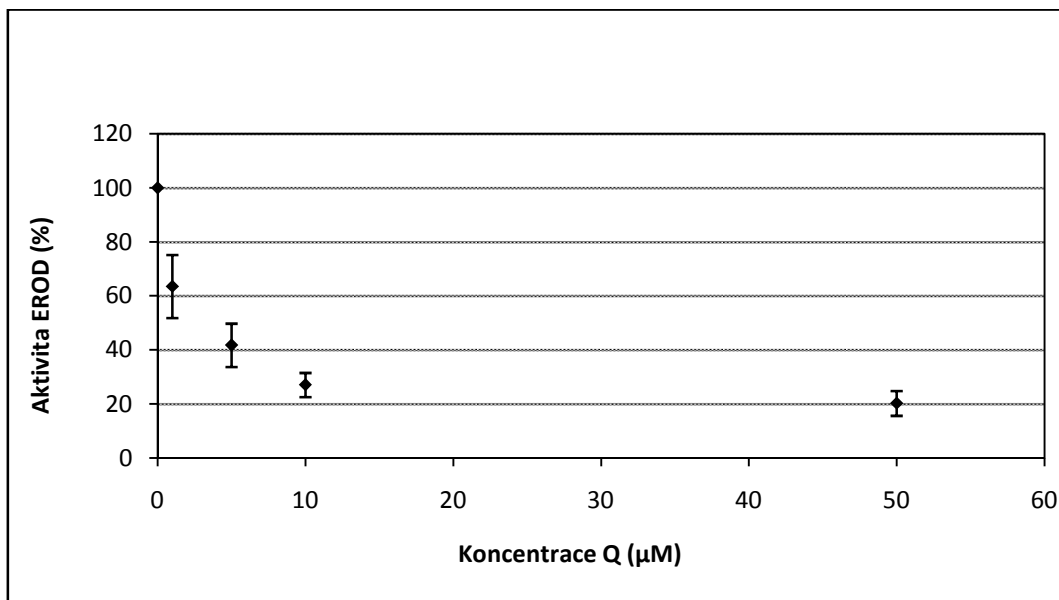
Obr. 23: Vliv R na MROD aktivitu CYP 1A indukovaného β -NF v buněčné linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že R inhibuje aktivitu CYP 1A indukovaného β -NF.

Výsledky testování vlivu Q na EROD a MROD aktivitu CYP 1A indukovaného β -NF jsou uvedeny v tabulce 20, 21 a na obrázcích 24, 25.

Tab. 20: Vliv Q na EROD aktivitu CYP 1A indukovaného β -NF v buněčné linii HCT-8

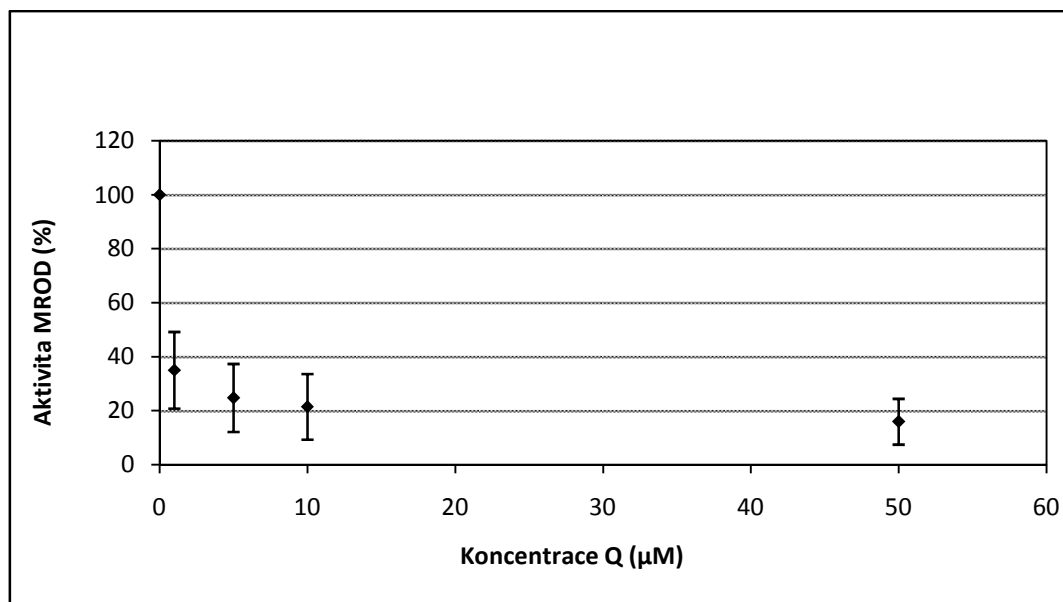
Aktivita EROD (%) \pm SD				
	1.experiment	2.experiment	3.experiment	průměr
5 μ M β -NF	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0\pm0,0
5 μ M β -NF+1 μ M Q	71,2 \pm 8,2	61,1 \pm 9,8	58,3 \pm 17,0	63,5\pm11,7
5 μ M β -NF+5 μ M Q	61,3 \pm 11,1	41,4 \pm 4,9	22,5 \pm 8,1	41,7\pm8,0
5 μ M β -NF+10 μ M Q	37,4 \pm 4,0	31,4 \pm 5,2	12,4 \pm 4,2	27,0\pm4,5
5 μ M β -NF+50 μ M Q	37,7 \pm 6,9	10,6 \pm 1,5	12,4 \pm 5,4	20,2\pm4,6



Obr. 24: Vliv Q na EROD aktivitu CYP 1A indukovaného β -NF v buněčné linii HCT-8

Tab. 21: Vliv Q na MROD aktivitu CYP 1A indukovaného β -NF v buněčné linii HCT-8

Aktivita MROD (%) \pm SD				
	1.experiment	2.experiment	3.experiment	průměr
5 μ M β -NF	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0\pm0,0
5 μ M β -NF+1 μ M Q	27,5 \pm 4,7	38,0 \pm 8,0	39,6 \pm 29,9	35,1\pm14,2
5 μ M β -NF+5 μ M Q	19,8 \pm 2,4	23,7 \pm 2,7	30,9 \pm 32,7	24,8\pm12,6
5 μ M β -NF+10 μ M Q	15,7 \pm 2,3	20,6 \pm 2,6	28,2 \pm 31,6	21,5\pm12,2
5 μ M β -NF+50 μ M Q	11,6 \pm 1,7	15,4 \pm 1,9	21,1 \pm 21,9	16,0\pm8,5



Obr. 25: Vliv Q na MROD aktivitu CYP 1A indukovaného β -NF v buněčné linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že Q inhibuje aktivitu β -NF indukovaného CYP 1A. Výrazná inhibice je patrná již při nejnižší koncentraci 5 μ M.

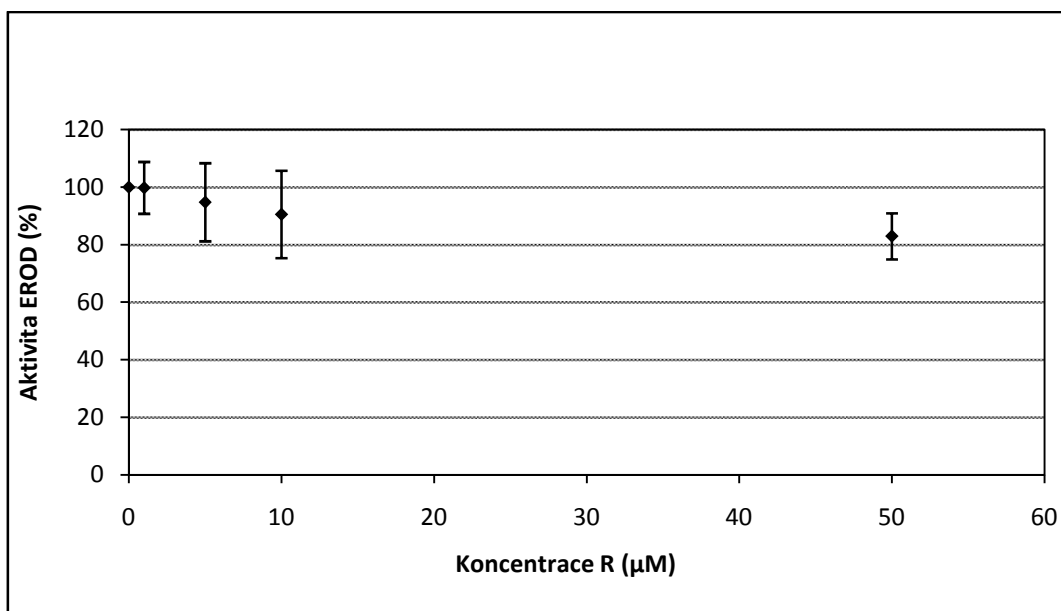
5.6 TESTOVÁNÍ Vlivu R a Q NA INDUKCI EROD/MROD METYLCHOLANTRENEM

Aktivita EROD/MROD odpovídající aktivitě CYP1A byla měřena podle návodu popsaného v kapitole 4.2.3.2. Test byl proveden pouze jednou. Pozitivní kontrola obsahovala samotný 5 μ M MCH. Ve vzorcích byl s MCH (5 μ M) současně přidán Q nebo R v různých koncentracích. Každá koncentrace Q nebo R byla testována ve dvanácti paralelních vzorcích. Výsledná intenzita fluorescence vzorků byla vztažena na průměrnou intenzitu fluorescence pozitivní kontroly.

Výsledky testování vlivu R na EROD/MROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH jsou uvedeny v tabulce 22, 23 a na obrázcích 26, 27.

Tab. 22: Vliv R na EROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH v buněčné linii HCT-8

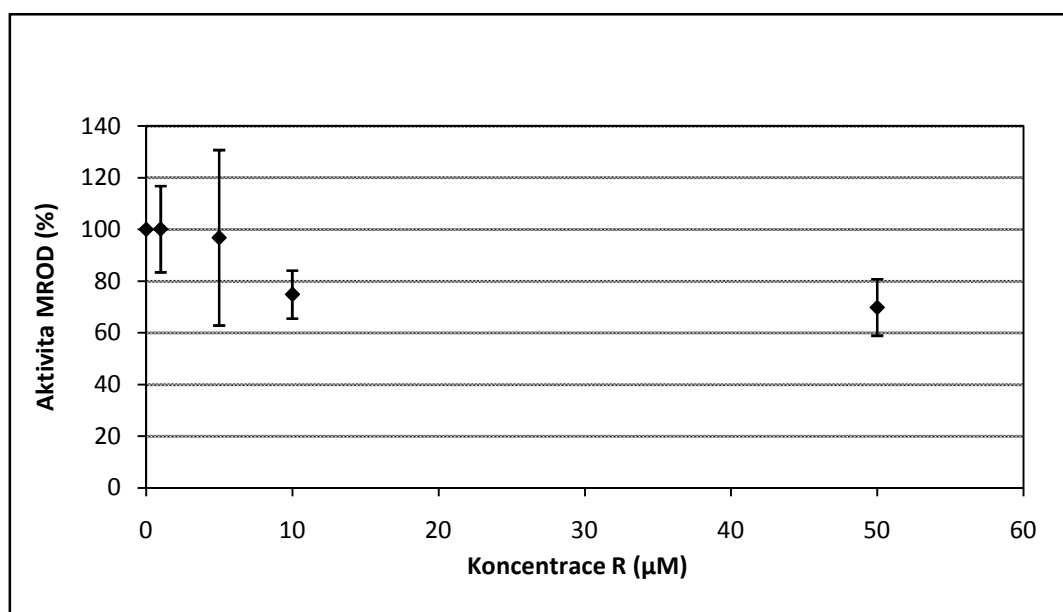
Aktivita EROD (%) \pm SD	
5 μ M MCH	100,0 \pm 0,0
5 μ M MCH+1 μ M R	99,8 \pm 9,0
5 μ M MCH+5 μ M R	94,8 \pm 13,6
5 μ M MCH+10 μ M R	90,5 \pm 15,2
5 μ M MCH+50 μ M R	82,9 \pm 8,0



Obr. 26: Vliv R na EROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH v buněčné linii HCT-8

Tab. 23: Vliv R na MROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH v buněčné linii HCT-8

Aktivita MROD (%) \pm SD	
5 μ M MCH	100,0 \pm 0,0
5 μ M MCH+1 μ M R	100,1 \pm 16,7
5 μ M MCH+5 μ M R	96,8 \pm 33,9
5 μ M MCH+10 μ M R	74,8 \pm 9,3
5 μ M MCH+50 μ M R	69,8 \pm 10,9



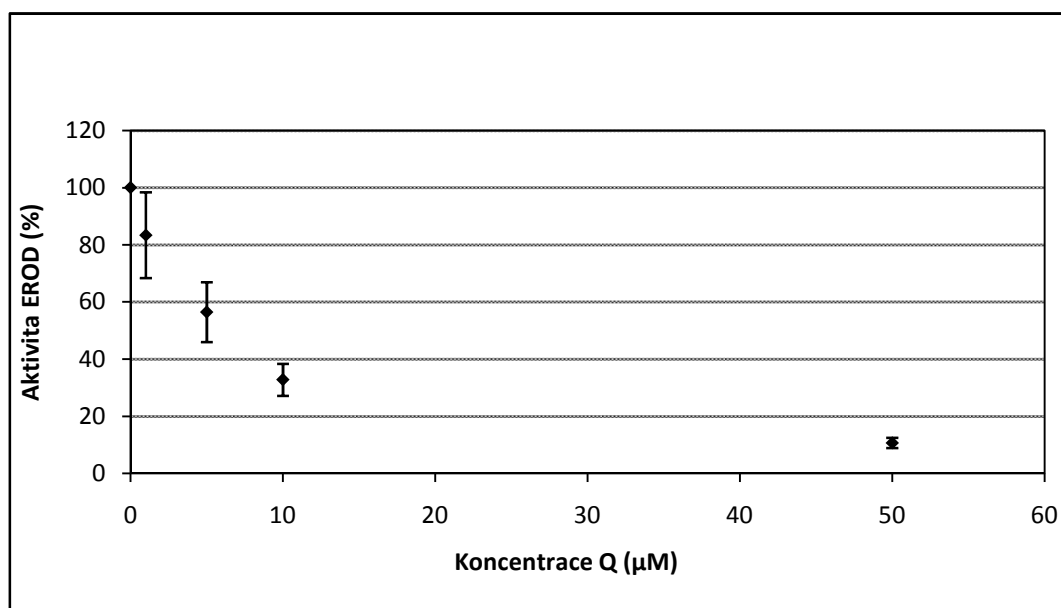
Obr. 27: Vliv R na MROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH v buněčné linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že R snižuje indukci EROD/MROD MCH.

Výsledky testování vlivu Q na EROD/MROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH jsou uvedeny v tabulce 24, 25 a na obrázcích 28, 29.

Tab. 24: Vliv Q na EROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH v buněčné linii HCT-8

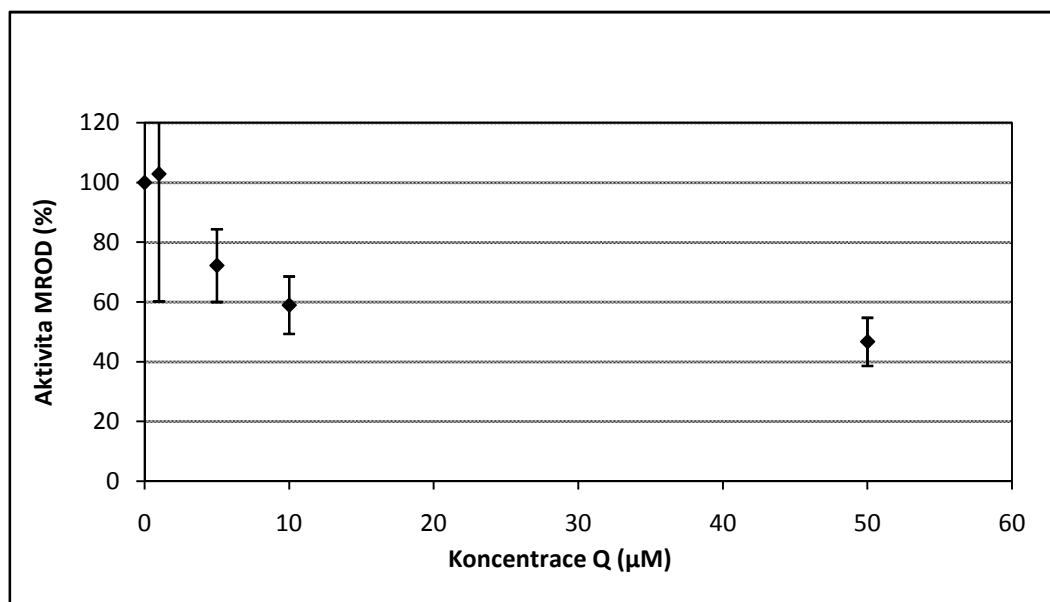
Aktivita EROD (%) \pm SD	
5 μ M MCH	100,0 \pm 0,0
5 μ M MCH+1 μ M Q	83,4 \pm 15,0
5 μ M MCH+5 μ M Q	56,5 \pm 10,5
5 μ M MCH+10 μ M Q	32,8 \pm 5,6
5 μ M MCH+50 μ M Q	10,7 \pm 1,8



Obr. 28: Vliv Q na EROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH v buněčné linii HCT-8

Tab. 25: Vliv Q na MROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH v buněčné linii HCT-8

Aktivita MROD (%) ± SD	
5μM MCH	100,0±0,0
5μM MCH+1μM Q	102,9±42,6
5μM MCH+5μM Q	72,2±12,2
5μM MCH+10μM Q	59,0±9,6
5μM MCH+50μM Q	46,7±8,1



Obr. 29: Vliv Q na MROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH v buněčné linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že Q snižuje indukci CYP 1A MCH. Výrazné snížení indukované EROD aktivity je patrné již při nejnižší koncentraci Q 5 μM, u MROD při koncentraci Q 10 μM.

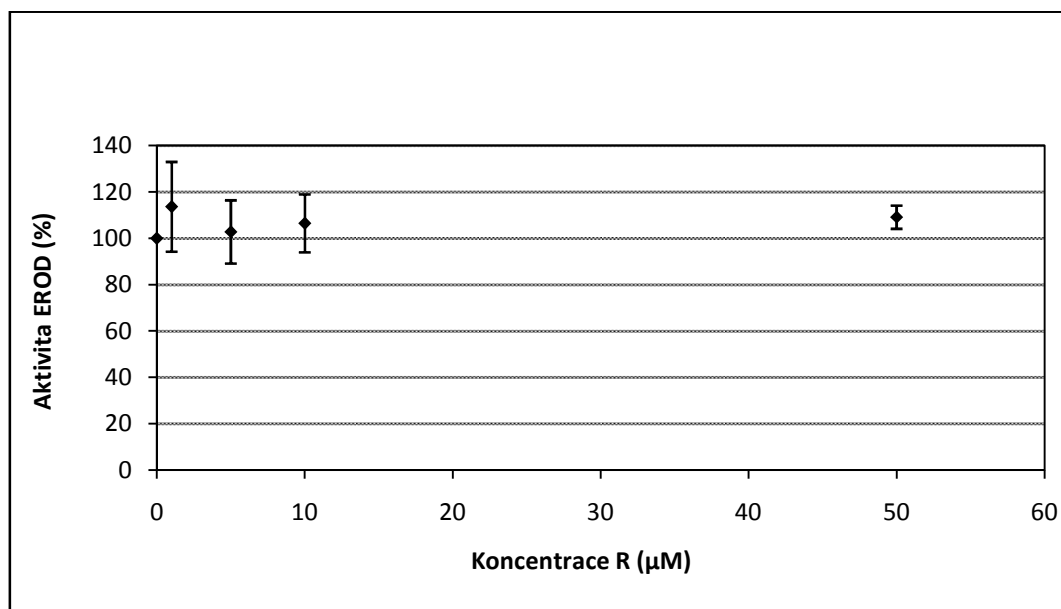
5.7 TESTOVÁNÍ Vlivu Q A R NA EROD/MROD AKTIVITU CYP 1A INDIKOVANÉHO METYLCHOLANTRENEM

Aktivita EROD/MROD odpovídající aktivitě CYP1A byla měřena podle návodu popsaného v kapitole 4.2.3.3. Test byl proveden pouze jednou. Buňky byly 48 hodin exponovány 5 μ M MCH. Q nebo R (v různých koncentracích) byl přidán k buňkám až těsně před skončením expozice, tj. bezprostředně před zahájením měření aktivity EROD/MROD. Každá koncentrace Q nebo R byla testována ve dvanácti paralelních vzorcích. Výsledná intenzita fluorescence vzorků byla vztažena na průměrnou intenzitu fluorescence samotného 5 μ M MCH.

Výsledky testování vlivu R na EROD/MROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH jsou uvedeny v tabulce 26, 27 a na obrázcích 30, 31.

Tab. 26: Vliv R na EROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH v buněčné linii HCT-8

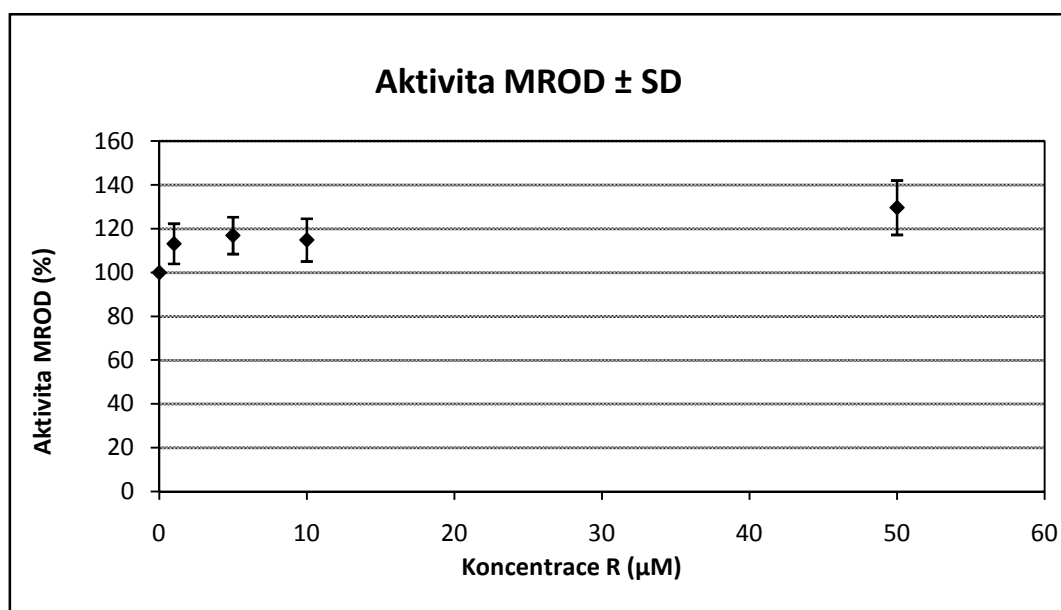
Aktivita EROD (%) \pm SD	
5 μ M MCH	100,0 \pm 0,0
5 μ M MCH+1 μ M R	113,7 \pm 19,4
5 μ M MCH+5 μ M R	102,8 \pm 13,6
5 μ M MCH+10 μ M R	106,5 \pm 12,5
5 μ M MCH+50 μ M R	109,2 \pm 5,0



Obr. 30: Vliv R na EROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH v buněčné linii HCT-8

Tab. 27: Vliv R na MROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH v buněčné linii HCT-8

Aktivita MROD (%) ± SD	
5μM MCH	100,0±0,0
5μM MCH+1μM R	113,2±9,2
5μM MCH+5μM R	116,9±8,5
5μM MCH+10μM R	114,9±9,8
5μM MCH+50μM R	129,7±12,4



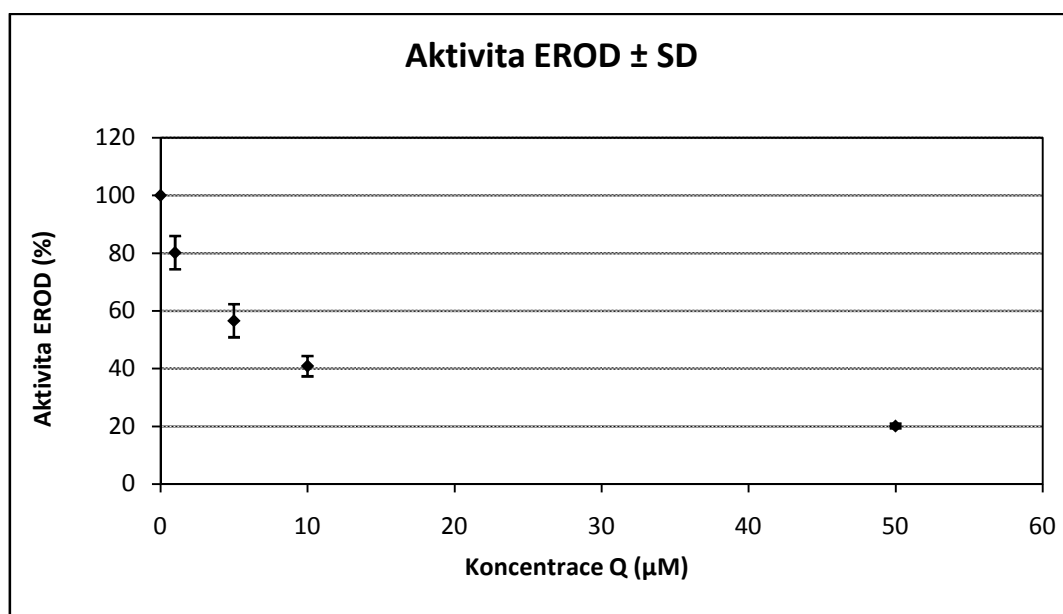
Obr. 31: Vliv R na MROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH v buněčné linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že R indukuje aktivitu CYP 1A indukovaného MCH.

Výsledky testování vlivu Q na EROD/MROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH jsou uvedeny v tabulce 28, 29 a na obrázcích 32, 33.

Tab. 28: Vliv Q na EROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH v buněčné linii HCT-8

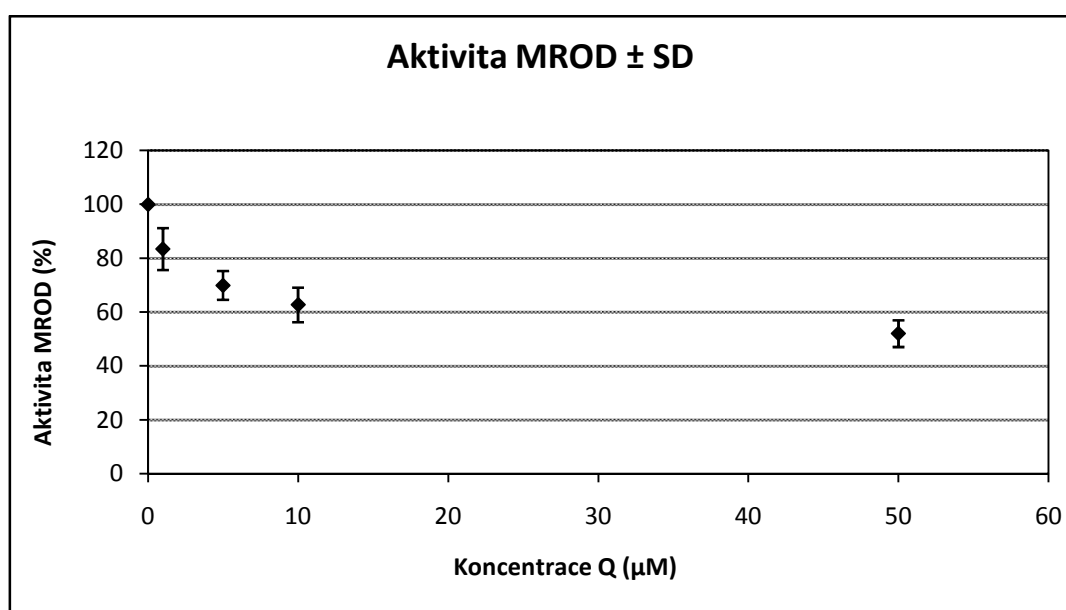
Aktivita EROD (%) \pm SD	
5 μ M MCH	100,0 \pm 0,0
5 μ M MCH+1 μ M Q	80,2 \pm 5,8
5 μ M MCH+5 μ M Q	56,6 \pm 5,7
5 μ M MCH+10 μ M Q	40,9 \pm 3,5
5 μ M MCH+50 μ M Q	20,1 \pm 0,8



Obr. 32: Vliv Q na EROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH v buněčné linii HCT- 8

Tab. 29: Vliv Q na MROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH v buněčné linii HCT-8

Aktivita MROD(%) ± SD	
5μM MCH	100,0±0,0
5μM MCH+1μM Q	83,4±7,8
5μM MCH+5μM Q	70,0±5,4
5μM MCH+10μM Q	62,8±6,4
5μM MCH+50μM Q	52,1±5,0

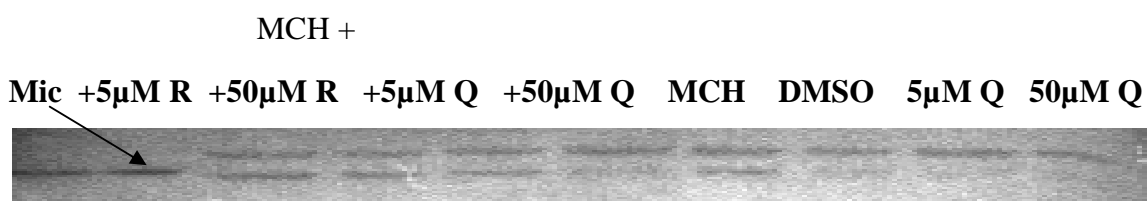


Obr. 33: Vliv Q na MROD aktivitu CYP 1A indukovaného MCH v buněčné linii HCT-8

Z výsledků vyplývá, že Q inhibuje aktivitu EROD/MROD CYP 1A indukovaného MCH.

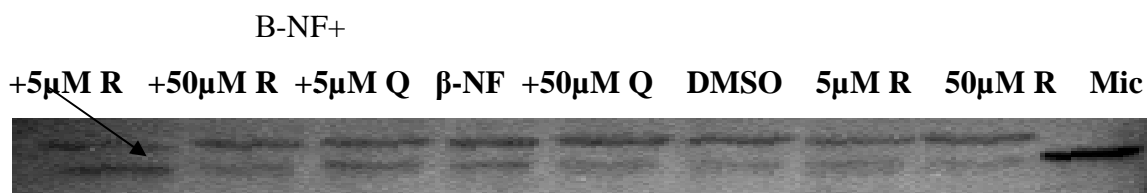
5.8 TESTOVÁNÍ VLIVU Q A R NA EXPRESI CYP 1A METODOU WESTERN BLOTTINGU

Test byl proveden podle návodu popsaného v kapitole 4.2.5. Intenzita jednotlivých proužků odpovídá množství vytvořeného proteinu CYP1A1/2. Denzitometrické hodnocení na přístroji Gel.doc se však nepodařilo, intenzita proužků proto byla hodnocena pouze vizuálně. Výsledky testování jsou uvedeny na obrázcích 34, 35 protein CYP 1A představuje spodní řadu proužků.



Obr. 34: Výsledky Western blottingu s protilátkou proti CYP1A1/2.

Z obrázku je patrné zvýšené množství proteinu CYP 1A ve vzorku s MCH, modelovým induktorem CYP 1A. R tuto indukci neovlivňuje, zatímco Q indukční účinek MCH na CYP1A významně omezuje. V kontrolním vzorku obsahujícím pouze DMSO nebyla zjištěna téměř žádná koncentrace proteinu CYP 1A, stejně tak i ve vzorcích exponovaných pouze Q.



Obr. 35: Výsledky Western blottingu s protilátkou proti CYP1A1/2.

Z obrázku je patrné zvýšené množství proteinu CYP 1A ve vzorku s β -NF, dalším modelovým induktorem CYP 1A. 5 μ M R i Q indukční účinek β -NF na CYP1A potencují, ve vyšší koncentraci ho naopak inhibují. Ve vzorku obsahujícím DMSO nebyla zjištěna téměř žádná koncentrace proteinu CYP 1A, stejně tak i ve vzorcích exponovaných pouze R.

6 DISKUSE

Nadměrný výskyt rakoviny střeva a dalších části gastrointestinálního traktu je v zemích západní Evropy zapříčiněn především nevhodnou stravou. Většina prokarcinogenů se do těla dostává potravou a klíčovým krokem vedoucím k vytvoření aktivních karcinogenů je metabolická aktivace, zprostředkovaná enzymy metabolizující xenobiotika. Mezi látky s genotoxinovým potenciálem patří i heterocyklické aminy a nitrosaminy, které vznikají při smažení a grilování masa. V tenkém střevě jsou tyto látky metabolizovány cytochromy P450 (CYP) N - hydroxylací na aktivní N - OH aminové metabolity [47], které se po následné esterifikaci kovalentně váží k DNA [40] a tím způsobují mutagenní efekt. Množství genotoxinů v potravě, tekutinách a vzduchu není zanedbatelné a vyhnout se jejich působení je prakticky nemožné. Bylo by proto vhodné, kdyby jejich škodlivý vliv byl eliminován, pokud možno co nejdříve po jejich příjmu. První tkání, kudy prostupují do těla, je tenké střevo. Inhibicí enzymů podílejících se na metabolizaci heterocyklických aminů a nitrosaminů, by mohlo dojít ke snížení jejich metabolické aktivace a tím ke snížení jejich toxického působení.

Tato práce se zabývala modulačními účinky flavonoidů rutinu a quercetinu právě na xenobiotika metabolizující enzymy v tenkém střevě, konkrétněji na CYP1A. Potenciálně antikarcinogenní účinky jsou u flavonoidů nejvíce spojovány s jejich antioxidační aktivitou. Flavonoidy přijímané potravou se však velmi špatně absorbují z gastrointestinálního traktu, a tak prakticky pouze ve střevě je jejich koncentrace dostatečná pro možné uplatnění jejich vlivů.

Pro naši studii byl vybrán rutin a quercetin, které patří mezi nejběžněji se vyskytující flavonoidy a jejichž koncentrace v potravě jsou poměrně vysoké. Prvním úkolem bylo zjistit, zda rutin a quercetin ovlivňují životnost buněčné linie HCT-8. Oba flavonoidy jsou nerozpustné ve vodě, a tak bylo nutné použít jako rozpouštědlo DMSO, který však podle předchozích studií, prováděných na katedře biochemie Farmaceutické fakulty Karlovy univerzity, je pro buňky v koncentraci nad 1 % (v/v) toxický [36]. Proto koncentrace DMSO používaná v této práci byla poloviční – tedy 0,5 % (v/v). Pro stanovení cytotoxicity byla využita metoda barvení neutrální červení. Rutin vykazoval signifikantní úbytek živých buněk až při použití koncentrace 500 μM a to jen asi o 16 %. Quercetin signifikantně zvyšoval úmrtnost buněk (o 20 %) již v koncentraci 50 μM . Při použití vyšších koncentrací quercetinu se životnost výrazně snižovala a 500 μM quercetin usmrtil již více než 50 % buněk. Při dalších experimentech

prováděných na buněčné linii HCT-8, byly tedy maximální používané koncentrace obou flavonoidů 50 μM .

Při testech, kdy zdraví dobrovolníci polykali 28 dní jednu kapsli obsahující 1 g quercetinu denně, dosahovala plazmatická koncentrace pouze 1,5 μM , a tak dosažení toxické koncentrace v plazmě není prakticky možné. Při testech prováděných s rutinem jsou plazmatické koncentrace ještě nižší (0,3 μM) [29], tedy ani při vysokém příjmu rutinu potravou nehrozí riziko toxického působení na buňky.

Práce byla zaměřena na nadrodinu CYP1A, kam patří isoformy CYP1A1 a CYP1A2. CYP 1A2 je ale exprimován téměř výlučně v játrech, proto se potenciální vliv flavonoidů ve střevních buňkách může vztahovat pouze na CYP1A1, který se v buňkách tenkého střeva běžně vyskytuje. K měření enzymové aktivity CYP1A v buněčné linii HCT-8 bylo zvoleno stanovení jeho 7-ethoxyresorufin-O-deethylasové (EROD) a 7-methoxyresorufin-O-demethylasové (MROD) aktivity.

CYP1A je aktivován přes ligandově závislý transkripční faktor - AhR. Podle některých literárních pramenů působí quercetin jako AhR antagonist, vážící se na receptor bez aktivace transkripčního faktoru při nižších koncentracích (do 1,5 μM), což je však současně i maximální koncentrace, které může quercetin v plazmě dosáhnout. V koncentraci 100 μM působil již quercetin jako AhR agonista aktivující transkripci řízenou AhR, ale tento efekt se v lidském těle nemůže uplatnit [29, 37]. Většina dostupných studií označuje quercetin jako inhibitor cytochromu P4501A1 vážící se přímo na molekulu enzymu. V testu, jenž byl prováděn na intaktních endotheliálních buňkách inkubovaných se 100 μM quercetinem, vykazoval quercetin významnou inhibici EROD aktivity ($\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{M}$) [6]. Quercetin také v koncentraci do 20 μM inhiboval aktivitu CYP1A1 u buněčné linie 101L [48]. Při *in vivo* pokusu prováděném na potkanech byl quercetin v koncentraci 0,3 % (w/w) přimícháván do potravy po dobu dvou týdnů. 24 hodin po posledním podání byla zvířata zabita, byly připraveny cytosolické frakce z jater a u těch byla měřena EROD aktivita. Vzátaženo ke kontrolním potkanům, dosahovala EROD aktivita mikrosomů potkanů krmených quercetinem 86 % [49]. Quercetin *in vivo* tedy působil jako inhibitor CYP1A2 v játrech potkana.

Ačkoliv většina studií indikuje quercetin jako inhibitor cytochromu P4501A, byly provedeny i studie s opačnými výsledky. V buněčné linii MCF-7 quercetin způsoboval koncentračně a časově závislé zvýšení aktivity EROD. Zvýšení EROD aktivity bylo maximální po 48 hodinové inkubaci, ale i za 72 hodin bylo zvýšení signifikantní oproti kontrole [38, 50]. Při pokusu prováděném na potkanech krmených

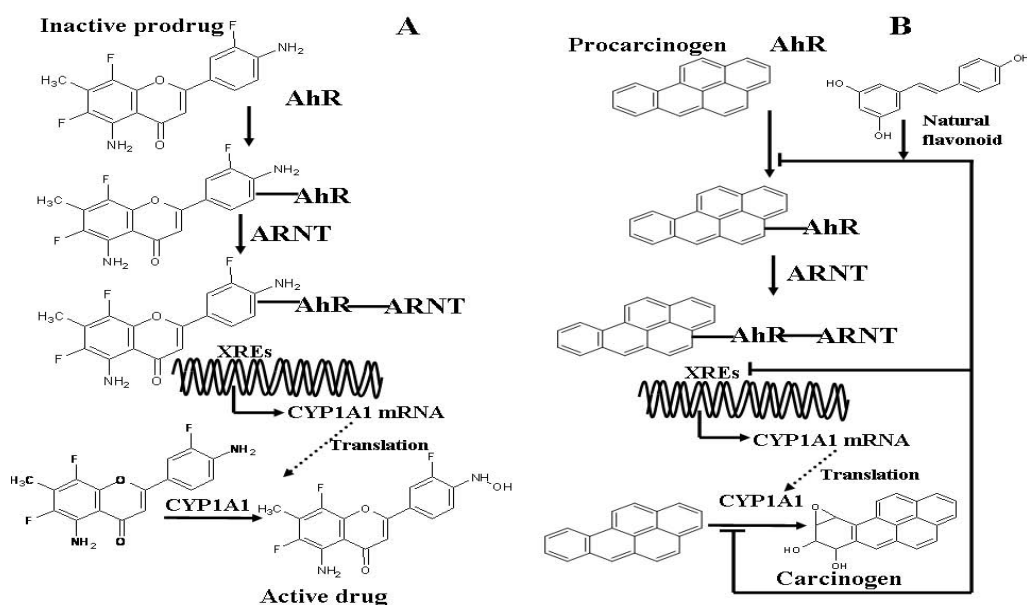
cibulovým práškem po dobu 9 dnů došlo k indukci CYP1A. Při identifikaci sloučenin obsažených v prášku, tvořil samotný quercetin pouze malou část, a tak nemohl být zahrnut do indukčního efektu látek obsažených v cibuli [28].

Na inhibiční/indukční efekt flavonoidů na CYP1A má rozhodující vliv nejen chemická struktura flavonoidu, ale i použitá koncentrace a experimentální podmínky. Aktivní místo CYP1A1 preferuje vázání 7 - hydroxylovaných flavonů [1]. Quercetin je příklad, kdy přídatná 3 - hydroxylová skupina snižuje inhibiční efekt ve srovnání s korespondujícím flavonem luteolinem. Výsledky ukazují, že hydroxylová skupina v pozici 5 a 7 na A kruhu a hydroxylace a methoxylace na 4'pozici B kruhu jsou nezbytné pro inhibici benzo[a]pyrenem indukované toxicity, ale hydroxylová skupina v poloze 3 A kruhu nezbytná není. Dalším faktorem pro vykázání inhibičního efektu je výskyt dvojné vazby 2,3 [51]. Flavonoidy s dvojnou vazbou na C₂ - C₃ byly více efektivní než příslušné redukované homology [52]. Přítomnost dvojné vazby totiž uděluje koplanární formaci fenylovému kruhu (B) vůči benzopyranovému kruhu. Planární flavonoidní molekula preferenčně interaguje s CYP1A1 a 1A2 [53]. Počet hydroxylových skupin na B kruhu 5,7 - dihydroxyflavonů vykazuje regulatorní efekt na selektivitu enzymů CYP1. Vyšší počet hydroxylů ústí ve vyšší inhibiční účinek na CYP1A1, ale v méně silnou inhibici CYP1A2 [54]. Flavonoidní glykosidy, např. rutin mají mnohem nižší inhibiční efekt.

V testech, které byly provedeny v rámci této studie, způsoboval quercetin v koncentraci 1 μM zvýšení aktivity EROD i MROD, oproti kontrolním buňkám na 162,9 % a 149,6 %. V koncentraci 5 μM však působil již mírně inhibičně a tato inhibice se zvyšovala s rostoucí koncentrací. Avšak i 50 μM quercetin působil snížení aktivity pouze o necelých 20 %. Rutin neovlivňoval signifikantně EROD a MROD aktivitu v buňkách HCT-8.

HCT-8 jsou jako většina buněčných linií tenkého střeva metabolicky inkompetentní. Buněčná linie HCT-8 za normálních podmínek exprimuje konstitutivně CYP1A pouze v malém množství, a proto byl inhibiční účinek quercetinu a rutinu na CYP1A testován v buňkách, ve kterých byl CYP1A naindukován 48 - hodinovou expozicí s modelovými induktory (MCH nebo β-NF). Rovněž bylo zjišťováno, zda quercetin a rutin mohou ovlivnit indukci CYP1A modelovými induktory (MCH nebo β-NF), pokud budou buňky 48 hodin inkubovány dohromady s flavonoidem a MCH nebo β-NF. Po skončení expozice byla měřena aktivita EROD a MROD a pomocí Western blottingu stanoveno množství CYP1A1 proteinu.

V literárních pramenech se při zkoumání vlivu quercetinu na indukci CYP1A1 používal jako modelový induktor TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin). Byla testována schopnost quercetinu kompetovat o vazbu na AhR s TCDD u buněčné linie MCF-7. Pokud byla koncentrace quercetinu 5000 x vyšší než TCDD, došlo k částečné inhibici vazby TCDD na AhR. Ačkoliv afinita quercetinu k receptoru je nižší ve srovnání s TCDD, tyto výsledky indukují, že quercetin přímo interaguje s AhR. U AhR deficientní MCF-7 buněčné linie nedošlo ke zvýšení EROD aktivity po inkubaci s quercetinem, na rozdíl od normální MCF-7 linie, což naznačuje, že AhR je nezbytný pro projevení efektu quercetinu na expresi CYP 1A1 [50]. Ovlivnění aktivity CYP1A1 přes AhR může přispívat k chemoprevenci. Některé potravní sloučeniny potlačují rakovinný proces inhibicí metabolické aktivace katalyzované CYP1A1 a inhibicí enzymové indukce CYP1A1 karcinogeny. Toto se děje blokováním navázání induktoru na AhR, nebo prevencí navázání komplexu AhR - ARNT na XRE, (viz obrázek 36 část A). Další možností je vytvoření chemoprotektivní látky (viz obrázek 36 část B) [40].



Obr. 36: Dva různé mechanismy přispění CYP1A1 k chemoprevenci [40]

Naše výsledky na buněčné linii HCT-8 ukazují, že quercetin výrazně omezuje MCH i β -NF zprostředkovanou indukci EROD i MROD aktivity. Při použití 50 μ M quercetinu byla hodnota EROD oproti samotnému MCH snížena až na 10,7 % a oproti samotnému β -NF na 5,0 %. Aktivita MROD byla též quercetinem výrazně snížena: na 8,1 % oproti samotnému MCH a na 8,9 % oproti samotnému β -NF. Rutin vykazoval jen

nepatrný vliv na indukci CYP1A zprostředkovanou jak MCH tak i β -NF. Maximální snížení aktivity CYP1A bylo dosaženo při indukci MCH u MROD aktivity a to 69,8 % oproti samotnému induktoru.

I v jiných studiích quercetin snižoval indukci CYP1A. Quercetin se vázal jako antagonist na AhR a v důsledku toho inhiboval benzo[a]pyrenem indukovanou CYP1A1 mRNA transkripci a proteinovou expresi v mikrosomech potkaních jater [55]. V jiném pokusu byly buňky HepG2 inkubovány s polychlorovanými bifenyly, a pak byl přidán quercetin o koncentraci 10, 20, 50 a 100 μ M. Inhibice aktivity CYP1A1 indukovaná polychlorovanými bifenyly byla zřetelně patrná již při použití quercetinu o koncentraci 25 μ M. Vyšší koncentrace quercetinu již inhibovaly aktivitu CYP1A1 na hodnoty nižší než měla kontrola obsahující 0,1 % DMSO [56].

Naše výsledky potvrzují výrazný inhibiční efekt quercetinu na předem naindukovaný CYP1A. Testovali jsme inhibiční vliv quercetinu a rutin na EROD/MROD aktivitu v buňkách, kde CYP1A byl předem naindukován expozicí s MCH anebo β -NF.

Po přidání quercetinu v koncentraci 50 μ M došlo ke snížení EROD aktivity indukované MCH na 20,1 % oproti kontrole (bez přídavku flavonoidu do reakční směsi). Snížení MROD aktivity indukované MCH nebylo tak vysoké, pouze na 52,1 %. Quercetin výrazněji snižoval MROD aktivitu naindukovanou β -NF (na 16,0 %). Rutin překvapivě mírně zvyšoval jak EROD tak MROD aktivitu naindukovanou MCH. Při indukci β -NF však rutin inhiboval EROD aktivitu na 77 % kontroly a MROD aktivitu na 57,3 % kontroly.

Výsledky testování vlivu flavonoidů na aktivitu CYP1A metodou EROD a MROD mohou být částečně zkresleny faktem, že samotné flavonoidy rutin a quercetin zhášejí fluorescenci resorufinu. U nižších koncentrací resorufinu je zhášení fluorescence flavonoidy výraznější. Vyšší zhášecí efekt vykazoval quercetin než rutin. Vzhledem k tomu, že resorufin vzniká metabolickým rozkladem 7 - m/ethoxyresorufinu CYP1A, nebylo jeho množství ve vzorku přesně stanovitelné. Inhibiční efekt flavonoidů na EROD a MROD aktivitu byl pravděpodobně částečně umocněn zhášením fluorescence vzniklého resorufinu. I výsledky uveřejněné Schwarzem a kol. (2003) [57] jasně demonstrují, že použití EROD zkoušky samotné může vést k nepřesnému hodnocení inhibičního působení testovaných látek na CYP1A. Například resveratrol byl identifikován EROD testem jako silný selektivní inhibitor lidského CYP1A1 a kandidát protirakovinné substance. Jiná data však ukazují, že resveratrol inhibuje jiné CYP1A

aktivity (epoxidaci diolu 7,8-diol-benzo[a]pyrenu, hydroxylaci benzo[a]pyrenu) jenom částečně nebo vůbec [57]. Proto k jednoznačnému prokázání inhibičního působení quercetinu na CYP1A v buňkách HCT-8 bude kromě EROD a MROD ještě potřeba testovat jiné CYP1A aktivity. Prokázání inhibičního efektu by tedy mělo být potvrzeno ještě jiným testováním vlivu flavonoidů primárně na vznik genotoxinů, např. sledováním vlivu quercetinu na hydroxylaci benzo[a]pyrenu a epoxidaci 7,8-diol-benzo[a]pyrenu.

Vliv rutinu a quercetinu na expresi CYP1A a na MCH či β -NF zprostředkovanou indukcí exprese CYP1A byl testován imunologickou kvantifikací množství proteinu CYP1A. Buňky byly 48 hodin inkubovány se samotným quercetinem, rutinem, s MCH, s β -NF a s kombinacemi quercetinu nebo rutinu současně s MCH nebo β -NF. Po zpracování vzorků byly proteiny děleny pomocí SDS elektroforézy, následně přebírány na membránu. Protein CYP1A byl detekován pomocí specifických protilátek. Kvantifikace CYP1A proteinu programem Gel.doc se nezdařila. Z optického hodnocení je patrná nízká exprese proteinu CYP1A u buněk HCT-8 inkubovaných s DMSO, rutinem a quercetinem. Naproti tomu můžeme pozorovat silný proužek jaterního CYP1A u potkaních mikrosomů, což odráží různá množství isoformů 1A1 a 1A2 ve střevních buňkách a hepatocytech. Oba modelové induktory prokázaly svůj indukční vliv i u naší testované linie. Rutin neovlivňoval indukcí exprese CYP1A zprostředkovanou β -NF ani MCH. Rutin samotný rovněž nezvyšuje expresi proteinu CYP1A oproti kontrole. Quercetin v koncentraci 5 μ M neovlivňoval expresi proteinu CYP1A. 50 μ M quercetin inhiboval indukční efekt MCH na CYP1A a slaběji i indukční efekt β -NF.

V dostupné literatuře byl testován vliv flavonoidů na expresi CYP1A více metodami. Bylo měřeno množství exprimované mRNA CYP1A, detekováno množství komplexu AhR - DRE, metodou EMSA byl zjišťován efekt quercetinu na translokaci AhR do jádra. I z těchto studií docházíme k jednoznačnému závěru, jakým mechanismem se inhibiční efekt quercetinu projevuje.

Quercetin zvyšoval expresi mRNA CYP1A1 u buněčné linie MCF-7. Čím vyšší koncentrace quercetinu byla použita, tím se dosahovalo vyšší exprese mRNA CYP1A1 [38]. Hladina mRNA byla nejvyšší po 12 hodinové inkubaci s quercetinem, po 24 hodinách je zvýšení stále signifikantní, ale po 48 hodinách je hladina pouze mírně zvýšená [50]. Enzymová aktivita přetrvávala mnohem déle než než zvýšení mRNA, což pravděpodobně odráží stabilitu enzymu oproti mRNA. Quercetin zvyšuje expresi

CYP1A1, zatímco ostatní flavonoidy a β -naftoflavon stimuluji expresi CYP1A1/2 [55]. Quercetin zvyšuje mRNA expresi [58] a aktivitu CYP1A1 a snižoval aktivitu CYP1A2 [55]. V jiné studii byl detekován komplex AhR - DRE v potkaním cytosolu, k zjištění vlivu quercetinu na expresi CYP1A1. Čím vyšší koncentrace quercetinu byla použita, tím méně komplexu AhR - DRE bylo detekováno [29]. Efekt quercetinu na translokaci AhR do jádra a na jeho navázání na DNA byl měřen metodou EMSA. Quercetin způsoboval koncentračně závislé zvýšení DNA vázací kapacity nukleárního AhR [50]. V další studii byly testy prováděny na buněčné linii MCF-7 se stabilním CYP1A1. Quercetin jako agonista kompetoval o vazbu na AhR a redukoval expresi CYP1A1. Quercetin se ukázal jako nejsilnější inhibitor ze všech flavonoidů [59].

Rutin v našich testech neprokázal vliv na CYP1A. Jedinou výjimkou bylo ovlivnění indukovaného CYP1A MCH, kdy ještě zvyšoval indukční vliv. Tento test byl proveden pouze jednou, proto by bylo potřeba k prokázání tohoto účinku na buněčné linii HCT-8 experiment zopakovat. Rutin tedy nemůže být zahrnut do protektivního efektu flavonoidů spočívajícího v inhibici CYP1A, který je zahrnut do metabolické aktivace genotoxinů. Quercetin ve vyšších koncentracích působí inhibičně na konstitutivní aktivitu CYP1A v buňkách HCT-8, i při nižších koncentracích výrazně inhibuje CYP1A aktivitu naindukovanou MCH nebo β -NF. Inhibice naindukované CYP1A aktivity je koncentračně závislá, se zvýšením koncentrace quercetinu se prohlubuje. Quercetin rovněž omezuje MCH nebo β -NF zprostředkovanou indukci CYP1A. Quercetin tedy může mít protektivní vliv při vzniku karcinogenů, přijímaných potravou jako prokarcinogeny a metabolizovaných CYP1A ve střevních buňkách.

Naše studie prokázala, že efekt flavonoidů - glykosidů je ve srovnání s jejich aglykony slabší. Nižší je i jejich toxicita. Quercetin je kompetitivní antagonist, schopný inhibovat indukci CYP1A. Při jeho dostatečném příjmu by mohl omezovat tvorbu genotoxinů zprostředkovanou CYP1A v tenkém střevě. V ideálním případě by tedy škodlivý vliv genotoxinů obsažených v potravě mohl být redukován příjmem zeleniny obsahující quercetin.

Výsledky získané použitím buněčných linií lze však jen omezeně extrapolovat na situaci u člověka *in vivo*. Metabolismus zkoumaného substrátu je zprostředkován mnoha enzymovými systémy, přičemž převládající forma záleží na koncentraci substrátu. Induktory a inhibitory jsou zřídka specifické, proto je těžké určit mechanismus inhibice [53]. Výsledný efekt rutinu a quercetinu v těle je ovlivněn výší jejich příjmu a také dalšími látkami, které do těla spolu s nimi přicházejí. Pro další

zkoumání jejich vlivu na střevní buňky by bylo dobré zjistit, jaké koncentrace se ve střevních buňkách lidí opravdu nachází a jak vysoké expozice rutinu a quercetinu se v tenkém střevě může dosáhnout. Rovněž by bylo dobré pracovat přímo s primárními lidskými enterocyty.

7 ZÁVĚR

- Flavonoidy rutin a quercetin nejsou pro buněčnou linii HCT-8 toxické v koncentracích do 50 μM . Quercetin při vyšších koncentracích již toxicky působí.
- Quercetin ovlivňoval konstitutivní aktivitu CYP1A v buněčné linii HCT-8: v 1 μM koncentraci aktivitu CYP1A zvyšoval, ve vyšší koncentrace ji mírně inhiboval. Rutin konstitutivní aktivitu CYP1A neovlivňuje. Quercetin (výrazně) i rutin (částečně) inhibovaly CYP1A aktivitu naindukovanou MCH a $\beta\text{-NF}$
- Rutin a quercetin neovlivňují expresi proteinu CYP1A v buněčné linii HCT-8. Ovlivňují ale indukční účinek MCH a $\beta\text{-NF}$ na expresi proteinu CYP1A. Rutin v koncentraci 5 μM potencuje indukční účinek $\beta\text{-NF}$, v koncentraci 50 μM ho inhibuje. Quercetin výrazně snižuje indukci exprese CYP1A zprostředkovanou jak MCH, tak i $\beta\text{-NF}$.

8 ZKRATKY

AhR	receptor aromatických uhlovodíků
β -NF	β -naftoflavon
CYP	cytochrom P450
DMSO	dimethylsulfoxid
ER	ethoxyresorufin
EROD	7 – ethoxyresorufin – O - deethylace
FBS	fetální telecí sérum
K	kontrola
LPH	laktasa phlorizinhydrolasa
MCH	methylcholantren
MR	methoxyresorufin
MRP – 2	multidrug – resistance protein 2
MROD	7 – methoxyresorufin – O - demethylace
PBS	fosfátový pufr
Q	quercetin
R	rutin
SD	směrodatná odchylka od aritmetického průměru
SGLT – 1	sodíkově závislý glukózový transportér 1
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
T-E	trypsin - EDTA

9 SEZNAM LITERATURY

- [1] Hodek, P.; Trefil, P.; Stiborová, M.: Flavonoids – potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Elsevier Science Ireland Ltd. Chemico – Biological Interactions*, 2002, vol. 139, s. 1 - 13.
- [2] Pierini, R.; Gee, J. M.; Belshaw, N. J.; Johnson, J. T.: Flavonoids and intestinal cancer, *British Journal of Nutrition*, 2008, vol. 29, s. 53.
- [3] Havsteen, B. H.: The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 2002, vol. 96, s. 70, 93.
- [4] Ren, W.; Qiao, Z.; Wang, H.; Zhu, Z.; Zhang, Z.: Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 2003, vol. 23, s. 519 – 521.
- [5] Kyle, J. A. M.; Sharp, L.; Little, J.; Duthie, G. G.; McNeile, G.: Dietary flavonoid intake and colorectal cancer: a case – control study. *British Journal of Nutrition*, 2009, vol. 7, s. 1, 6.
- [6] Duthie, G. G.; Duthie, S. J.; Kyle, J. A. M.: Plant polyphenols in cancer and heart disease: implication as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews*, 2000, vol. 13, s. 79, 83, 87, 89.
- [7] Harwood, M.; Danielewska-Nikiel, B.; Borzeeleca, J. F.; Flamm, G. W.; Williams, G. M.; Lines, T. C.: A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, vol. 45, s. 2179 - 2181, 2183 - 2187, 2193 - 2194.
- [8] Duthie, S. J.; Dobson, V. L.: Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *European Journal of Nutrition*, 1998, vol. 38, s. 28.
- [9] Morota, K.; Terao, J.: Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, vol. 417, s. 12 – 13.
- [10] Khan, M. M.; Ahmad, A.; Ishrat, T.; Khuwaja, G.; Srivastawa, P.; Khan, M. B.; Raza, S. S.; Javed, H.; Vaibhav, K.; Khan, A.; Islam, F.: Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. *Brain Research*, 2009, vol. 1292, s. 124.
- [11] Jiang, P.; Burczynski, F.; Campbell, C.; Pierce, G.; Austria, J. A.; Briggs, C. J.: Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tartaricum*, and *F. homotropicum* and their protective effect against lipid peroxidation. *Food research International*, 2007, vol. 40, s. 357.

- [12] Yang, J.; Guo, J.; Yuan, J.: In vitro antioxidant properties of rutin. *LTW*, 2008, vol. 41, s. 1063, 1066.
- [13] Webster, R. P.; Gawde, M. D.; Bhattacharya, R. K.: Protective effect of rutin, a flavonol glykoside, on the carcinogen induced DNA damage and repair enzymes in rats. *Cancer Letters*, 1996, vol. 109, s. 189.
- [14] Andlauer, W.; Stumpf, C.; Fürst, P.: Intestinal absorption of rutin in free and conjugated forms. *Biochemical Pharmacology*, 2001, vol. 62, s. 371 – 373.
- [15] Carbonaro, M.; Grant, G.: Absorption of Quercetin and Rutin in Rat Small Intestine. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2005, vol. 49, s. 179 – 180.
- [16] Kim, H.; Kong, H.; Choi, B.; Yang, Y.; Kim, Y.; Lim, M. J.; Neckers, L.; Jung, Y.: Metabolic and Pharmacological Properties of Rutin, a Dietary Quercetin Glykoside, for Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceutical Research*, 2005, vol. 22, s. 1501.
- [17] Walle, T.: Flavonoids and Isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, metabolism and Bioactivity. *Free Radical Biology*, 2004, vol. 36, s. 830 – 831.
- [18] Day, A. J.; Gee, J. M.; DuPont, M. S.; Johnson, I. T.; Williamson, G.: Absorption of quercetin-3-glukoside and quercetin-4'-glukoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical Pharmacology*, 2003, vol. 65, s. 1199 - 1200, 1204 - 1205.
- [19] Itagaki, S.; Oikawa, S.; Ogura, J.; Kolayashi, M.; Hirano, T.; Iseki, K.: Protective effects quercetin-3-rhamnoglucoside (rutin) on ischemia – reperfusion injury in rat small intestine. *Food Chemistry*, 2009, vol. 118, s. 426.
- [20] Day, A. J.; Cañada, F. J.; Diaz, J. C.; Kroon, P. A.; Mclauchlan, R.; Faulds, C. B.; Plumb, G. W.; Morgan, M. R. A.; Williamson, G.: Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters*, 2000, vol. 468, s. 166, 168 - 169.
- [21] Arts, I. C. W.; Sesink, A. L. A.; Faasen – Peters, M.; Hollman, P. C. H.: The type of sugar motiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycodides. *British Journal of Nutrition*, 2004, vol. 91, s. 846
- [22] Takano, M.; Yumoto, R.; Murakami, T.: Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. *Pharmacology and Therapeutics*, 2006, vol. 109, s. 141, 153.
- [23] Manach, C.; Morand, Ch.; Demigné, Ch.; Texier, O.; Régéat, F.; Rémésy, C.: Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Letters*, 1997, vol. 409, s. 15.

- [24] Ishii, K.; Furuta, T.; Kasuya, Y.: Determination of rutin in human plasma by high - performance liquid chromatography utilizing solid – phase extraction and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, 2001, vol. 759, s. 167.
- [25] Mullen, W.; Edwards, Ch. A.; Crosier, A.: Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *British Journal of Nutrition*, 2006, vol. 96, s. 110 - 115.
- [26] Lambert, N.; Kroon, P. A.; Faulds, C. B.; Plumb, G. W.; McLauchlan, W. R.; Day, A. J.; Williamson, G.: Purification of cytosolic β -glucosidase from pig liver and its reactivity towards flavonoid glycosides. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1999, vol. 1435, s. 111, 115.
- [27] O'Leary, K. A.; Day, A. J.; Needs, P. E.; Mellon, F. A.; O'Brien, N. M.; Williamson, G.: Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an vitro hepatic model: the role of human β -glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 2003, vol. 65, s. 479 - 480, 482 - 483.
- [28] Teyssier, C.; Amiot, M. J.; Mondy, N.; Auger, J.; Kahane, R.; Siess, M. H.: Effect of onion consumption by rats on hepatic drug – metabolizing enzymes. *Food and Chemical Toxicology*, 2001, vol. 39, s. 982, 984 - 986.
- [29] Ashida, H.; Fukuda, I.; Yamashita, T.; Kanazawa, K.: Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBS Letters*, 2000, vol. 476, s. 213 - 217.
- [30] Jeffrey, A. M.; Williams, G. M.: Risk assessment of DNA reactive carcinogens in food. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, vol. 207, s. 629 - 630.
- [31] O'Brien, J.; Renwick, A. G.; Constable, A.; Dybing, E.; Müller, D. J. G.; Schlatter, J.; Slob, W.; Tueting, W.; van Benthem, J.; Williams, G. M.; Wolfrey, A.: Approaches to the risk assessment of genotoxic carcinogens in food: A critical appraisal. *Food and chemical Toxicology*, 2006, vol. 44, s. 1627 - 1631
- [32] Bingham, S. A.: Epidemiology and mechanism relating diet to risk of colorectal cancer. *Nutrition Research Reviews*, 1996, vol. 9, s. 27.
- [33] <http://caonline.amcancersoc.org/cgi/reprint/49/1/33.pdf> [cit. leden 2009]
- [34] La Casa, C.; Villegas, I.; de la Lastra, A.; Motilva, V.; Calero, M. J. M.: Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a nature flavone against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, vol. 71, s. 46.
- [35] Boots, A. W.; Quido, R. M. M.; Bast, A.: Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 2008, vol. 585, s. 330.

- [36] Smetanová, A.: *Vliv flavonoidů na metabolismus xenobiotik*. Hradec Králové, 2009. 89 s. Rigorózní práce na Farmaceutické fakultě Karlovy univerzity v Hradci Králové, Vedoucí práce Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D., s. 12, 34, 71.
- [37] Xu, C.; Li, C.; Kong, A. N.: Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research*, 2005, vol. 28, s. 250, 252.
- [38] Moon, Y. J.; Wang, X.; Morris, M. E.: Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro*, 2005, vol. 20, s. 190, 192.
- [39] Gonzales, F. J.; Gelboin, H. V.: Role of human cytochromes P450 in the metabolit activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug metabolism review*, 1994, vol. 26, s. 167 – 170.
- [40] Androutsopoulos, V. P.; Tsatsakis, A. M.; Spandidos, D. A.: Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*, 2009, vol. 9, s. 1 - 17.
- [41] Andrysík, Z.: *Deregulace buněčného cyklu jaterních epitelálních buněk potkana indukovaná polycyklickými aromatickými uhlovodíky: Úloha MAPK a AhR*. Brno, 2005. 83 s. Disertační práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně, Vedoucí disertační práce Doc. RNDr. Alois Kozubík, Csc. s. 26.
- [42] Guengerich, F. P.; Shimada, T.: Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutation Research*, 1997, vol. 400, s. 205.
- [43] Pelkonen, O.; Turpeinen, M.; Hakkkola, J.; Honkakoski, P.; Hukkanen, J.; Raunio, H.: Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol*, 2008, vol. 82, s. 671.
- [44] Johnson, I. T.; Williamson, G.; Musk, S. R. R.: Anticarcinogenic factors in plant foods: A new class of nutrients?. *Nutrition Research Reviews*, 1994, vol. 7, s. 177.
- [45] Lampen, A.; Bader, A.; Bestmann, T.; Winkler, M.; Witte, L.; Borlak, J. T.: Catalytic activities, protein and mRNA-expression of cytochrome P450 isoenzymes in intestinal cell lines. *Xenobiotica*, 1997, vol. 28, s. 430, 433.
- [46] Vermeuten, S. J.; Chen, T. R.; Speleman, T. R.; Nollet, F.; Van Roy, F. M.; Mareel, M. M.: Did the Four Human Cancer Cell Lines DLD-1, HCT-15, HCT-8, and HRT-18 Originate from One and the Same Patient?. *Cancer genet Cytogenet*, 1998, vol. 107, s. 76.
- [47] Kang, I. H.; Kim, H. J.; Oh, H.; Park, Y. I.; Dong, M. S.: Biphasic effects of the flavonoids quercetin and naringenin on the metabolic activation of 2-amino-3,5-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline by Salmonella typhimurium TA1538 co – expressing human cytochrome P450 1A2, NADPH – cytochrome P450 reductase, and cytochrome b₅. *Mutation Research*, 2003, vol. 405, s. 38, 44, 45.

- [48] Scott, W.; Mueller, L.; Williams, S. N.; Quatrochi, L. C.; Rauey, J.: The use of a high – volume screening procedure to asses the affect of dietary flavonoids on human. *Drug Mtetabolism and Disposition*, 2001, vol. 29, s. 1074 – 1079.
- [49] Canivec – Lavier, M. C.; Varnevaut, M. F.; Tetes, M. Siess, M. H.; Magdalou, J.; Susecket, M.: Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug – metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicology*, 1996, vol. 114, s. 20, 25.
- [50] Ciolino, H. P.; Daschner, P. J.; Yeh, G. C.: Dietary flavonols quercetin and kaempherol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem. J*, 1999, vol. 340, s. 718 – 719, 721.
- [51] Kim, H. J.; Chun, H. S.; Yang, R.: Inhibition of benzo[a]pyrene – induced cytotoxicity and cytochrome P450 1A aktivty by dietary flavonoids in human liver cell model: structure – aktivty relationship. *Biotechnology letters*, 2000, vol. 22, s. 1943.
- [52] Siess, M. H.; Leclerc, J.; Canivec – Lavier, M. C.; Rat, P.; Suschetet, M.: Heterogenous Effect of Natural Flavonoids on Monooxygenase Activities in Human and Rat Liver Microsomes. *Toxicology and applied pharmacology*, 1995, vol. 130, s. 74.
- [53] Lautraite, S.; Musonda, A. C.; Dochmer, J.; Edwards, G. O.; Chipman, J. K.: Flavonoids inhibic genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. *Mutagenesis*, 2002, vol. 17, s. 45, 49 – 52.
- [54] Kim, H. J.; Lee, S. B.; Park, S. K.; Kim, H. M.; Park, Y. I.; Dong, M. S.: Effect of Hydroxyl Group Numbers on the B – Ring of 5,7-dihydroxyflavones on the Differential Inhibition of Human CYP1A and CYP1B1 Enzymes. *Arch Pharm Res*, 2005, vol. 28, s. 1180.
- [55] Zhou, S.; Gao, Y.; Jiang, W.; Huang, M.; Ku, A.; Paxton, J. W.: Interactins of Herbs with Cytochrome P450. *Drug Metabolism Reviews*, 2003, vol. 35, s. 53.
- [56] Ramadass, P.; Murarani, P.; Toborek, M.; Robertson, L. W.; Hennig, B.: Dietary Flavonoids Modulate PCB – Induced Oxidative Stress, CYP1A1 Induction, and AhR – DNA Binding Activity in Vascular Endothelial Cells. *Toxicological Sciences*, 2003, vol. 76, s. 214 – 215.
- [57] Schwarz, D.; Roots, I.: In vitro assessment of inhibition by natural polyphenols of metabolit activation of procarcinogens by human CYP1A1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, vol. 303, s. 904 – 906.
- [58] Mense, S. M.; Chhabra, J.; Bhat, H. K.: Preferential induction of cytochrome P450 1A1 over cytochrome P450 1B1 in human breast epithelial cells following exposure to quercetin. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, vol. 110, s. 163.

[59] Leung, H. Y.; Wang, Y.; Chan, H. Y.; Leung, L. K.: Developing a high – throughput system for the screening of cytochrome P450 1A1 – Inhibitory polyphenols. *Toxicology in Vitro*, 2007, vol. 21, s. 997.