

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

INHIBIČNÍ ÚČINEK ANTHOKYANIDINŮ NA
JATERNÍ KARBONYLREDUKTASU

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.
Hradec Králové 2013
Jitka Hlaváčová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své školitelce Prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za ochotu, metodické vedení a cenné rady při psaní této diplomové práce. Ráda bych zde také poděkovala svým blízkým za láskyplnou podporu během studia.

OBSAH

1. Úvod.....	10
2. Teoretická část.....	11
2.1. Enzymy redukující karbonylovou skupinu	11
2.1.1. SDR nadrodina	14
2.2. CBR1	16
2.2.1. Substráty CBR1	17
2.3. Anthokyaniny a anthokyanidiny	22
2.3.1. Chemická struktura.....	22
2.3.2. Pozitivní působení anthokyanů na lidské zdraví	23
2.3.3. Anthokyaniny a biotransformační enzymy.....	25
2.4. Flavonoidy jako inhibitory CBR1.....	27
3. Cíl práce	29
4. Experimentální část	30
4.1. Materiál a chemikálie.....	30
4.2. Pomůcky a přístroje	30
4.3. Biologický materiál.....	31
4.4. Příprava subcelulárních frakcí	31
4.5. Stanovení bílkovin v cytosolické frakci.....	32
4.6. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu a imunodetekce proteinů	33
4.6.1. Příprava roztoků	34
4.6.2. Příprava gelu.....	37
4.6.3. Elektroforéza	37
4.6.4. Blotování	38
4.6.5. Detekce – barvení blotu s AP-protilátkou	39
4.6.6. Chemiluminiscenční detekce	39
4.6.7. Densitometrická kvantifikace.....	40
4.7. Stanovení aktivity CBR pomocí menadionu	41
4.7.1. Stanovení inhibičního vlivu anthokyanidinů na aktivitu CBR a určení typu inhibice	42
5. Výsledky.....	44
5.1. Stanovení koncentrace bílkovin v cytosolické frakci	44

5.2.	Stanovení aktivit CBR	47
5.2.1.	Optimalizace složení reakční směsi.....	47
5.2.2.	Aktivita CBR u mladých a starých potkanů	48
5.2.3.	Aktivita CBR u lidí.....	50
5.3.	Expres CBR u mladých a starých potkanů.....	52
5.3.1.	Denzitometrická kvantifikace.....	53
5.4.	Inhibice CBR vybranými anthokyanidiny	55
5.4.1.	Porovnání inhibičního vlivu anthokyanidinů	55
5.4.2.	Stanovení IC_{50} u nejúčinnějších inhibitorů.....	59
5.4.3.	Určení typu inhibice	59
6.	Diskuze	62
7.	Závěr	67
	Seznam zkratk	68
	Seznam použité literatury	70

ABSTRAKT

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

Kandidát: Jitka Hlaváčová

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

Název diplomové práce: **Inhibiční účinek anthokyanidinů na jaterní karbonylreduktasu**

Karbonylreduktasa (CBR) je redukční enzym, jenž hraje významnou roli v první fázi biotransformace endogenních i exogenních substrátů. Podílí se na detoxikaci mnoha xenobiotik, mezi nimi i důležitých léčiv. Rozdíly v expresi a aktivitě jaterních biotransformačních enzymů mohou ovlivnit efektivitu a bezpečnost léčby. Cílem této práce bylo porovnat aktivitu a expresi CBR u starých a mladých jedinců, stanovit inhibiční vliv vybraných anthokyanidinů na aktivitu CBR u lidí a potkanů a pro nejsilnější inhibitory určit hodnotu IC_{50} a typ inhibice.

U starých potkanů byla zjištěna významně vyšší aktivita CBR než u mladých potkanů a také se u nich projevila větší interindividuální variabilita. Při měření aktivity CBR u lidských vzorků nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v souvislosti s věkem. Anthokyanidiny vykazovaly mírný až středně silný inhibiční vliv na CBR. U lidí byl enzym nejsilněji inhibován delfinidinem ($IC_{50} = 16 \mu M$) a u potkanů pelargonidinem ($IC_{50} = 23 \mu M$). Delfinidin působil jako nekompetitivní inhibitor CBR, zatímco u pelargonidinu byl zjištěn smíšený typ inhibice CBR.

ABSTRACT

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

Candidate: Jitka Hlaváčová

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

Title of diploma thesis: **Inhibitory effect of anthocyanidins on hepatic carbonyl reductase**

Carbonyl reductase (CBR) is a reducing enzyme that plays a significant role in the first phase of biotransformation of both endogenous and exogenous substrates. It participates in detoxification of many xenobiotics, among them important drugs. Differences in expression and activity of hepatic biotransforming enzymes may affect efficiency and safety of treatment. The aim of this work was to compare the activity and expression of CBR in old and young individuals and to define an inhibitory effect of selected anthocyanidins on the activity of CBR in humans and rats and to determine a value of IC_{50} and a type of inhibition for the strongest inhibitors.

Meaningfully higher activity of CBR was detected in the senescent rats compared to the young ones and the old rats also showed larger interindividual variability. No significant age-related differences have been identified by measurement of activity CBR in human samples. Anthocyanidins showed a mild to moderate inhibitory effect on CBR. The enzyme was most strongly inhibited by delphinidin ($IC_{50} = 16 \mu\text{M}$) in humans and by pelargonidin ($IC_{50} = 23 \mu\text{M}$) in rats. Delphinidin acted as a non-competitive inhibitor of CBR, whereas the mixed type of inhibition of CBR was determined for pelargonidin.

1. ÚVOD

Biotransformace je proces, při kterém v organismu dochází k chemické přeměně léčiv a dalších xenobiotik s cílem zvýšit jejich rozpustnost ve vodě a usnadnit jejich eliminace z organismu (Nassar, 2010). Na tomto procesu se podílí mnoho biotransformačních enzymů, jejichž studium je zásadní pro pochopení mnoha farmakologických aspektů léčby.

Biotransformační enzymy zásadně ovlivňují chování a účinek léčiva v organismu. Mají vliv na to, kolik léčivé látky se dostane do organismu i zda dosáhne terapeutické koncentrace v místě účinku. Působením biotransformačních enzymů vznikají v těle metabolity, které je nutné posoudit jak z hlediska jejich terapeutického efektu, tak i z pohledu případného nežádoucího působení. Při posuzování lékových interakcí je pak důležité zhodnotit vztahy léčiv a enzymů ve smyslu možného inhibičního či indukčního působení látek (Nassar, 2010).

Karbonylreduktasa je jedním z enzymů, které se podílejí na první fázi biotransformace karbonylových sloučenin (Forrest and Gonzalez, 2000). Přestože mezi její substráty patří mnoho farmakologicky i toxikologicky důležitých látek, studiu jejích vlastností dosud nebylo věnováno tolik pozornosti jako například cytochromům P450. Kromě vztahu karbonylreduktasy ke xenobiotikům by bylo jistě přínosné prozkoumat blíže i její roli ve fyziologických dějích organismu a antioxidačních procesech.

Tato práce byla zaměřena na studium změn aktivity karbonylreduktasy v souvislosti s věkem a dále na posouzení inhibičního vlivu anthokyanidinů na aktivitu karbonylreduktasy.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Enzymy redukující karbonylovou skupinu

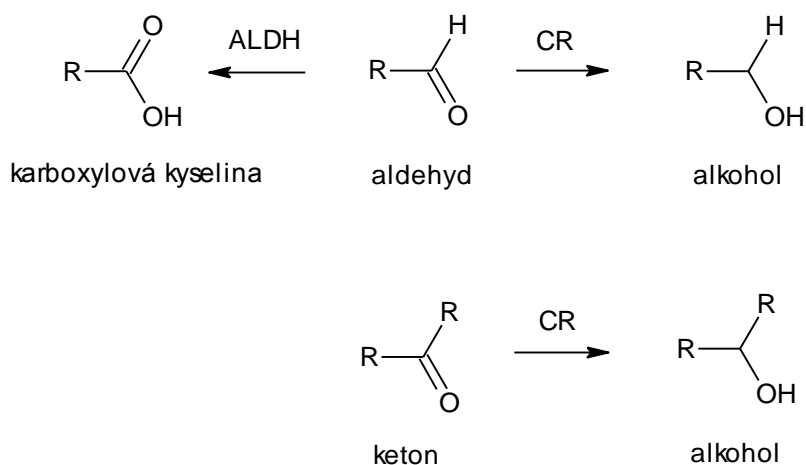
Reduktasy karbonylové skupiny tvoří velmi rozmanitou skupinu enzymů patřících do kategorie oxidoreduktas. Enzymy, které se podílejí na metabolismu karbonylových sloučenin, mohou mít značně rozdílnou lokalizaci, expresi, regulaci i substrátovou specifitu. Přestože jednotlivé reakční mechanismy enzymů redukujících karbonyl se do jisté míry liší, jako společný znak celé skupiny se ukazuje vysoký stupeň jejich plasticity, díky které vykazují poměrně širokou substrátovou toleranci (Oppermann, 2007). Konkrétní *in vitro* studie dokládají, že některé z těchto enzymů, například hydrosteroidní dehydrogenasy 3 α -HDS a 11 β -HDS, u kterých byla dříve dobře prozkoumána a definována jejich role v rámci endogenního metabolismu, jsou schopné redukovat i xenobiotické substráty (Matsunaga et al., 2006). Redukce karbonylové skupiny hraje významnou roli v první fázi metabolismu mnoha látek a činnost těchto enzymů se tak uplatňuje jak při biosyntéze, tak i při intermediárním metabolismu a detoxikaci (Barski et al., 2008; Jin and Penning, 2007).

Sloučeniny, jež ve své molekule obsahují karbonylovou funkční skupinu, a jsou tedy potenciálními substráty reduktas karbonylu, tvoří rozmanité spektrum látek patřících jak mezi endogenní látky, tak mezi xenobiotika. Z chemického hlediska se může jednat o aldehydy, ketony, případně cyklické chinony. Z tělu vlastních látek můžeme mezi karbonylové sloučeniny zařadit například některé steroidní hormony, mediátory (např. eikosanoidy, prostaglandiny), biogenní aldehydy nebo produkty lipidové peroxidace (Bauman et al., 2004; Hoffmann and Maser, 2007). Kromě toho se lidský organismus setkává i s mnoha cizorodými sloučeninami, jejichž součástí je karbonyl. Patří mezi ně některá léčiva, rostlinné látky nebo kontaminanty životního prostředí.

Karbonylová funkční skupina je často klíčová pro biologickou aktivitu celé molekuly. Například ketonická skupina v poloze 3 steroidního hormonu je klíčová pro vazbu na jeho specifický receptor (Oppermann, 2007). Pro endogenní substráty platí, že redukce karbonylové skupiny je častou součástí reverzibilního oxidačně-redukčního procesu a stává se tak prostředkem aktivace nebo inaktivace důležitých signálních molekul, jako jsou například steroidy, prostaglandiny, retinoidy nebo biogenní aminy.

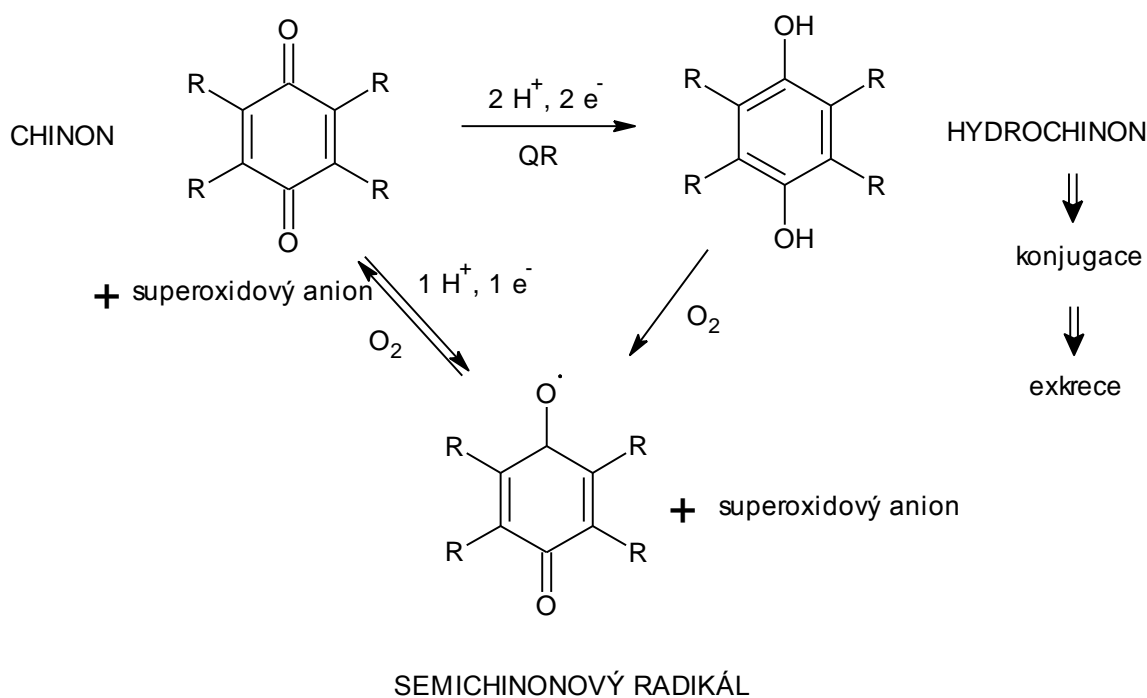
Na druhou stranu pro exogenní substráty platí, že redukcí karbonylu v molekule dochází nejčastěji k nezvratné detoxikační reakci, kdy výsledný produkt snáze podléhá následné konjugaci a eliminaci z organismu (Malátková et al., 2010). Enzymatická konverze karbonylu se tudíž stává klíčovým místem kontroly a regulace metabolismu mnohých eubiotik i xenobiotik a bližší studium fungování těchto cest by v budoucnu mohlo usnadnit vědomé zásahy jak do endogenních procesů, tak například do regulace metabolizace léčiv (Nobel et al., 2001; Oppermann, 2007; Wsól et al., 2007). Další důležitou skutečností je fakt, že mnoho aldehydických sloučenin působí v organismu toxicky, a to především díky vysoké reaktivitě karbonylové skupiny. Tyto reaktivní karbonyly, vznikající v průběhu lipidové peroxidace nebo metabolizace potravy a xenobiotických chinonů, mají schopnost se kovalentně vázat na DNA či aminokyseliny a tím modifikovat jejich funkce. Mohou také vyvolávat oxidativní stres, jehož produkty byly prokázány jako důležitý iniciační faktor při rozvoji degenerativních chorob a rakovinného bujení (Doorn and Petersen, 2002; Esterbauer et al., 1982; Lin et al., 2005; Liu et al., 2003).

Metabolismus látek s karbonylovou funkční skupinou probíhá obecně pomocí oxidačně-redukčních dějů. Molekuly obsahující ketonickou skupinu jsou redukovány na odpovídající hydroxysloučeniny, zatímco u aldehydů dochází buď k oxidaci na karboxylovou kyselinu pomocí aldehyd-dehydrogenas, nebo proběhne redukce za vzniku primárního alkoholu (Hoffmann and Maser, 2007). Redukce karbonylu je reakcí typickou pro metabolismus fáze I, která tvorbou produktů s hydroxylovou funkční skupinou vede k inaktivaci a detoxikaci. Vzniklé alkoholy totiž snáze podléhají konjugaci s kyselinou UDP-glukuronovou nebo aktivním sulfátem za působení příslušných transferas a vznikají tak sloučeniny, které jsou hydrofilnější, a tedy snáze eliminovatelné z organismu. Chinony jsou buď transformovány jedoelektronovou redukcí na semichinonové radikály, nebo jsou pomocí přenosu dvou elektronů redukovány přímo na hydrochinony. Tyto molekuly jsou konjugovány pomocí enzymů druhé fáze metabolismu a následně exkretovány z organismu. U většiny chinonů hrozí také možnost reakce s molekulárním kyslíkem a produkty této reakce podporují vznik reaktivních forem kyslíku (ROS), což dále vede k lipidové peroxidaci nebo tvorbě makromolekulárních produktů (Oppermann, 2007).



Obrázek 1 - Metabolická konverze aldehydů a ketonů

Aldehyd může být konvertován aldehyd-dehydrogenasou (ALDH) na karboxylovou kyselinu nebo karbonyl redukujícím enzymem (CR) na primární alkohol. Keton je redukován CR na odpovídající alkohol.



Obrázek 2 - Metabolická konverze chinonů, redoxní cyklování

Chinon redukující enzym (QR) konvertuje chinon na hydrochinon. Ten může být konjugován a exkretován. Jednoelektronovou redukcí chinonu vzniká semichinonový radikál. Oxidace hydrochinonu nebo semichinonového radikálu molekulárním kyslíkem (O₂) vede ke vzniku superoxidového anionu podporujícího oxidativní stres.

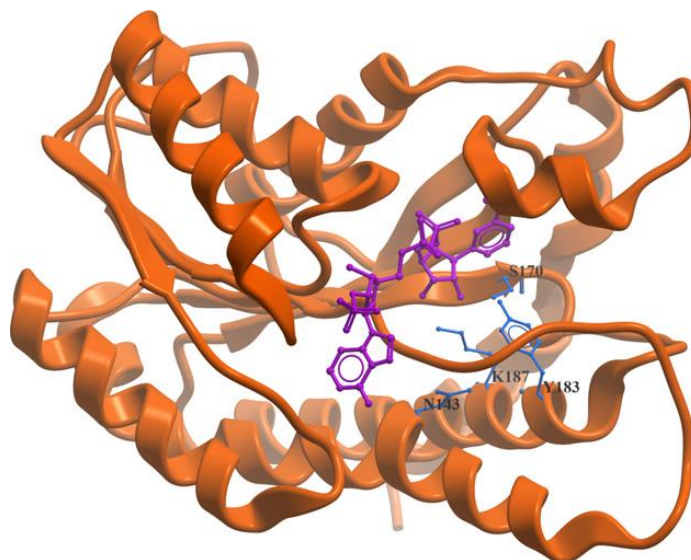
Klasifikace rozsáhlé a různorodé skupiny enzymů redukujících karbonyl nebyla vůbec jednoduchá. Jejich výskyt je popisován nejen u savců, ale například i u rostlin (Moummou et al., 2012), bakterií (Oppermann and Maser, 1996; Oppermann et al., 1998; Zelinski and Kula, 1994), hmyzu (Oppermann et al., 1998) a jiných organismů. Kromě toho se tyto enzymy nacházejí v různých tkáních a i jejich intracelulární distribuce vykazuje velkou variabilitu. Od sedmdesátých let 20. století vědci purifikovali mnoho enzymů redukujících karbonyl, které následně charakterizovali pomocí substrátové specifity a kinetických konstant (Hoffmann and Maser, 2007). Trvalo však mnoho let, než byla vytvořena přesná klasifikace a jednotlivým enzymům byl přidělen unikátní EC kód podle mezinárodní nomenklatury.

S ohledem na dosud shromážděné vědomosti o funkci a struktuře enzymů redukujících karbonyl byla většina těchto reductas rozdělena do dvou velkých proteinových nadrodin. Rozlišujeme tak nadrodinu aldo-keto-reductas (AKR) a dehydrogenas/reductas s krátkým řetězcem (SDR) (Anzenbacher and Zanger, 2012). Do skupiny AKR můžeme zařadit například aldehyd-reduktasu (EC 1.1.1.2) nebo aldoso-reduktasu (EC 1.1.1.21), zatímco různé isoformy karbonylreduktas patří do nadrodiny SDR (Malátková et al., 2010). Vyčlenění obou skupin NAD(P)H-dependentních enzymů v rámci kategorie oxidoreduktas probíhalo postupně. Samotný výraz SDR byl poprvé použit v roce 1991 (Persson et al., 1991). Nomenklaturou AKR se pak podrobně ve své práci zabýval např. Jez, et al. (1997).

2.1.1. SDR nadrodina

SDR je jedna z nejpočetnějších nadrodin enzymů, které vykazují shodné strukturní motivy a také pracují pomocí podobných mechanismů (Kavanagh et al., 2008). Pro SDR je typické, že enzym je tvořen přibližně 250-350 aminokyselinami a k jejich fungování není potřeba kofaktor ve formě kovu (Persson et al., 1991). Jinak však u této vývojově velmi staré nadrodiny nacházíme poměrně malou shodu ve strukturních sekvencích enzymů, a to většinou pouze 20-30 % (Kallberg et al., 2010). Přesto však můžeme vysledovat jistou podobnost v architektuře těchto enzymů. Typickou strukturu SDR tvoří například Rossmannův záhyb s β -skládaným listem obklopeným z každé strany třemi α -helixy (viz Obrázek 3) (Persson and Kallberg, 2013). Enzymy

z nadrodiny SDR jsou přítomny ve formě rozpustných nebo membránově vázaných proteinů ve všech typech organismů, od jednoduchých prokaryot až po lidské tkáně (Hoffmann and Maser, 2007; Jörnvall et al., 1999).



Obrázek 3 - Typický strukturní prvek enzymů SDR

Typická struktura SDR tzv. Rossmannův záhyb, který je tvořen β -skládanými listy uzavřenými třemi α -helixy z každé strany. Obrázek ukazuje model lidské kortikosteroid 11- β -dehydrogenasy. Koenzym je vyznačen fialovou barvou a části aktivního místa jsou zvýrazněny modře. (Persson and Kallberg, 2013)

V roce 2009 byl z iniciativy několika odborníků navržen nomenklaturní systém, zařazující poloautomaticky jednotlivé členy SDR do mnoha rodin a podrodin na základě vytvoření tzv. skrytých Markovových modelů (Hidden Markov Models) (Persson et al., 2009). Jednotlivým enzymům byla přiřazena unikátní čísla, která je jednoznačně vymezují. Detailně se této nomenklatuře věnuje webová stránka <http://www.sdr-enzymes.org>, která je průběžně aktualizována a doplňována o nově identifikované členy SDR (Malátková et al., 2010). Podle nejnovějších poznatků (Persson and Kallberg, 2013) je nyní známo přes 160 tisíc proteinů z Uniprot databáze (<http://www.uniprot.org>) řadících se do SDR nadrodiny. Z toho kolem 75 % enzymů je již zařazeno do některé z 464 ustanovených rodin. Zatímco množství jednotlivých členů SDR se významně rozšiřuje každým rokem, počet rodin již zřejmě moc neporoste. V současnosti je rozlišováno 47 lidských SDR rodin, které odpovídají 75 různým

genům. U většiny těchto enzymových rodin nacházíme pouze jeden příslušný gen, u některých však rozeznáváme až 8 genů u jedné rodiny.

Mezi nejdůležitější a zároveň nejlépe prozkoumané členy SDR patří karbonylreduktasy (CBR). U člověka byla prokázána přítomnost tří isoform, a to CBR1, CBR3 a CBR4. Zatímco CBR1 a CBR3 jsou podle nové nomenklatury řazeny do podrodiny SDR21C, CBR4 lišící se od nich tetrametrickou strukturou a lokací v mitochondriální matrix patří do podrodiny SDR45C (Malátková et al., 2010; Persson et al., 2009). S ohledem na hlavní témata této práce se následující text bude blíže zabývat CBR1.

2.2. CBR1

CBR1 je lidský monomerní enzym, který se vyskytuje v cytosolu mnoha tkání. Podle EC klasifikace mu bylo přiděleno číslo EC 1.1.1.184, zatímco v Uniprot databázi je označován kódem P16152 (“Carbonyl reductase [NADPH] 1 - Homo sapiens (Human)”, “Databáze SDR enzymů”). Jedna z prvních izolací tohoto enzymu byla provedena v roce 1973 z mozkové tkáně, kdy však byl označován jako aldehyddehydrogenasa (Ris and von Wartburg, 1973). V roce 1981 Wermuth stejný enzym purifikoval a blíže charakterizoval. Vzhledem k různorodosti spektra jeho karbonylových substrátů navrhl nové označení karbonylreduktasa (Wermuth, 1981). CBR1 byla nejprve s ohledem na substrátovou specifitu řazena mezi AKR. V roce 1988 Wermuth et al. zkoumali blíže strukturu proteinu a určili sekvence nukleotidů, respektive sekvence aminokyselin. Zjistili, že se CBR1 skládá z 277 aminokyselin a její relativní molekulová hmotnost je 30,375 (g/mol). Poté provedli porovnání proteinových sekvencí s primární strukturou jiných AKR, což však nevedlo k odhalení žádných signifikantních homologií. Tento výzkum naopak prokázal korelaci mezi strukturou CBR1 a enzymů označovaných dnes jako SDR (Wermuth et al., 1988). V současnosti je CBR1 řazena mezi SDR a podle nově vytvořeného systému nomenklatury této nadrodiny nese označení SDR21C1 (Persson et al., 2009).

V roce 1992 byla použita metoda imunohistochemického barvení, s cílem přesněji popsat lokalizaci CBR1 v různých tkáních. Výsledky prokázaly přítomnost enzymu ve všech zkoumaných lidských orgánech, avšak v různých množstvích. Nejvyšší koncentrace byla nalezena v parenchymatických buňkách jater, v epitelálních buňkách

žaludku a tenkého střeva a dále například v epidermis. Menší množství enzymu pak bylo prokázáno například v dutině ústní, jícnu, ledvinách nebo kosterním svalstvu (Wirth and Wermuth, 1992). Podle Withovy & Wermuthovy studie je tedy nejvíce CBR1 přítomno v orgánech, které přicházejí často do styku s exogenními látkami a podílejí se na metabolizaci těchto látek. Tento závěr je v souladu s teorií, že CBR1 patří mezi detoxikační enzymy, chránící organismus před reaktivními karbonylovými sloučeninami. Na druhou stranu byla CBR1 nalezena i v tkáních, ve kterých primárně neprobíhá kontakt s xenobiotiky, což naznačuje účast tohoto enzymu také v endogenním metabolismu (Wermuth et al., 1986; Wirth and Wermuth, 1992).

Zajímavostí CBR1 je, že existuje *in vivo* ve třech různých formách, které se liší svými isoelektrickými body, avšak při zachování skladby aminokyselin. Vykazují pouze drobné strukturální modifikace, které významněji neovlivňují funkce enzymu (Wermuth, 1981). Existence těchto tří forem CBR1 byla několikrát doložena. Například Attala et al. (2000) je purifikoval z lidského jaterního cytosolu metodou gelové filtrace, iontové výměny a hydroxyapatitové a afinitní chromatografie. Později bylo objeveno, že odlišné formy CBR1 jsou výsledkem kovalentní modifikace lysinových zbytků (Krook et al., 1993; Wermuth et al., 1993). Tato modifikace vzniká na základě autokatalytického procesu, při kterém je vytvořena Schiffova báze sloučením ϵ -aminoskupiny lysinu a 2-oxokarboxylové kyseliny, například pyruvátu nebo 2-oxoglutarátu. Redukcí dvojně vazby pak vzniká kovalentní adukt. Takováto schopnost autokatalytické modifikace nebyla zatím pozorována u žádné jiné oxidoreduktasy a zůstává tak unikátní vlastností CBR1 (Sciotti et al., 2000).

2.2.1. Substráty CBR1

Nejlepšími substráty CBR1 jsou chinony (např. menadion, fenantrenchinon a tokoferolchinon), následovně pak ketoaldehydy (např. fenyglyoxal), aromatické aldehydy (např. 4-nitrobenzaldehyd) a biogenní aldehydy (např. indol-3-acetaldehyd) (Wermuth, 1981). Menadion neboli vitamín K₃ je často používán jako modelový chinonový substrát CBR1 (Hoffmann and Maser, 2007). Z hlediska farmakologie je podstatné, že dobrými substráty CBR1 jsou také některá léčiva, například cytostatika daunorubicin, doxorubicin a oracin nebo antipsychotikum haloperidol, diagnostická látka metyrapon, nesteroidní antiflogistikum loxoprofen a serotoninový antagonist

dolasetron (Forrest and Gonzalez, 2000; Gavelová et al., 2008; Kassner et al., 2008; Malátková et al., 2010; Ohara et al., 1995)

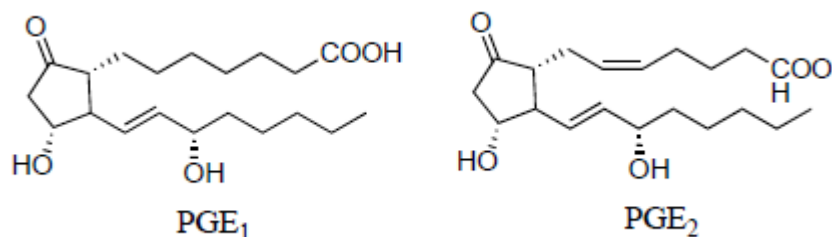
Prostaglandiny

Prostaglandiny (PG) byly jedny z prvních endogenních sloučenin, u nichž se předpokládalo, že CBR1 je zapojena do jejich metabolizace. Bylo to v době, kdy ještě nebyl enzymu přiřazen název karbonylreduktasa a například Lee a Levine (1974) používali označení prostaglandin-9-ketoreduktasa právě podle jeho schopnosti redukovat 9-ketoskupinu PGE₂ za vzniku PGF_{2α}. To, že se jedná o dva různé názvy pro identický enzym, potvrdil až Schieber et al. v roce 1992 (Schieber et al., 1992).

Jistá redukční aktivita CBR1 byla prokázána i vůči PGE₁ a aduktu glutathionu (GSH) na PGA₁, zatímco samotný PGA₁ metabolizován nebyl (Wermuth, 1981). Fakt, že přítomnost GSH ve struktuře činí z PG dobrý substrát CBR1, může být vysvětlen existencí vazného místa pro GSH v molekule CBR1, které se nachází blízko katalytického centra enzymu (Bateman et al., 2008).

Alternativním názvem pro CBR1 je také 15-hydroxyprostaglandin-dehydrogenasa, což koresponduje se schopností enzymu katalyzovat NADP-dependentní oxidaci hydroxy skupiny na pozici 15 PG. To ve své podstatě vede k jejich inaktivaci (Hoffmann and Maser, 2007).

Z těchto závěrů se usuzovalo, že CBR1 by mohla hrát důležitou roli v metabolismu PG. Díky mnoha rozmanitým funkcím, které PG zastávají v rámci fyziologických dějů, by se tak CBR1 zásadně podílela na regulaci endogenního metabolismu. Pozdější výzkumy však ukázaly, že prostaglandiny a také steroidy jsou pouze slabými substráty pro CBR1. Stanovené kinetické hodnoty, například nefyziologicky vysoká K_m, naznačují, že při nízkých koncentracích PG a steroidních substrátů v tkáních se může CBR1 *in vivo* podílet na jejich metabolismu jen nevýznamně (Schieber et al., 1992).



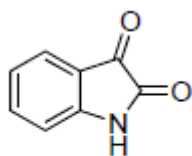
Obrázek 4 - chemická struktura prostagladninů, substrátů CBR1

Isatin

Jsou však známé i jiné endogenní látky, které jsou na rozdíl od prostaglandinů velmi dobrými substráty CBR1. Jako příklad můžeme uvést isatin, který byl dokonce označen za nejlepší endogenní substrát tohoto enzymu. Hodnoty K_m a $k_{\text{cák}}$ popisující vztah isatinu a CBR1 jsou srovnatelné s hodnotami, které platí pro vynikající xenobiotický substrát 9,10-fenanthrenchinon (Usami et al., 2001).

Isatin je tělu vlastní oxidovaný indol s nepravidelnou distribucí v mozku, periferních tkáních i tělních tekutinách savců. Má rozmanité fyziologické funkce, které ovlivňují metabolismus i chování jedince. Jeho produkce se výrazně zvyšuje při stavech spojených se stresem organismu (Medvedev et al., 2007). V nižších dávkách působí isatin *in vivo* anxiogenně, zatímco vyšší dávky vyvolávají sedaci. Isatin inhibuje *in vitro* monoamidooxidasi B. Byl také potvrzen jako antagonist atriálního natriuretického peptidu (ANP), což částečně vysvětluje jeho anxiogenní efekt (Medvedev et al., 2005). Bylo totiž zjištěno, že natriuretické peptidy a jejich receptory tvoří významný neuromodulační systém uvnitř CNS, který reguluje nejen homeostázu tekutin, ale také ovlivňuje emoční chování. ANP inhibuje hypotalo-hypofyzální-adrenální systém a v důsledku jeho činnosti klesá pocit úzkosti (Wiedemann et al., 2000).

CBR1 je hlavní reduktasou, která se podílí na katabolismu isatinu. Usami et al. prokázali, že její redukční schopnost je vyšší v porovnání s dalšími lidskými enzymy, jako je NADPH-cytochrom-P450-reduktasa nebo reduktasy nadrodiny AKR. Redukcí vzniká z isatinu metabolit 3-hydroxy-2-oxoindol, jehož biologická aktivita je výrazně nižší. Zdá se tedy, že CBR1 by mohla hrát důležitou regulační roli v metabolismu isatinu a ovlivňovat tak některé fyziologické funkce organismu (Usami et al., 2001).



Isatin

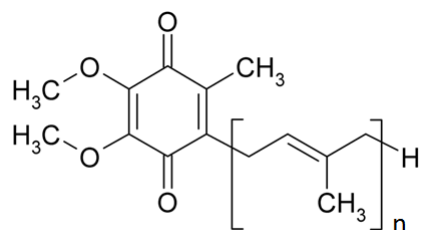
Obrázek 5 - Chemická struktura isatinu, endogenního substrátu CBR1

Chinony

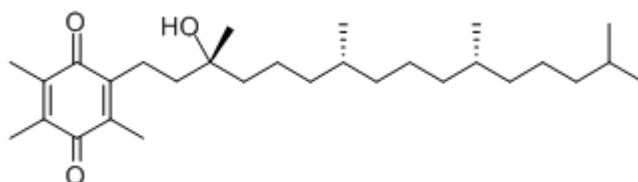
Jak již bylo výše zmíněno, chinony patří mezi nejlepší substráty CBR1 (Wermuth et al., 1986). Známé jsou xenobiotické chinony, jež mohou tvořit toxické meziproducty a tím představovat riziko pro lidský organismus (Bolton et al., 2000). Existují však také endogenní molekuly, které mají charakter chinonů a představují tak vhodné substráty pro CBR1. Jsou to sloučeniny, jež hrají důležité role v různých biologických procesech, především pak fungují jako oxido-redukční kofaktory. Jako příklad můžeme uvést ubichinony (koenzymy Q), jež jsou součástí dýchacího řetězce, tokoferolchinon (vitamín E), který zřejmě chrání lipidy biologických membrán před lipidovou peroxidací, nebo již zmiňovaný menadion (vitamín K₃) (Hoffmann and Maser, 2007).

Běžný pojem vitamín K označuje skupinu několika strukturně podobných 2-methyl-1,4-naftochinonů. Patří sem fylochinon (vitamín K₁), menachinon (vitamín K₂) a menadion (vitamín K₃) (Lamson and Plaza, 2003). Menadion, jak již bylo řečeno, je snadno redukován CBR1 na menadiol, na druhou stranu fylochinon, jenž je hlavním zdrojem vitamínu K v potravě, není zřejmě substrátem CBR1 (Wermuth et al., 1986). Menadion není považován za přírodní vitamín K, ale za jeho syntetický analog, který funguje jako provitamín (Lamson and Plaza, 2003). Menadion byl Thijssenem et al. (2006) označen také za meziproduct při transformaci fylochinonu v organismu na jeho metabolit menachinon-4. Menadiol, který vzniká dvouelektronovou redukcí, je snáze konjugovatelný a na rozdíl od semichinonových radikálů, jež vznikají při přenosu pouze jednoho elektronu, většinou nezpůsobuje oxidativní stres (Parry et al., 2009). CBR1 by tedy mohla mít jistý vliv na metabolismus vitamínu K, protože je schopná redukovat jak syntetický menadion, tak ten, který vzniká jako meziproduct v organismu.

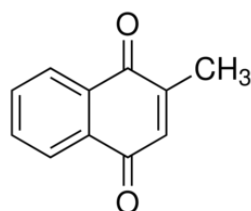
A)



B)



C)



Obrázek 6 - Chemické struktury endogenních chinonů – A) ubichinon, B) α -tokoferolchinon, C) menadion

CBR1 v roli detoxikačního enzymu se podílí na první fázi biotransformace xenobiotických chinonů. Má schopnost redukovat především benzo- a naftochinony s krátkými substituenty a ortho-chinony odvozené od polycyklických aromatických hydrokarbonů (Jarabak et al., 1998). V organismu vykazují chinony nebezpečné cytotoxické a karcinogenní efekty, které mohou být způsobeny různými mechanismy. Chinony mají například schopnost alkylovat celulární proteiny a DNA. Některé z nich také mohou tvořit sloučeniny s redoxní aktivitou, jež způsobují oxidativní stres (Bolton et al., 2000). CBR1 iniciuje dvouelektronovou redukci chinonů, jež by mohla chránit buňky před poškozením. Bylo však zjištěno, že hydrochinon, který je produktem této redukce, podléhá autooxidaci a podněcuje tak redoxní cyklování (viz. Obrázek 2, kapitola 2.1). Proto je protektivní role CBR1 částečně závislá na činnosti superoxid-dismutasy, jež se podílí na metabolizaci těchto reaktivních molekul (Oppermann, 2007).

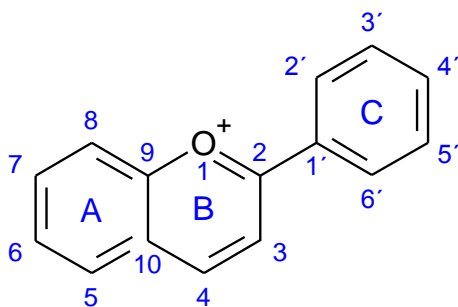
2.3. Anthokyany a anthokyanidiny

Anthokyany jsou ve vodě rozpustné pigmenty hojně se vyskytující ve vakuolách rostlinných buněk. Svou strukturou se řadí mezi flavonoidy, rozmanitou třídu sekundárních metabolitů, kterou tvoří aromatické látky odvozené od fenolu a malonyl-koenzymu A (Xu and Howard, 2012). Anthokyany jsou považovány za největší a také nejdůležitější skupinu flavonoidů, především díky jejich velkému rozšíření v rostlinné říši. Jejich význam zvyšuje také skutečnost, že se často stávají součástí stravy člověka, a mohou mít proto přímý vliv na lidský organismus (Markakis, 1982). Obsahují ve svých molekulách konjugované vazby, které umožňují absorpci světla s vlnovou délkou kolem 500 nm. Tento jev způsobuje jejich zbarvení v různých odstínech od světle červené, přes fialovou až k modré. Anthokyany tak dávají typickou barvu mnoha druhům ovoce a zeleniny nebo třeba červenému vínu či podzimnímu listí stromů (He et al., 2012; Wang and Stoner, 2008).

2.3.1. Chemická struktura

Anthokyany jsou z chemického hlediska glykosidy, jejichž aglykon se nazývá anthokyanidin a je tvořen třemi vzájemně propojenými aromatickými kruhy (viz. Obrázek 7).

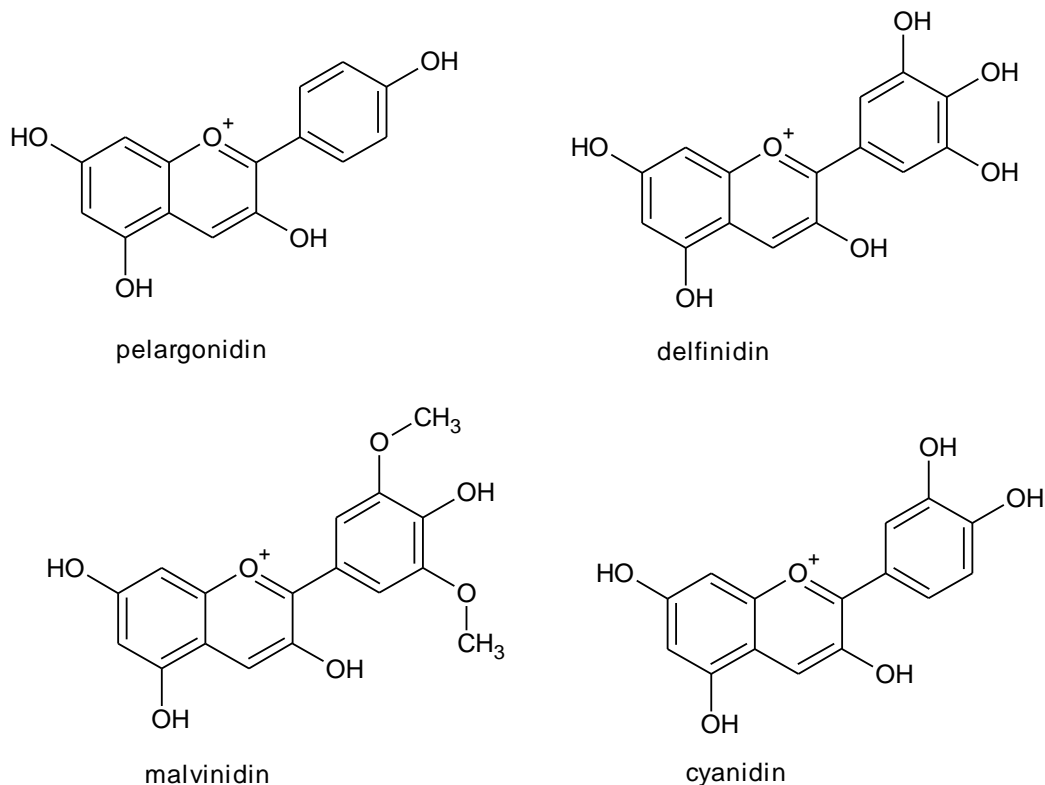
Obrázek 7 - Základní struktura anthokyanidinu



Různé aglykony se mezi sebou liší substitucí těchto kruhů, a to především počtem a polohou fenolických skupin. Do dnešního dne bylo identifikováno 635 různých anthokyanů. Většina z nich však vychází ze struktury šesti základních aglykonů, které se liší pouze obměnami cukerných zbytků a jejich acylací (He and Giusti, 2010). Mezi

nejběžnější anthokyanidiny, které byly též vybrány k použití v rámci experimentální části této práce, patří pelargonidin, delphinidin, malvinidin a cyanidin (viz. Obrázek 8).

Obrázek 8 - Struktury vybraných anthokyanidinů



Sacharidovou složku antokyanů tvoří nejčastěji monosacharid navázaný O-glykosidickou vazbou v poloze 3. Mezi nejběžnější cukerné zbytky patří glukosa, galaktosa, rhamnosa, xylosa a arabinosa (Wang and Stoner, 2008). Glykosidická část anthokynů bývá často ještě acylována aromatickými nebo alifatickými organickými kyselinami. V kyselém roztoku se anthokyany nacházejí ve formě kladně nabitě molekuly, čímž se odlišují od ostatních flavonoidů. Jejich stabilita a barevnost se mění v závislosti na pH, teplotě a přítomnosti komplexních prvků (Markakis, 1982; Wrolstad et al., 2005).

2.3.2. Pozitivní působení anthokyanů na lidské zdraví

Anthokyany jako barviva jsou obsaženy v mnoha druzích ovoce a zeleniny, jež se stávají běžnou součástí lidské stravy. Jako příklady můžeme uvést například jablka,

hrozny, černý rybíz, červené zelí či cibuli. Jako složky potravy získávají anthokyany potenciál ovlivňovat lidské tělo a zdraví (Augusti et al., 2009; Kowalczyk et al., 2003; Wang and Stoner, 2008). Význam této role je podpořen faktem, že podle studie z roku 2008 je denní příjem anthokyanů ve Spojených státech amerických přibližně 200 mg na člověka, což představuje zhruba 9krát vyšší množství než u ostatních flavonoidů vyskytujících se v potravě (Wang and Stoner, 2008).

Flavonoidy, a mezi nimi i anthokyany, jsou již desítky let podrobně zkoumány pro své příznivé účinky na lidský organismus. Důležité jsou zejména jejich antioxidační účinky, které by mohly předurčovat roli flavonoidů v prevenci různých nemocí spojených s oxidativním stresem (Bowen-Forbes et al., 2010; Vamanu and Nita, 2013). Antioxidační působení anthokyanů je výsledkem především chemické struktury, která jim umožňuje reagovat s různými aktivními látkami v lidském těle. Jako určující prvek byla zjištěna přítomnost hydroxylové skupiny v poloze 3' na kruhu C, která mimo jiné umožňuje vytváření chelátu s prvky kovů, jako je například železo nebo měď. Pro antioxidační aktivitu je důležitá i substituce v polohách 3 a 4 na kruhu B nebo vazba aromatických hydroxykyselin na cukerné zbytky (Seeram and Nair, 2002). Důležitost anthokyanů jako antioxidantů dokazuje také studie, která u této skupiny flavonoidů potvrdila vyšší antioxidační aktivitu než u obecně známých antioxidantů, jako je tokoferol, kyselina askorbová nebo karoten (Kowalczyk et al., 2003).

Bylo zjištěno, že konzumace anthokyanů přispívá k prevenci kardiovaskulárních chorob. Jejich antioxidační aktivita a schopnost vychytávat volné radikály vede ke snížení množství LDL (low-density lipoprotein) částic a nižší agregaci krevních destiček (Reed, 2002). Polyfenoly obecně mohou také ovlivňovat uvolňování oxidu dusnatého z cévního endotelu a vykazují i protizánětlivé účinky (Curin and Andriantsitohaina, 2005). Anthokyany mají schopnost snižovat ukládání cholesterolu v cévách, a tedy redukovat riziko vzniku aterosklerózy, což ve svém důsledku vede k jejich protektivnímu působení v rámci kardiovaskulárního systému (Kowalczyk et al., 2003; Reed, 2002).

Velká pozornost je také zaměřena na zkoumání potenciálního protirakovinného působení flavonoidních látek. Během *in vitro* studií byly prokázány protinádorové vlastnosti anthokyanů, jako například schopnost snižovat proliferaci buněk (Meyers et al., 2003; Zhang et al., 2005) a angiogenezi (Bagchi et al., 2004) nebo indukovat apoptózu (Shih et al., 2005) a diferenciaci buněk (Fimognari et al., 2004). Přestože mnoho experimentálních studií jasně demonstrovalo antineoplastické působení

anthokyanů, epidemiologické studie zatím nepotvrdily, že by konzumace těchto látek snižovala u člověka riziko rakoviny. Je tedy zatím nejisté, jestli anthokyaniny v *in vivo* koncentracích působí v lidském organismu protinádorově (Wang and Stoner, 2008).

2.3.3. Anthokyaniny a biotransformační enzymy

Četné důkazy o pozitivním působení anthokyanů na lidské zdraví vedly k tomu, že se tyto sloučeniny začaly hojně užívat při výrobě různých potravních doplňků. Jako doplňky stravy se většinou používají koncentrované extrakty s vysokým obsahem účinných látek, a proto při jejich pravidelném užívání může denní dávka anthokyanů značně převýšit příjem z běžné potravy (Rodeiro et al., 2008). Přestože jsou anthokyaniny z toxikologického hlediska obecně považované za velmi bezpečné látky (Bagchi et al., 2004; Nabae et al., 2008), jsou čím dál častěji zkoumány i možné nepříznivé efekty, které by větší dávky anthokyanů mohly vykazovat v organismu.

Pozornost je věnována především vlivu anthokyanů a dalších flavonoidů na enzymy metabolizující xenobiotika a dalším interakcím, jež by mohly ve své podstatě ovlivňovat farmakokinetiku či farmakodynamiku léčiv (Rodríguez-Fragoso et al., 2011). Mnoho studií již přineslo výsledky, které upozorňují, že by anthokyaniny mohly ovlivňovat enzymy první a druhé fáze biotransformace a také některé proteinové transportéry léčiv (Dreiseitel et al., 2008; Kimura et al., 2010; Kitagawa, 2006; Rodeiro et al., 2008; Rodríguez-Fragoso et al., 2011; Sand et al., 2010).

Enzymy I. fáze

Bylo zjištěno, že anthokyaniny a další polyfenolické látky mohou přímo inhibovat enzymy první fáze biotransformace nebo ovlivnit jejich expresi zásahem do regulační kaskády. Výzkumy se zaměřují především na ovlivnění isoformy cytochromu P450 (CYP), které mají největší podíl na metabolizaci xenobiotik (Rodríguez-Fragoso et al., 2011).

Studiu inhibičního potenciálu anthokyanů, anthokyanidinů a jejich metabolitů se věnovala například Dreiseitel et al. (2008). Z její práce vyplývá, že anthokyaniny i anthokyanidiny jsou pouze slabými inhibitory CYP3A4 v porovnání s jinými polyfenolickými látkami (např. furanokumariny, resveratrolem nebo epikatechin gallátem) (Dreiseitel et al., 2008). Také další isoforma CYP2C19, jež se podílí na metabolizaci léčiv, je ovlivněna anthokyaniny jen v malé míře, přičemž farmakologicky

významnější interakce jsou nepravděpodobné (Sand et al., 2010). Podobné závěry týkající se ovlivnění lidské CYP2C9 anthokyany přinesla i *in vitro* studie Kimury et al. (2010).

Pro zkoumání možného ovlivnění enzymů první fáze metabolismu *in vivo* byly zatím spíše než jednotlivé polyfenoly používány směsi více fytochemických látek ve formě ovocných džusů. Bylo zjištěno, že signifikantní inhibiční efekt na biotransformační enzymy má, kromě běžně zmiňovaného grapefruitového džusu, také pití džusu brusinkového či džusu z černé maliny nebo granátového jablka (Hidaka et al., 2005; Kim et al., 2006; Ngo et al., 2009). Předpokládá se, že na tomto účinku se jistou měrou podílejí i anthokyany, které jsou obsaženy v těchto nápojích v relativně vysokých koncentracích.

Enzymy II. fáze

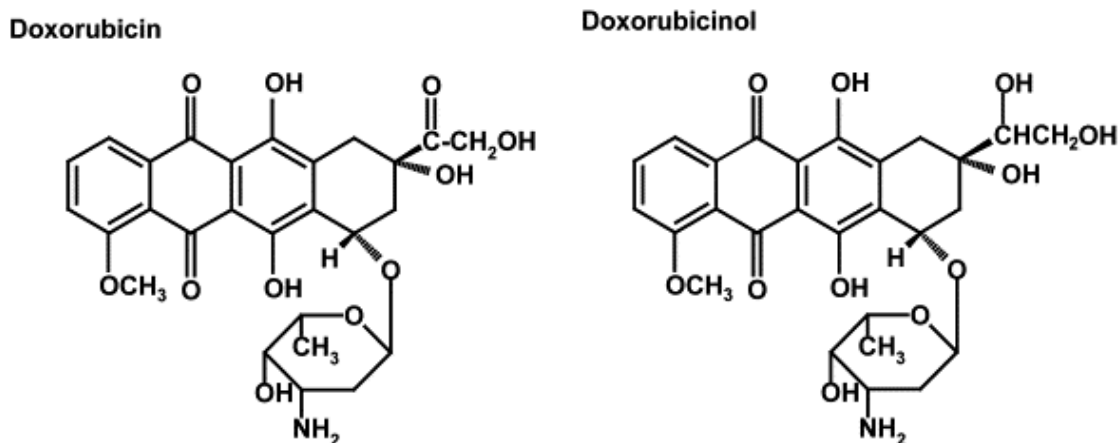
Ve druhé fázi biotransformace dochází ke konjugaci xenobiotik s endogenními molekulami, což vede ke vzniku hydrofilnějších, snáze eliminovatelných produktů. Flavonoidy obecně jsou známé jako induktory exprese enzymů druhé fáze. Nejpodrobnější informace zatím přinesly studie o indukci exprese UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) a glutathion-S-transferasy (GST). Za vyšší transkripci genů GST je zodpovědný především tzv. antioxidační a elektrofilní responsní element (ARE/EpRE), k jehož aktivaci dochází v jádře po expozici některými flavonoidy (Kong et al., 2001; Owuor and Kong, 2002; Xu et al., 2005). Tento způsob indukce GST byl předpokládán i ve studii zkoumající extrakt z brambor rodu *Ipomoea batatas*, který obsahoval cyanidin-3-O-glucosid, malvidin-3-O-glucosid, pelargonidin-3-O-glucosid a další anthokyany. Po čtyřtýdenní aplikaci tohoto extraktu vzrostla signifikantně aktivita GST v potkaních jaterních buňkách (Hwang et al., 2011).

Na druhou stranu je potvrzeno, že některé flavonoidy působí jako kompetitivní nebo nekompetitivní inhibitory enzymů druhé fáze (Boušová et al., 2012; Hayeshi et al., 2007; Moon et al., 2006). Na testování konkrétních anthokyanů a anthokyanidinů se prozatím moc studií nezaměřilo. Schopnost směsi anthokyanů snížit aktivitu GST byla zjištěna například Srivastavou et al. (2007). V naší laboratoři bylo testováno působení jednotlivých anthokyanidinů na GST a UGT. GST byla inhibována jen velmi málo, zatímco na UGT působily anthokyanidiny jako středně silné kompetitivní inhibitory (Szotáková et al., 2013).

2.4. Flavonoidy jako inhibitory CBR1

Z hlediska této práce je podstatné, že u některých flavonoidů byla potvrzena schopnost inhibovat CBR1. Například Carlquist et al. (2008) zkoumali míru inhibice CBR1 pro 11 různých flavonoidních struktur, mezi nimi např. rutin, quercitrin nebo quercetin. U rutinu, nejsilnějšího inhibitoru s IC_{50} 2,1 μ M, byl studován typ inhibice CBR1 a byl určen typ smíšený. Jiná studie ukázala, že semi-syntetický 7-monohydroxyethylrutosid a 7,3',4'-trihydroxyethylrutosid jsou dalšími flavonoidy, jež inhibují CBR1 (Gonzalez-Covarrubias et al., 2008).

Oba tyto výzkumy se zabývaly především hodnocením flavonoidů jako potenciálních kardioprotektivních látek. CBR1 je totiž jako hlavní biotransformační enzym doxorubicinu (DOX) a daunorubicinu (DAU) zodpovědná za vznik kardiotoxických metabolitů těchto anthracyklinových chemoterapeutik. Doxorubicinol, který vzniká redukcí DOX, má schopnost akumulovat se v srdeční tkáni a přispívat tak k chronické kardiotoxické terapii DOX. U pacientů, léčených těmito látkami, se pak může vyvinout kardiomyopatie, což značně limituje praktické využití léčiva (Hrdina et al., 2000; Olson et al., 1988).



Obrázek 9 - Chemická struktura doxorubicinu a jeho kardiotoxického metabolitu doxorubicinolu, který vzniká redukcí karbonylové skupiny pomocí CBR (Wang et al., 2001)

Jedním z možných způsobů, jak omezit tyto nežádoucí účinky, se ukázala být inhibice CBR1, která omezila vznik toxických metabolitů, alkoholů doxorubicinolu nebo daunorubicinolu (Hüsken et al., 1995). Flavonoidy byly shledány možnými kandidáty na kardioprotektiva při léčbě DOX a DAU (Gonzalez-Covarrubias et al.,

2008). Mezi nimi především 7-monohydroxyethylrutosid, u něhož byl *in vitro* i *in vivo* prokázán významný protektivní efekt a u kterého také úspěšně proběhla první fáze klinického testování (Bast et al., 2007). Není však ještě zcela objasněno, jakým způsobem souvisí schopnost flavonoidu inhibovat CBR1 s jeho potenciálem pro ochranu před kardiotoxicitou. Podle Kaiserové et al. není totiž účinnost inhibice CBR1 zásadním parametrem pro kardioprotektivní působení flavonoidu. Stejně tak nebyla nalezena korelace mezi mírou kardioprotekce a antioxidačními schopnostmi (Kaiserová et al., 2007).

Potenciál anthokyanů a anthokyanidinů jako inhibitorů CBR1 nebyl dosud testován. Jak již bylo řečeno, anthokyaniny jsou jednou z nejdůležitějších skupin flavonoidů a bývají také častou součástí lidské stravy. Proto bylo jedním z cílů této práce posoudit inhibiční efekt vybraných anthokyanidinů na aktivitu CBR1.

3. CÍL PRÁCE

Cílem předložené práce bylo:

- 1) Sledovat aktivitu a expresi CBR v jaterním cytosolu starých a mladých potkanů, zhodnotit závislost aktivity tohoto enzymu na věku potkana
- 2) Sledovat aktivitu CBR v jaterním cytosolu mladých a starých lidí a zhodnotit závislost aktivity enzymu na věku člověka.
- 3) Testovat inhibiční účinky vybraných anthokyanidinů na aktivitu CBR v lidském a potkanním jaterním cytosolu.
- 4) Pro nejsilnější inhibitor CBR určit IC_{50} a typ inhibice

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál a chemikálie

Anthokyanidiny – pelargonidin, delphinidin, malvinidin a cyanidin – Extrasynthese (Lyon, Francie)

BSA (bovine serum albumin) – Fluka (Praha, Česká republika)

Menadion, DMSO (dimethylsulfoxid), set pro stanovení bílkovin s BCA (bicinchonic acid), chemikálie pro elektroforézu – Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)

NADPH – Merck (Praha, Česká republika)

Molekulový standard Precision Plus Protein™ All Blue Standards, netučné sušené mléko pro western blotting – Bio-Rad (Hercules, Kalifornie, USA)

Primární protilátka (Goat polyclonal anti-CBR1), sekundární protilátka (Rabbit polyclonal anti-goat IgG) konjugovaná s alkalickou fosfatase, protilátka proti β -aktinu (Mouse monoclonal anti- β -actin) – Abcam (Cambridge, Velká Británie)

Chemiluminiscenční substrát DuoLux – Vector Laboratories Inc. (USA)

Vývojka, ustalovač – Foma (Česká republika)

Nitrocelulózní membrána 0,45 μ m – Bio-Rad (Hercules, Kalifornie, USA)

Fotografický film CL-XPosure – Thermo Fisher Scientific

Běžné chemikálie čistoty p.a.

4.2. Pomůcky a přístroje

Pomůcky:

Aparatura na elektroforézu Mini Protean III system – Bio-Rad (Hercules, USA)

Kádinky, automatické pipety, sterilní pipetovací špičky, mikrotitrační destička, multikanálová pipeta, Petriho misky, mikroskopické zrcadlovky, centrifugační kyvety, odměrné baňky, nádoba na led, nerezové misky, blotovací kazeta, blotovací vana, houbička na blotování, silný filtrační papír, kónické plastové zrcadlovky, uzavíratelná kazeta, pinzeta, pinzeta na film, stopky, rukavice, nůžky, váženka, navažovací kopistka

Přístroje:

Spektrofluorimetr LS 50B – Perkin-Elmer (Waltham, Massachusetts, USA)

Čtečka absorbance Microplate Reader, model 550 – Bio-Rad

Elektroforetická transferní cela Mini Trans-Blot – Bio-Rad

Analytické váhy – Sartorius

Homogenizátor Potter-Elvehjem

Termomixer – Eppendorf

Centrifuga, rotor #3335 – Heraeus

Ultracentrifuga – Beckman coulter

Hlubokomrazicí box – Jouan - Thermo Scientific

4.3. Biologický materiál

K experimentům byli využiti potkani (samci) kmene Wistar. Zvířata byla chována ve fakulním viváriu za standardních podmínek. Pro účely této práce byla vybrána skupina šesti mladých šestitýdenních potkanů a skupina šesti starých potkanů ve věku 21 měsíců. Potkani byli usmrceni dekapitací v celkové anestezii. Po vykrvení byla vyjmuta játra, zamrazena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a v hlubokomrazicím boxu uchována pro další zpracování.

Vzorky lidských jater byly získány z Transplantačního centra Fakultní nemocnice v Hradci Králové od dárců, jejichž játra nebyla vhodná k transplantaci.

4.4. Příprava subcelulárních frakcí

Pro testování exprese a aktivity CBR byly použity vzorky cytosolu z jaterní tkáně lidí a potkanů. Pro získání cytosolu bylo nutné nejprve mechanicky rozrušit jaterní buňky pomocí homogenizace a poté postupně centrifugovat. Díky tomuto procesu došlo k oddělení organel a dalších nerozpustných složek cytoplazmy.

Játra byla mírně rozmrazena, rozvážena asi po 5 g do malých chlazených mistichek a nůžkami nastříhána na menší kousky. Jaterní tkáň byla postupně vkládána do 30ml

homogenizátoru, kam bylo vždy přilito 15 ml 0,1M Na-fosfátového pufru pH 7,4 a následně byla provedena homogenizace. Homogenát byl přelit do centrifugační kyvety a píst i homogenizátor byly vypláchnuty ještě 15 ml pufru, který byl poté nalit do kyvety.

Pak byly kyvety s homogenizátem vloženy do centrifugy (Heraeus, rotor #3335) a proběhla první centrifugace (5000 g, 20 min, 4 °C). Při ní došlo k oddělení potrhaných buněčných membrán, vaziva, cév a jader, které zůstaly v sedimentu.

Poté byl supernatant z 1. centrifugace přelit do čistých kyvet a vzorky byly pomocí stejného přístroje znovu zcentrifugovány (20000 g, 60 min, 4 °C). Proběhlo usazení sedimentu s obsahem mitochondrií.

Pro získání cytosolu byl supernatant získaný druhou centrifugací slit do kyvet pro ultracentrifugu Beckman. Kyvety byly vloženy do vychlazeného rotoru a byla spuštěna centrifuga (105000 g, 65 min, 4 °C). Tato třetí centrifugace vedla k získání cytosolu v podobě supernatantu, který byl odebrán a za stálého míchání pomocí pipety rozdělen po 1ml do mikrozkušavek, které byly zamrazeny na -80 °C a uchovány v hlubokomrazicím boxu pro další použití.

4.5. Stanovení bílkovin v cytosolické frakci

Pro výpočet specifické enzymové aktivity CBR jednotlivých vzorků bylo nutné stanovit přesný obsah bílkovin v použitém cytosolu. Za tímto účelem byla použita metoda, která využívá skutečnosti, že proteiny reagují v alkalickém prostředí s měďnatými kationty. Měď poté přechází na jednomocné ionty a vytváří v prostředí blízkém pH 10 stabilní modrofialový komplex s BCA (kyselina bicinchoninová). Jelikož intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny ve vzorku, dá se toto množství jednoduše stanovit pomocí změření absorbance a porovnáním s kalibrační křivkou.

K vytvoření kalibrační křivky byl použit výchozí roztok hovězího sérového albuminu (BSA), který byl naředěn na požadované koncentrace podle následující tabulky (Tabulka 1).

Tabulka 1 - Přehled koncentrací roztoků BSA pro sestavení kalibrační křivky

	Koncentrace	roztok 1% BSA	destilovaná voda
1	0 µg/ml	0 µg	500 µg
2	200 µg/ml	10 µg	490 µg
3	400 µg/ml	20 µg	480 µg
4	600 µg/ml	30 µg	470 µg
5	800 µg/ml	40 µg	460 µg
6	1000 µg/ml	50 µg	450 µg

Poté byly připraveny k nanášení jednotlivé vzorky. Cytosol z jaterního homogenátu potkanů a lidí byl vždy naředěn 20krát za použití destilované vody. Byla provedena dvě nezávislá ředění a z každého ředění byly připraveny 4 vzorky k měření.

Na mikrotitrační destičku bylo nanášeno 10 µl roztoků bílkoviny z kalibrační řady a také 10 µl z každého zředěného vzorku cytosolu. Pro získání slepého vzorku byla do jamky místo bílkoviny napipetována destilovaná voda. Poté bylo do všech těchto jamek pomocí multikanálové pipety vpraveno 200 µl pracovního roztoku C. Směs v jamkách byla dobře promíchána a poté se nechala inkubovat při 37 °C 30 minut.

Pomocí čtečky (Biorad, Microplate Reader, model 550) byla změřena absorbance vzorků v jamkách při 562 nm proti destilované vodě. Od jednotlivých vzorků byl odečten průměr slepých vzorků. Za pomoci kalibrační křivky, která znázorňuje závislost absorbance na koncentraci bílkoviny, bylo stanoveno množství bílkoviny v každém vzorku.

4.6. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu a imunodetekce proteinů

Jedním z úkolů této práce bylo sledovat expresi CBR ve vzorcích cytosolu. Za tímto účelem byla provedena elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) jakožto metoda vhodná k separaci bílkovin na základě jejich molekulové hmotnosti. SDS zde totiž působí jako poměrně silný anionaktivní detergent, který po navázání na bílkoviny vyrovnává rozdíly v jejich nábojích, a při samotné elektroforéze pak pohyb bílkovin závisí pouze na jejich molekulové hmotnosti. Poté, co byly tímto způsobem separovány jednotlivé bílkoviny, byly dále pomocí blotování přeneseny z gelu na nitrocelulózovou membránu. Aby mohl být detekován zkoumaný enzym, provedla se inkubace membrány nejprve s primární

specifickou protilátkou proti CBR. Sekundární protilátka, která byla dále navázána na primární, byla konjugována s alkalickou fosfatase, enzymem, jenž dokáže chemiluminiscenční substrát přeměnit na nestabilní produkt stabilizující se vyzářením určitého kvanta světla. Tento světelný jev byl zaznamenán přiložením vhodného filmu (CL-XPosure film, Thermo Fisher Scientific).

4.6.1. Příprava roztoků

Nejprve byly připraveny všechny zásobní a pracovní roztoky následujícím způsobem.

Zásobní roztoky:

- **4M HCl** - Do 150 ml redestilované vody bylo přilito 88 ml koncentrované HCl a doplněno vodou do 250 ml.
- **Zásobní roztok AA + bis AA** – Bylo naváženo 30 g akrylamidu (AA) a 0,8 g bis-akrylamidu (bisAA). Obě látky byly rozpuštěny v malém množství redestilované vody a množství bylo doplněno na 100 ml.
- **1,5M Tris-HCl pufr, pH 8,8** – Bylo naváženo 18,5 g Trisu (tris(hydroxymethyl)aminometan) a poté se přidalo 75 ml redestilované vody a pomocí míchání bylo vše rozpuštěno. Na pH-metru se za použití 4M HCl upravilo pH a následně byl roztok doplněn v odměrné baňce na 100 ml.
- **10% SDS** – Bylo naváženo 10 g dodecylsulfátu sodného (SDS). Toto množství bylo rozpuštěno v 80 ml redestilované vody a doplněno do 100 ml.
- **0,5% bromfenolová modř (BPB)** – Bylo naváženo 50 mg BPB a přidáno 10 ml redestilované vody.
- **Koncentrovaný elektrodový pufr** – Bylo naváženo 72 g glycinu, 15 g Trisu a 5 g SDS a poté se vše rozpustilo v 900 ml redestilované vody. Bylo upraveno

pH na 8,3 postupným přidáváním 4M HCl. Poté byl roztok doplněn do 1000 ml a zamrazen.

- **Zásobní vzorkový pufr** – 1,3 ml redestilované vody bylo smícháno s 1,0 ml 0,5M Trisu-HCl pufru pH 6,8 2,0 ml glycerolu, 3,0 ml 10%SDS a 0,6 ml 0,5% BFB
- **Isobutanol nasycený vodou** – Čistý isobutanol byl smíchán s redestilovanou vodou. V horní oddělené vrstvě kapaliny zůstal isobutanol nasycený vodou.
- **Blotovací pufr** – Bylo naváženo 6,06 g Trisu (25 mM), 28,8 g glycinu (192 mM) a vše bylo rozpuštěno přibližně v 500 ml redestilované vody. Poté bylo přidáno 400 ml methanolu a roztok byl doplněn do 2000 ml.
- **0,1M Tris pufr, pH 8,0** – Bylo naváženo 12,11 g Trisu a toto množství bylo rozpuštěno v 800 ml redestilované vody. Pomocí 4M HCl bylo upraveno pH na 8,0 a redestilovanou vodou doplněno do 1000 ml.
- **TBST** – 8,77 g NaCl bylo rozpuštěno v cca 300 ml redestilované vody, bylo přidáno 3 ml Tweenu 20 a 100 ml 0,1 M Tris pufru; pH 8,0 a vše bylo doplněno v baňce do 1000 ml.
- **TBS** – 2,19 g NaCl bylo rozpuštěno v cca 100 ml redestilované vody, dále bylo přidáno 25 ml 0,1M Tris pufru; pH 8,0 a roztok byl doplněn na množství 250 ml.
- **AP (alkalická fosfatáza) pufr** – Bylo naváženo 6,06 g Trisu a 508 ml redestilované vody. Bylo upraveno pH na 9,5 pomocí 4M HCl.

Pracovní roztoky:

- **10% APS** – 20 mg persíranu amonného bylo rozpuštěno v 200 μ l redestilované vody. Tento roztok byl připraven těsně před použitím.
- **Separační gel 10%** (rozpis na 2 gely široké 1,5 mm) – K přípravě byly použity připravené zásobní roztoky. V kádince bylo smícháno:

6,4 ml redestilované vody

5,0 ml pufru 1,5M Tris-HCl pH 8,8

0,2 ml 10% SDS

8,4 ml roztoku AA + bis AA

Těsně před naléváním gelů bylo ke směsi pro iniciaci polymerace gelu přidáno:

116 μ l roztoku APS

8 μ l TEMEDu (tetramethylendiamin)

- **Zaostřovací gel 4%** (rozpis na 2 gely široké 1,5 mm) – Gel byl připraven těsně před použitím. Chemikálie byly smíchány podle schématu:

6,25 ml redestilované vody,

2,5 ml pufru 0,5M Tris-HCl pH 6,8

0,1 ml 10% SDS a

1 ml roztoku AA + bisAA

Pro zahájení polymerace bylo přidáno:

100 μ l roztoku APS

10 μ l TEMEDu

- **Elektrodový pufr** – 70 ml zásobního elektrodového pufru bylo v den potřeby smícháno s 280 ml redestilované vody.

- **Vzorkový pufr** – K 142,5 μ l zásobního vzorkového pufru bylo přidáno 7,5 μ l 2-merkptoethanolu.

4.6.2. Příprava gelu

Při procesu separace proteinů byla využívána aparatura Mini Protean III system (Bio-Rad). Nejprve byl připraven stojánek pro nalévání gelů. Skla, skla se spacers, spony a hřeben na tvorbu jamek do gelu byly nejprve pečlivě umyty a opláchnuty lihomethanolem. Suchá skla, jedno sklo tenké a druhé se spacerem, byla po přiložení k sobě upevněna sponami. Spojená skla pak byla postavena na gumovou podložku v nalévacím stojánku.

Podle výše uvedeného postupu byl připraven roztok na separační gel a po lehkém promíchání byl pomocí pipety nalit mezi skla do výšky asi 4,5 cm od spodního okraje skla. Gel byl ihned převrstven asi 200 μ l isobutanolu, který vyrovnal okraj gelu a zabránil jeho popraskání.

Spodní gel se nechal polymerovat asi 45 minut a poté byl isobutanol slit, gel byl propláchnut redestilovanou vodou a vysušen filtračním papírem. Poté byl namíchán roztok na zaostřovací gel a pipetou byl nanesen na spodní gel až po okraj skel. Hned po nalití gelu se opatrně mezi skla zasunul hřeben a takto připravené gely se nechaly polymerovat přes noc v lednici. Aby gely nevyschly, byly zabaleny před uložením do lednice do potravinářské fólie.

4.6.3. Elektroforéza

Druhý den byly nejprve připraveny vzorky cytosolu pro elektroforetické dělení. Vždy 20 μ l vzorku bylo v mikrozkušavkách smícháno s 10 μ l vzorkového pufru a pět minut byly všechny vzorky zahřívány v termobloku na 99 °C.

Poté byly z gelů opatrně odstraněny hřebeny a vzniklé jamky byly propláchnuty destilovanou vodou. Byl připraven stojánek na elektroforézu a vnitřní části sloužící jako těsnění byly potřeny vazelínou. Skla s gely byla přitlačena z obou stran k těsnění a vše bylo zasunuto do vnější části stojánku na elektroforézu a připevněno sponami.

Stojánek byl vložen do vaničky a do horního elektrodového prostoru byl nalit elektrodový pufr tak, aby byl ponořen celý gel. Po zkontrolování toho, že pufr

nepodtéká, byl nalit i do spodního prostoru. Celkově bylo použito asi 350 ml elektrodového pufru. Potom bylo pomocí nanášecího bloku a pipety nanášeno do každé jamky 10 μ l vzorku. Do krajních jamek byl napipetován molekulový standard (Precision Plus Protein™ All Blue Standards, Bio-Rad).

Celá vanička byla poté ponořena do ledové lázně, přiklopena víčkem a připojena ke zdroji napětí. Konstantní napětí bylo nastaveno na 100 V a zdroj napětí byl spuštěn. Poté, co vzorky doputovaly k začátku separačního gelu, bylo napětí zvýšeno na 200 V.

Byl hlídán vizuální průběh elektroforézy a zdroj napětí byl zastaven ve chvíli, kdy čelo došlo na spodní okraj gelu a tím došlo k separaci námi sledovaných bílkovin. Poté byl slit elektrodový pufr, vyndána skla s gely a tato skla byla od sebe pomocí klínku oddělena. Gely byly odříznuty od spacerů a také byl oddělen řidší zaostřovací gel a odříznut pravý horní roh gelu jako označení prvního naneseného vzorku. Poté byly gely ihned použity k blotování.

4.6.4. Blotování

Byla připravena nerezová miska s blotovacím pufrem a do ní se ponořilo sklo s gelem. Separační gel byl opatrně oddělen od skla a ponechán v pufru několik minut plavat.

Mezitím byla připravena nitrocelulózová membrána (Bio-Rad) a pro aktivaci byla krátce ponořena do methanolu. Poté byla přendána do blotovacího pufru. Asi po pěti minutách bylo zahájeno sestavování blotovacího sendviče.

Na spodní část blotovací kazety byla postupně přiložena houbička a silný filtrační papír, obojí předem namočené v blotovacím pufru. Na to byl položen gel a nitrocelulózová membrána s ustřiženým rohem. Navrch byl dán opět filtrační papír a houbička. Blotovací kazeta byla uzavřena a takto připravený sendvič byl vložen do blotovací vaničky.

Poté byl do vaničky umístěn také chladicí blok a vanička byla následně naplněna blotovacím pufrem tak, aby byl ponořen celý sendvič. Celá blotovací vanička byla umístěna do ledové lázně a na zdroji napětí bylo nastaveno 100 V. Po zapnutí přístroje se proces blotování nechal běžet 120 minut.

4.6.5. Detekce – barvení blotu s AP-protilátkou

Po skončení blotovacího procesu byla otevřena kazeta a pomocí pinzety byla vyndána membrána. Ta byla asi minutu oplachována v misce s 25 ml TBS a poté byla přenesena do misky s 8% mlékem v TBST (2 g mléka/25 ml TBST). Zakrytá miska byla přes noc ponechána v lednici.

Druhý den byla provedena inkubace membrán s protilátkami. Membrány byly umístěny do 50ml kónických plastových zkumavek s víčky tak, aby strana s navázanými bílkovinami směřovala dovnitř, a bylo k nim přilito vždy cca 15 ml příslušného pufru. Zkumavky byly poté umístěny na kývačku s válečky, čímž se zajistilo rovnoměrné přelévání pufru přes membránu.

Při inkubaci se postupovalo podle následujícího schématu:

- Opláchnutí membrány 2krát 5 min v TBST
- Inkubace membrány 45 min s primární protilátkou (Goat polyclonal to CBR1; příprava – 15 ml TBST + 75 mg mléka + 15 μ l zásobního roztoku protilátky)
- Opláchnutí membrány 6krát 5 min v TBST
- Inkubace membrány 45 min s AP-sekundární protilátkou (Rabbit to goat IgG; příprava – 15 ml TBST + 75 mg mléka + 3 μ l zásobního roztoku AP-sekundární protilátky)
- Opláchnutí membrány 6krát 5 min v TBST
- Opláchnutí membrány 2krát 5 min v TBS
- Opláchnutí membrány 2krát 5 min v AP-pufu

4.6.6. Chemiluminiscenční detekce

S membránami se dále pracovalo v temné komoře pod ochranným světlem. Nejprve tedy bylo nutné připravit vše potřebné, aby proces detekce nemusel být

přerušován. Byly nachystány fotomisky s vývojkou a ustalovačem, substrát DuoLux, dvě misky s destilovanou vodou, uzavíratelná kazeta, fotografický papír (CL-XPosure film, Thermo Fisher Scientific), pinzeta na filmy, nůžky, fólie a pipeta.

V temné komoře byl fotografický papír nastříhán na potřebnou velikost a vložen do kazety. Na povrch membrány bylo nepipetováno asi 1,5 ml substrátu a takto se nechala 5 minut inkubovat. Pak byla membrána vložena mezi dvě fólie a umístěna do kazety. Na tuto membránu byl opatrně položen film, kazeta byla uzavřena a probíhala expozice.

Nejprve byla zvolena doba expozice 5 minut, podle výsledné tmavosti byl pak čas při opakování zkrácen nebo prodloužen. Film byl po skončení exponování vždy ihned celý ponořen do vývojkou a za neustálého pohybování filmem bylo sledováno vyvíjení. Film byl vyjmut z vývojkou ve chvíli, kdy se jeho vyvolání zdálo optimální.

Vyvolaný film byl opláchnut nejdříve v destilované vodě, poté ponořen do ustalovače a po chvíli byl opět omyt v destilované vodě. Na filmu jsou zaznamenány výsledky chemiluminiscenční detekce.

Membrána byla zabalena do potravinářské folie a uložena do mrazničky, kde vydrží i několik týdnů. Takto uchovanou membránu je možno znovu použít. Po vyjmutí z mrazničky lze membránu rozmrazit, opláchnout v TBS a poté postupovat dále podle návodu Detekce – barvení blotu s AP-protilátkou (kapitola 4.6.5).

4.6.7. Denzitometrická kvantifikace

Výsledné proužky na nitrocelulóзовé membráně znázorňují expresi CBR v jednotlivých vzorcích. Byla provedena jejich denzitometrická kvantifikace za pomoci programu Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Jako kontrola, že byla nanášena stejná koncentrace proteinů a jejich průchod gelem byl ve všech místech stejný, sloužila detekce β -aktinu. Byla použita monoklonální myší protilátka proti β -aktinu (Abcam, Cambridge, UK). Kvantita exprese CBR ve vzorcích byla poté vyjádřena relativně ke kontrolnímu β -aktinu.

4.7. Stanovení aktivity CBR pomocí menadionu

Použitá metoda je založena na inkubaci subcelulární frakce s menadionem jako substrátem CBR (Maté et al., 2008). Biotransformace menadionu karbonylreduktasou je doprovázena oxidací NADPH, což je zaznamenáno jako pokles fluorescence. Nejprve byla tato metoda použita k porovnání aktivit CBR ve vzorcích mladých a starých potkanů a rovněž ve vzorcích lidských. Poté byly pomocí přidávání různých anthokyanidinů do reakční směsi zkoumány rozdíly v aktivitě CBR a takto byla určena míra inhibice, popřípadě její typ. Měření bylo provedeno na spektrofluorimetru (LS 50B Luminiscence Spectrometer, Perkin Elmer) a vyhodnocení na počítači pomocí programu FL WinLab.

Nejprve byl připraven v dostatečném množství 0,1M K-fosfátový pufr o pH 7,4 (byly použity 0,1M roztoky K_2HPO_4 a KH_2PO_4), 50mM roztok menadionu v ethanolu a 25mM roztok NADPH v redestilované vodě. Byly rozmrazeny vzorky cytosolu (příprava viz kapitola 4.1) určené k měření a poté byly umístěny do ledu spolu s roztokem NADPH.

Byl zapnut spektrofluorimetr a spuštěn program FL WinLab. V tomto programu byla zvolena aplikace umožňující sledovat kinetiku reakce v čase (drive time) a nastaveny požadované parametry:

- Vlnová délka měření $\lambda_{\text{excitační}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisní}} = 460 \text{ nm}$
- Excitační štěrba 5 nm
- Emisní štěrba 5 nm
- Míchání – low
- Celkový čas měření 180 s
- 37 °C

Do kyvety umístěné v přístroji byl napipetován nejprve pufr vytemperovaný na 37 °C, poté menadion a cytosol. Poté byl zapnut záznam přístroje a po 30 sekundách bylo přidáno NADPH, čímž se nastartovala reakce.

Množství jednotlivých roztoků v reakční směsi o celkovém objemu 1 ml udává následující tabulka (Tabulka 2).

Tabulka 2 - Složení reakční směsi pro stanovení aktivity neinhibované CBR1

K-fosfátový pufr	930 µl
subcelulární frakce	50 µl
menadion	10 µl
NADPH	10 µl

Reakci v kyvetě se vždy nechala běžet 180 s a během této doby byl sledován grafický záznam poklesu NADPH v reakční směsi. Pro každý vzorek cytosolu bylo měření opakováno vícekrát a po každém z nich byla pečlivě vymyta kyveta.

Nakonec bylo provedeno vyhodnocení jednotlivých grafických záznamů měření podle následujícího vzorce:

Rovnice 1 - Výpočet enzymové aktivity

$$a = \frac{k}{B - A} \times n \times D \times 60 \quad [\text{nmol/ml cytosolu/min}]$$

ksměrnice

Aintenzita před přidáním NADPH

Bintenzita po přidání NADPH

nlátkové množství standardního přídávku v 1 molu (250 nmol)

Dzředění (při použití 50 µl cytosolu je zředění 20)

60přepočtení na minuty

4.7.1. Stanovení inhibičního vlivu anthokyanidinů na aktivitu CBR a určení typu inhibice

Obdobným způsobem bylo postupováno i při zkoumání inhibičního vlivu anthokyanidinů na aktivitu CRB. Byla určována míra inhibice pro čtyři různé anthokyanidiny – pelargonidin, delphinidin, malvinidin a cyanidin. Při měření bylo obměněno složení reakční směsi přidáním roztoku anthokyanidinu v DMSO (Tabulka 3).

Tabulka 3 - Složení reakční směsi pro inhibovanou reakci

K-fosfátový pufr	925 μ l
subcelulární frakce	50 μ l
menadion	10 μ l
NADPH	10 μ l
DMSO (kontrolní neinhibovaná reakce), nebo 20 mM roztok anthokyanidinu (inhibovaná reakce)	5 μ l

S anthokyanidiny, které vykazovaly nejsilnější inhibiční účinek na CBR, byl dále testován typ inhibice. Nejprve byla proměřena kinetika enzymové reakce sledováním aktivity CBR za různých koncentrací substrátu menadionu v rozmezí od 25 μ M do 500 μ M. Tímto způsobem byla zjištěna závislost aktivity CBR na koncentraci substrátu v neinhibované reakci. Tentýž postup byl opakován pro reakce inhibované přídatkem anthokyanidinu (100 μ M). Poté byla provedena sada měření, kdy koncentrace substrátu zůstala stejná (500 μ M) a měnila se koncentrace anthokyanidinu od 1 μ M do 100 μ M. Množství cytosolu, NADPH i celkový objem reakční směsi zůstalo vždy stejné.

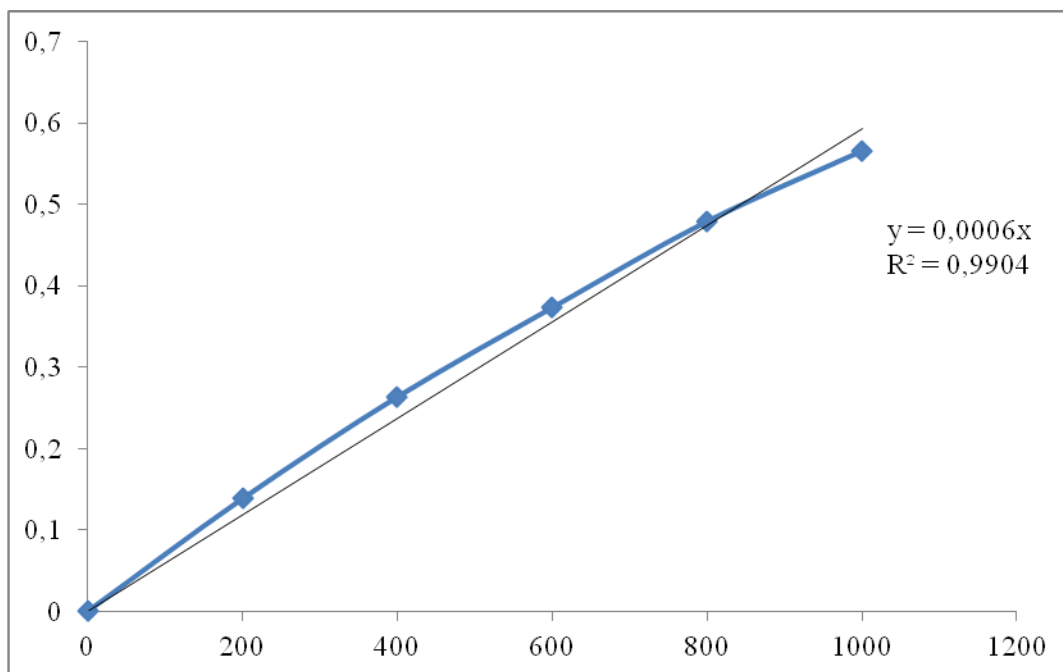
5. VÝSLEDKY

5.1. Stanovení koncentrace bílkovin v cytosolické frakci

Stanovení koncentrace bílkovin v jednotlivých vzorcích cytosolu bylo provedeno podle výše popsaného postupu (podkapitola 4.5). Nejprve byla s pomocí naměřených průměrných hodnot absorbance kalibračních roztoků (Tabulka 4) sestrojena kalibrační křivka, která znázorňuje závislost absorbance na koncentraci bílkoviny BSA ve vzorku (Obrázek 10).

Tabulka 4 - Průměrné hodnoty absorbance kalibračních roztoků

	Koncentrace BSA [$\mu\text{g/ml}$]	A \pm směrodatná odchylka (SD)
1.	0	$0 \pm 0,004$
2.	200	$0,138 \pm 0,015$
3.	400	$0,263 \pm 0,026$
4.	600	$0,372 \pm 0,028$
5.	800	$0,478 \pm 0,038$
6.	1000	$0,565 \pm 0,043$



Obrázek 10 - Kalibrační přímka pro stanovení obsahu bílkovin ve vzorcích cytosolu

Byla sestavena rovnice kalibrační přímky $y = 0,0006x$ s hladinou spolehlivosti $R^2 = 0,9904$.

Poté bylo provedeno měření absorpance jednotlivých vzorků. Dosazením získaných hodnot do rovnice kalibrační přímky byl stanoven obsah bílkovin v jednotlivých vzorcích. Tyto hodnoty byly použity k výpočtu specifické enzymové aktivity CBR1 (Tabulka 5, Tabulka 6, Tabulka 7).

Tabulka 5 - Množství bílkovin ve vzorcích cytosolu mladých potkanů

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Směs M
A	0,490	0,478	0,568	0,516	0,489	0,478	0,510
Bílkovina [mg/ml]	16,4	15,9	18,9	17,2	16,3	15,9	17,0

Tabulka 6 - Množství bílkovin ve vzorcích cytosolu starých potkanů

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Směs S
A	0,497	0,479	0,558	0,486	0,554	0,541	0,521
Bílkovina [mg/ml]	16,6	16,0	18,6	16,2	18,5	18,0	17,4

Tabulka 7 - Množství bílkovin ve vzorcích cytosolu mladých a starých lidí

	LM1	LM2	LM3	LS1	LS2	LS3
A	0,143	0,399	0,385	0,371	0,278	0,443
Bílkovina [mg/ml]	4,8	13,3	12,8	12,4	9,3	14,8

V tabulkách hodnota A odpovídá průměrně naměřené absorbanci se zohledněním slepého vzorku. M1 až M6 označuje vzorky z mladých potkanů, S1 až S6 ze starých potkanů. Směsi M a S byly vytvořeny smícháním vzorků všech mladých a všech starých potkanů. Zkratky LM a LS označují vzorky mladých a starých lidí.

5.2. Stanovení aktivit CBR

Dalším z cílů této práce bylo změřit aktivitu CBR ve vzorcích cytosolu a dále také zjistit rozdíly mezi aktivitou enzymu u mladých a starých jedinců. K tomuto účelu byl použit cytosol získaný z jater šesti mladých a šesti starých potkanů (viz podkapitola 4.4) a vzorky cytosolu z jater tří mladých a tří starých lidí. Ke stanovení aktivity CBR byla použita metoda založenou na inkubaci cytosolu se substrátem menadionem (viz podkapitola 4.7). Měření bylo realizováno na spektrofluorimetru LS 50B Luminiscence Spectrometr, Perkin Elmer). K záznamu naměřených hodnot a ke grafickému zobrazení průběhu reakcí byl použit počítačový program FL WinLab. Dosazením získaných hodnot do vzorce (Rovnice 1) byla spočítána enzymová aktivita [nmol/min] jednotlivých vzorků. S využitím znalosti obsahu bílkoviny ve vzorcích (viz podkapitola 5.1) byla u každého vzorku vyjádřena specifická enzymová aktivita [nmol/min/mg proteinu].

5.2.1. Optimalizace složení reakční směsi

Při samotném měření aktivity bylo zjištěno, že u vzorků získaných z jater starších potkanů bude vhodné upravit složení reakční směsi ve smyslu snížení množství cytosolu na 10 μ l. Při zkoušce měření s 50 μ l byla totiž u prvního vzorku starého potkana aktivita CBR1 hodně vysoká, a proto bylo pro další měření pozměněno množství cytosolu a K-fosfátového pufru (Tabulka 8). Tato úprava byla poté zohledněna při výpočtu aktivity enzymu.

Tabulka 8 - Upravené složení reakční směsi pro stanovení aktivity CBR u starých potkanů

K-fosfátový pufr	970 μ l
subcelulární frakce	10 μ l
menadion	10 μ l
NADPH	10 μ l

Stejné množství cytosolu starých potkanů bylo používáno i při inhibovaných reakcích. U vzorků získaných z jater mladých potkanů a u lidských vzorků bylo do reakční směsi i nadále pipetováno 50 μ l.

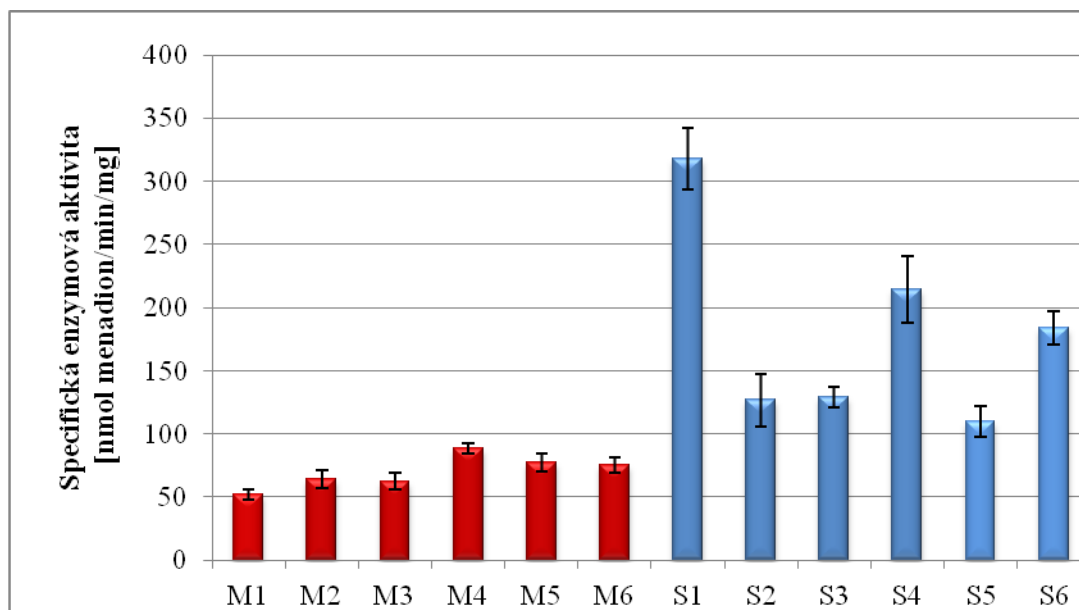
5.2.2. Aktivita CBR u mladých a starých potkanů

Byla stanovena specifická enzymová aktivita [nmol menadion/min/mg proteinu] CBR jednotlivých vzorků cytosolu. Cílem bylo především porovnat hodnoty aktivit *in vitro* u mladých a starých jedinců (potkanů a lidí). Dále pak sledovat případné rozdíly interindividuální.

Tabulka 9 - Aktivita CBR u mladých a starých potkanů

Vzorek	Specifická enzymová aktivita \pm SD [nmol menadion/min/mg proteinu]	Vzorek	Specifická enzymová aktivita \pm SD [nmol menadion/min/mg proteinu]
M1	52 \pm 5	S1	318 \pm 24
M2	64 \pm 7	S2	127 \pm 21
M3	62 \pm 6	S3	129 \pm 8
M4	88 \pm 4	S4	214 \pm 27
M5	77 \pm 7	S5	110 \pm 12
M6	75 \pm 6	S6	184 \pm 13

V tabulce (Tabulka 9) jsou shrnuty specifické enzymové aktivity CBR ve tvaru hodnota \pm směrodatná odchylka. Výsledky byly získány ze dvou nezávislých měření, kdy měření každého vzorku bylo provedeno ve třech opakováních.

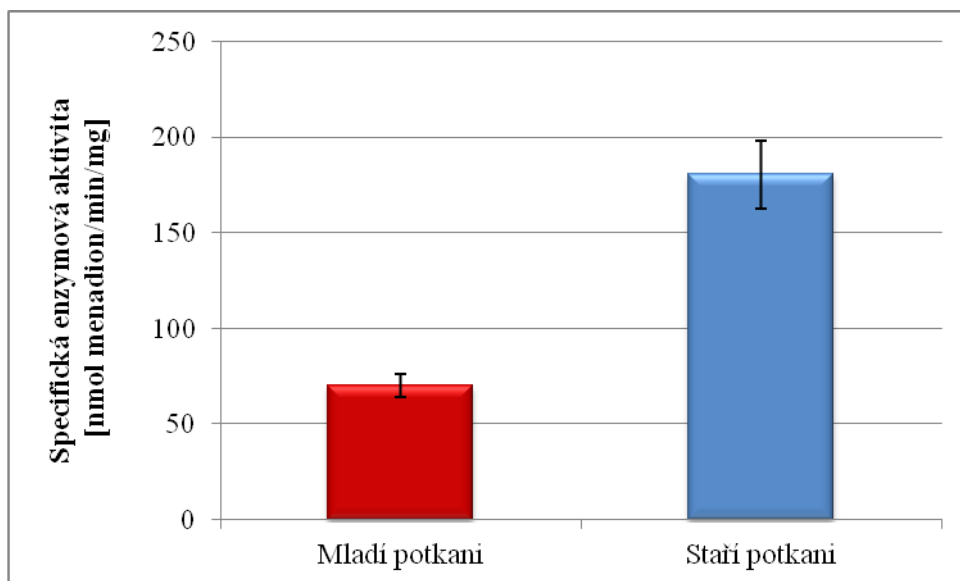


Obrázek 11 - Aktivita CBR u mladých a starých potkanů

Z grafu (Obrázek 11) jsou patrné zřetelné rozdíly naměřené aktivity CBR u potkanů mladých a starých. Z výsledků vyplývá, že specifická enzymová aktivita je vyšší u všech starých potkanů než u potkanů mladých. Zdá se tedy, že aktivita CBR se u potkanů s rostoucím věkem zvyšuje.

Dále můžeme pozorovat, že větší interindividuální rozdíly v aktivitě jsou u starých potkanů. V této skupině byla nejnižší hodnota aktivity 110 ± 12 naměřena u potkana S5 a nejvyšší 318 ± 24 u potkana S1. Rozdíl aktivit CBR u těchto zvířat dosahuje tedy až 189 %.

Naopak ve skupině mladých potkanů můžeme vidět menší rozdíly v aktivitě u jednotlivých vzorků. Hodnoty se pohybují v rozmezí 52 ± 5 až 88 ± 4 . Aktivita CBR se proto u mladých potkanů liší maximálně o 69 %.



Obrázek 12 - Porovnání průměrů aktivit CBR u starých a mladých potkanů

Na grafu (Obrázek 12) jsou znázorněné průměrné hodnoty aktivity CBR všech mladých a všech starých potkanů tak, aby byl lépe vidět rozdíl mezi oběma skupinami. U vzorků z mladých potkanů byla naměřena průměrná aktivita 70 ± 6 a u starých 180 ± 18 . Můžeme tedy konstatovat, že CBR je u starých potkanů průměrně 2,6krát vyšší než u potkanů mladých.

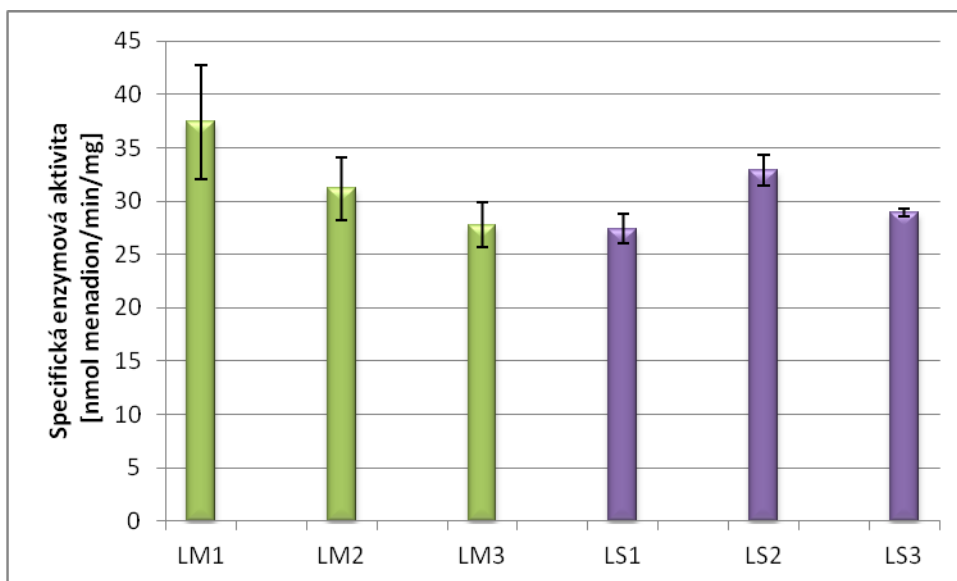
5.2.3. Aktivita CBR u lidí

K dispozici byly vzorky cytosolu tří mladých lidí (muži 18, 20, 24 let) a tří starých lidí (muži 60, 62, 64 let) a u těchto vzorků byla stanovena specifická enzymová aktivita. Cílem bylo zjistit, zda by výsledky zjištěné u potkanů mohly korelovat se situací u lidí.

Tabulka 10 – Aktivita CBR u mladých a starých lidí

Vzorek	Specifická enzymová aktivita ± SD [nmol menadion/min/mg proteinu]	Vzorek	Specifická enzymová aktivita ± SD [nmol menadion/min/mg proteinu]
LM1	37 ± 5	LS1	27 ± 1
LM2	31 ± 3	LS2	33 ± 1
LM3	28 ± 2	LS3	29 ± 0

Z tabulky (Tabulka 10) je patrné, že naměřené hodnoty aktivit v lidských vzorcích jsou celkově nižší než u potkanů.

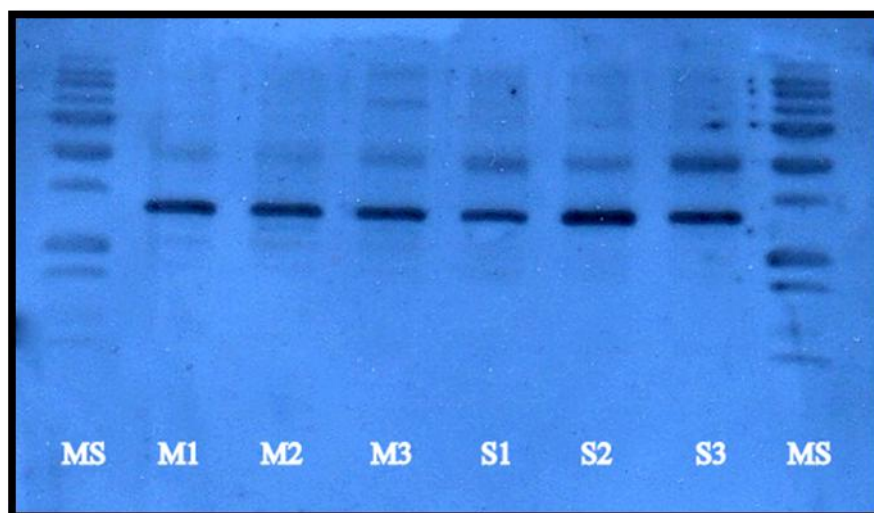


Obrázek 13 - Aktivita CBR u mladých a starých lidí

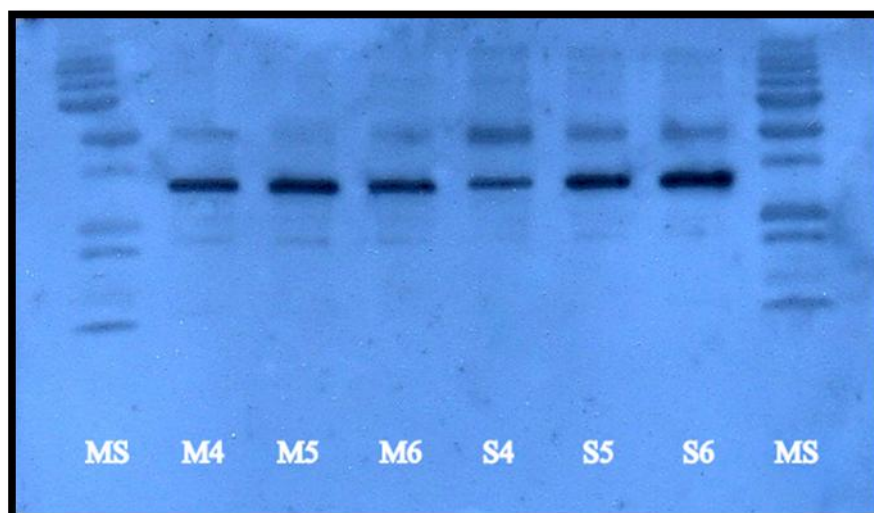
Graf (Obrázek 13) zobrazuje aktivitu CBR u lidských vzorků. Je zřejmé, že aktivity jaterní CBR se u mladších a starších lidí významně nelišily. Nebyly pozorovány ani větší interindividuální odchylky v aktivitě CBR u lidí.

5.3. Expresa CBR u mladých a starých potkanů

Jedním z cílů této práce bylo dokázat přítomnost CBR ve vzorcích cytosolu získaného z jater potkanů, porovnat případné rozdíly v expresi tohoto enzymu u skupin potkanů mladých a starých a případně zjistit odchylky interindividuální.

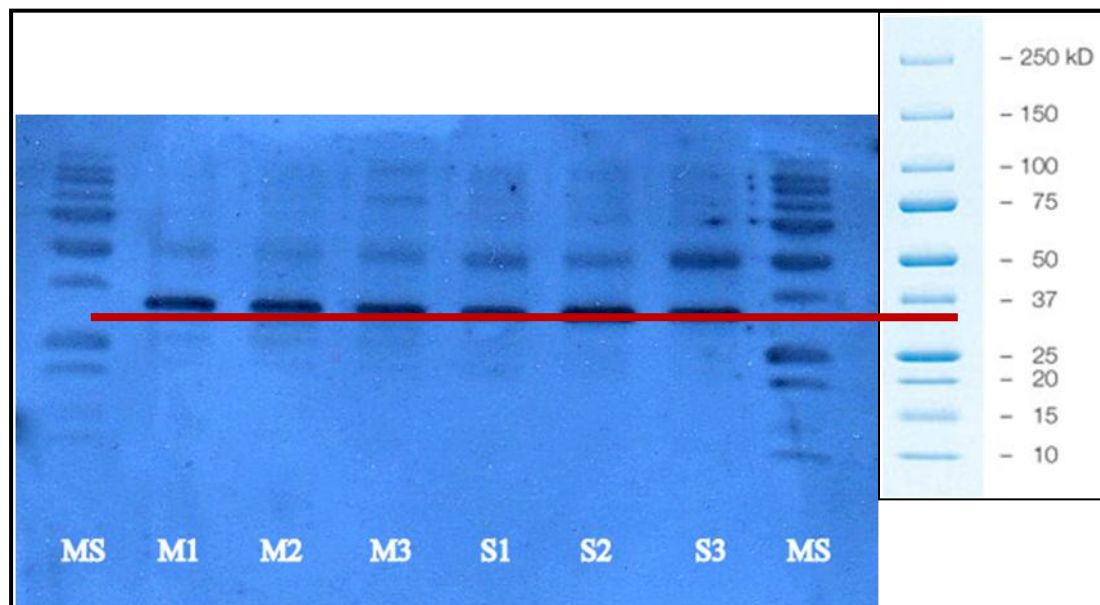


Obrázek 14 – Expresa CBR – výsledek chemiluminiscenční detekce



Obrázek 15 - Expresa CBR - výsledek chemiluminiscenční detekce

M1 až M6 značí vzorky mladých potkanů, S1 až S6 vzorky starých potkanů. MS je molekulový standard (Precision Plus Protein™ All Blue Standards, Bio-Rad).



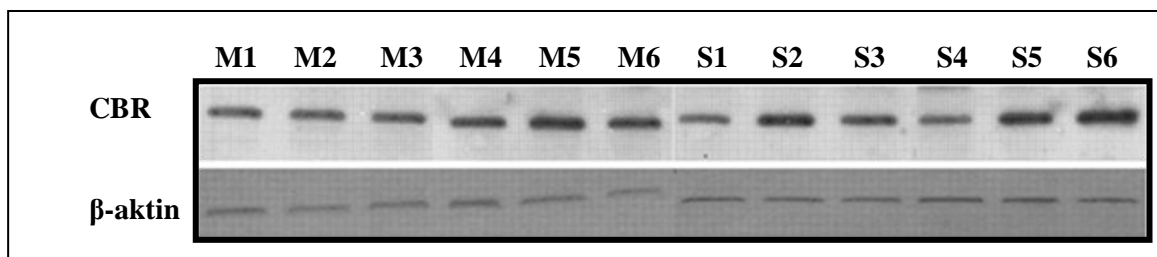
Obrázek 16 - Porovnání výsledků s molekulovým standardem

Za tímto účelem byla provedena elektroforéza SDS-PAGE a poté blotování (viz podkapitola 4.6). Výsledky zachycují následující obrázky vyvolaných fotografických filmů (Obrázek 14, Obrázek 15).

Po chemiluminiscenční detekci byly na fotografickém papíře viditelné proužky odpovídající jednotlivým naneseným vzorkům. V krajních jamkách se vždy nacházel molekulový standard, podle něhož bylo možné přibližně určit molekulovou hmotnost detekované bílkoviny mezi 25 kD a 37 kD (Obrázek 16). Jelikož molekulová hmotnost CBR se udává okolo 30 kD, je nanejvýš pravděpodobné, že získané proužky skutečně dokazují přítomnost CBR ve vzorcích.

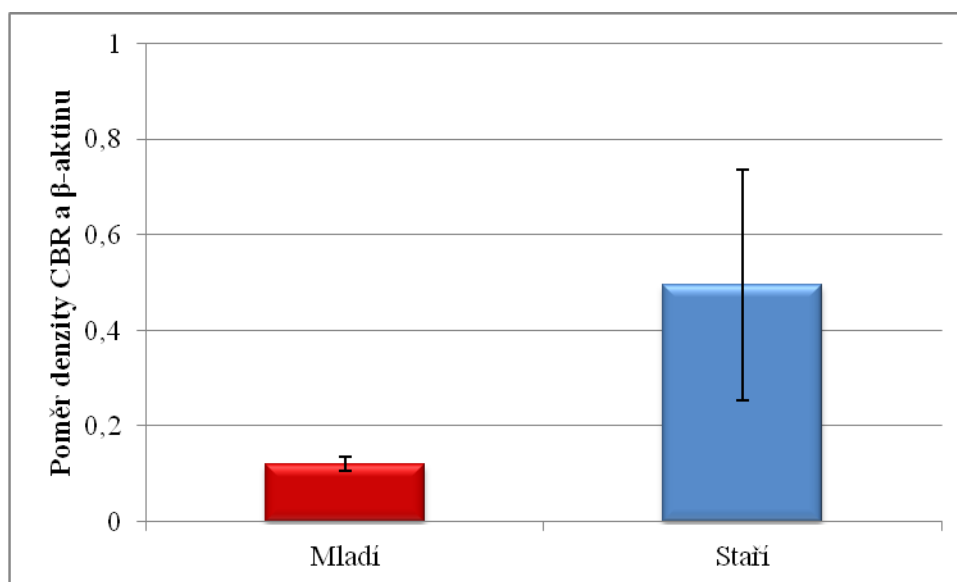
5.3.1. Denzitometrická kvantifikace

Jednotlivé proužky představující množství proteinu CBR ve vzorcích se mezi sebou liší tloušťkou a zřetelností. Z toho můžeme usuzovat, že existují jisté interindividuální rozdíly v expresi proteinu CBR ve skupině mladých i starých potkanů. Následující obrázek (Obrázek 17) nabízí vizuální srovnání exprese CBR ve všech vzorcích a zároveň zobrazuje i expresi β -aktinu.



Obrázek 17 - Srovnání exprese CBR a β -aktinu u mladých a starých potkanů

Množství proteinu CBR detekovaného blottingem bylo normalizováno podle množství kontrolního proteinu β -aktinu. Denzitometrická kvantifikace byla vyhodnocena programem Quantity One software (Bio-Rad).



Obrázek 18 - Kvantitativní porovnání exprese CBR u mladých a starých potkanů

Množství proteinu CBR je vyjádřeno relativně, jako poměr denzity CBR a kontrolního proteinu β -aktinu.

Z grafu (Obrázek 18) vyplývá, že u vzorků ze starých potkanů bylo nalezeno vyšší množství proteinu CBR než u vzorků z mladých zvířat. Tento rozdíl však nebyl statisticky významný.

5.4. Inhibice CBR vybranými anthokyanidiny

5.4.1. Porovnání inhibičního vlivu anthokyanidinů

Při zkoumání inhibičního vlivu na CBR byly použity tyto anthokyanidiny:

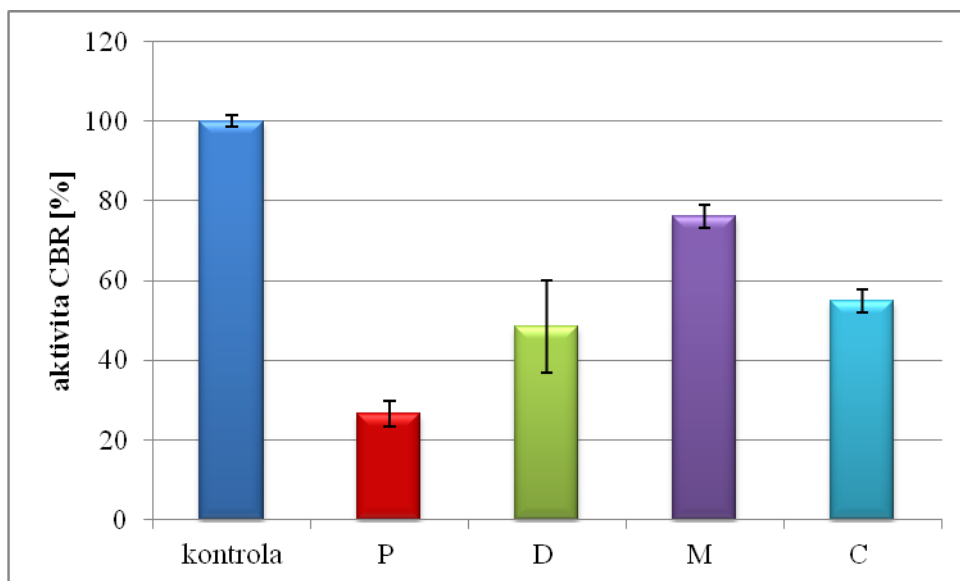
- 1) Pelargonidin (P)
- 2) Delfinidin (D)
- 3) Malvidin (M)
- 4) Cyanidin (C)

Měření inhibice bylo provedeno na spektrofluorimetru metodou inkubace cytosolu s menadionem jako substrátem (viz podkapitola 4.7.1). U všech anthokyanidinů byla použita stejná koncentrace 100 μ M. Míra inhibice byla stanovena porovnáním s neinhibovanou kontrolní reakcí (inkubace cytosolu pouze za přítomnosti rozpouštědla DMSO).

Tabulka 11 - Inhibiční vliv anthokyanidinů v koncentraci 100 μ M na aktivitu CBR u mladých potkanů

	% kontroly \pm SD
Kontrola	100 \pm 1
P	27 \pm 3
D	48 \pm 12
M	76 \pm 3
C	55 \pm 3

Tabulka (Tabulka 11) vyjadřuje procentuálně aktivitu CBR ve tvaru hodnota \pm směrodatná odchylka tak, jak poklesla u mladých potkanů po přidání jednotlivých anthokyanidinů. Je patrné, že anthokyanidiny fungují v reakci jako inhibitory, jednotlivé látky se však liší v míře inhibičního vlivu.

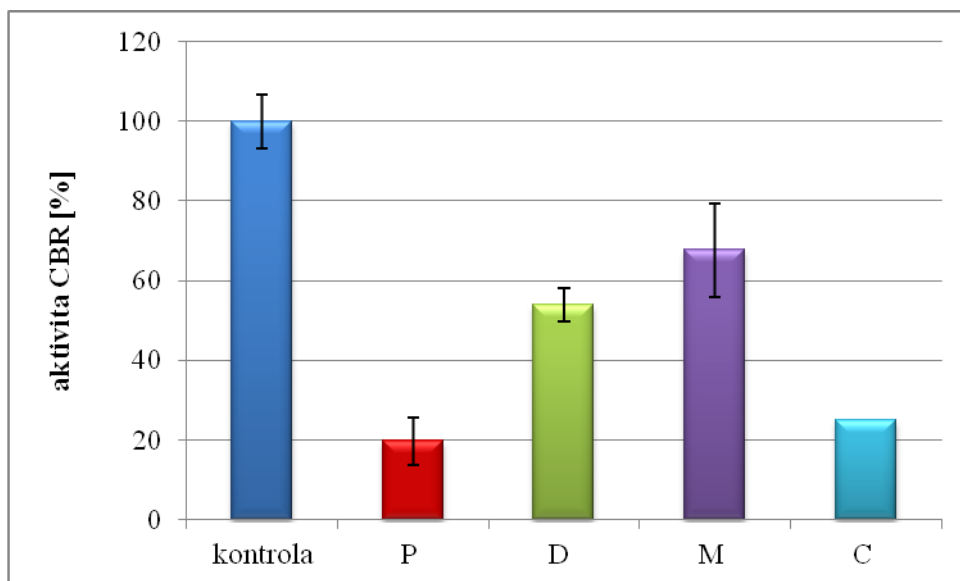


Obrázek 19 - Vliv vybraných anthokyanidinů na aktivitu CBR mladých potkanů

Graf (Obrázek 19) zobrazuje inhibiční účinek jednotlivých anthokyanidinů. Nejvyšší pokles aktivity CBR, o 74 %, způsobilo přidání pelargonidinu do reakce. Zdá se tedy být nejsilnějším inhibítorem sledovaného enzymu u těchto potkanů. Jako poměrně účinný inhibitor se v této reakci projevil též delfinidin a cyanidin, a to poklesem aktivity CBR o 52 % a 45 %. Nejmenší inhibiční vliv byl změřen u malvinidinu, který snížil aktivitu pouze o 24 %.

Tabulka 12 - Inhibiční vliv anthokyanidinů v koncentraci 100 μ M na aktivitu CBR u starých potkanů

	% kontroly \pm SD
Kontrola	100 \pm 7
P	20 \pm 6
D	54 \pm 4
M	68 \pm 12
C	25 \pm 0



Obrázek 20 - Vliv vybraných anthokyanidinů na aktivitu CBR starých potkanů

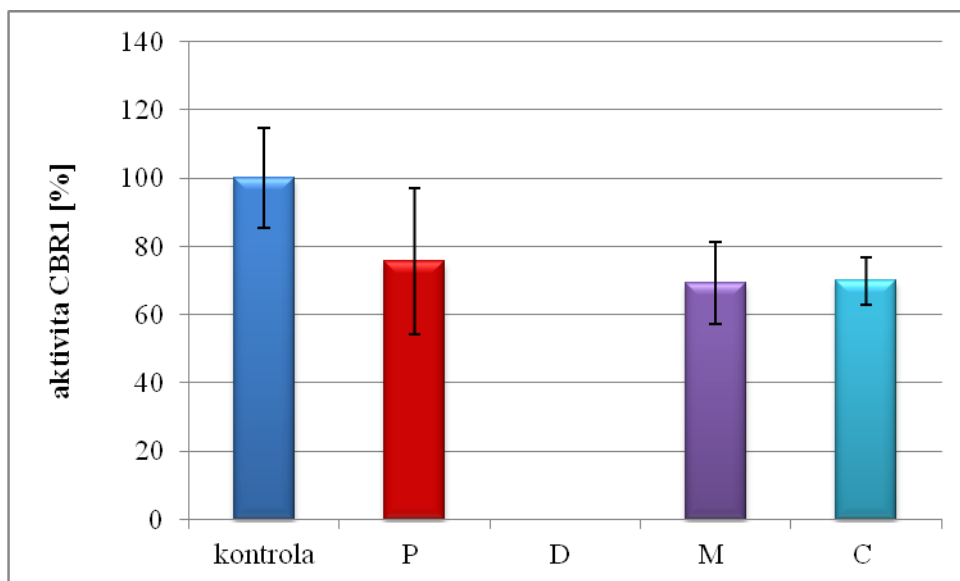
Obdobné závěry vyplynuly i ze stejného typu měření za použití vzorku cytosolu starých potkanů. Tabulka i graf (Tabulka 12, Obrázek 20) zobrazují, do jaké míry působí anthokyanidiny inhibičním vlivem na CBR u starých potkanů. Jako nejsilnější inhibitor zde opět figuruje pelargonidin, který způsobil pokles aktivity o 80 %.

Oproti měření u mladých potkanů se zde jako druhý nejúčinnější inhibitor projevil cyanidin, po jehož přidání do reakce se aktivita CBR snížila o 75 %. Míra inhibičního vlivu cyanidinu se tedy u starých a mladých potkanů liší přibližně o 30 %.

U dalších anthokyanidinů (delfinidin, malvinidin) se u mladých i starých potkanů projevila přibližně stejná míra inhibičního vlivu.

Tabulka 13 - Inhibiční vliv anthokyanidinů na aktivitu CBR v koncentraci 100 μ M u lidí

	% kontroly \pm SD
kontrola	100 \pm 15
P	76 \pm 21
D	0 \pm 0
M	69 \pm 12
C	70 \pm 7



Obrázek 21 - Vliv vybraných anthokyanidinů na aktivitu lidské CBR

Při dalších měřeních byl zjišťován inhibiční vliv sledovaných anthokyanidinů na lidskou CBR. Z výsledků je zřejmé, že tento vliv se u lidí a u potkanů liší. Graf (Obrázek 21) ukazuje, že lidskou CBR nejvíce inhibuje delphinidin, který při koncentraci 100 μ M v reakci zcela potlačil aktivitu CBR.

Naopak pelargonidin, který na potkaní CBR působil jako nejsilnější inhibitor, u lidských vzorků vykázal nejnižší inhibiční schopnost a snížil aktivitu enzymu pouze o 24 %. U obou zbývajících anthokyanidinů, malvinidinu a cyanidinu, došlo ke srovnatelnému poklesu aktivity přibližně o 30 %.

5.4.2. Stanovení IC_{50} u neúčinnějších inhibitorů

Na základě výsledků popsaných v předešlé kapitole byly vybrány anthokyanidiny, které mají největší inhibiční vliv na CBR, a u nich byly vypočteny hodnoty inhibiční koncentrace IC_{50} . U potkanů byl zvolen pelargonidin a IC_{50} byla stanovena za použití cytosolu mladých jedinců. U lidí byl vybrán delfinidin.

Při stanovování IC_{50} byl sledován vliv koncentrace inhibitoru na aktivitu enzymu. U pelargonidinu i delfinidinu bylo použito koncentrační rozpětí 1 – 100 μM v reakční směsi a naměřené hodnoty aktivity CBR byly zaneseny do grafu jako body, kterými byla následně proložena sigmoidální křivka. Hodnoty IC_{50} byly stanoveny pomocí programu GraphPad Prism verze 5.04 pro Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Výpočet byl realizován za použití logaritmických hodnot koncentrací anthokyanidinů.

Tabulka 14 - Hodnoty IC_{50} pro vybrané anthokyanidiny

inhibitor	cytosol	IC_{50}	95% interval spolehlivosti
pelargonidin	mladí potkani	23	15 až 37
delfinidin	člověk	16	13 až 21

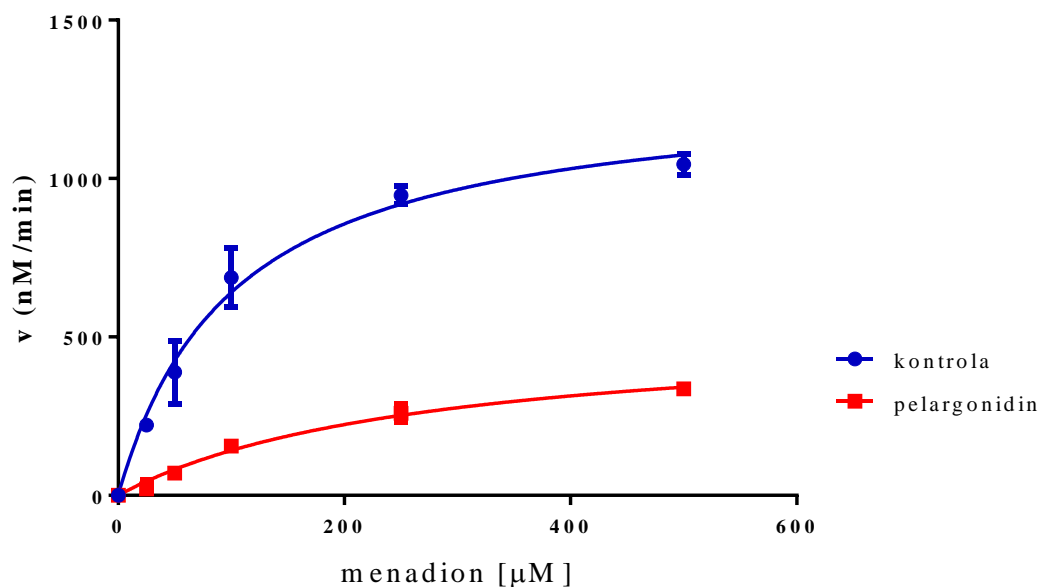
5.4.3. Určení typu inhibice

U neúčinnějších inhibitorů CBR, pelargonidinu (u potkanů) a delfinidinu (u lidí), byl dále podrobněji zkoumán mechanismus jejich inhibičního působení.

Cytosol byl inkubován s různými koncentracemi menadionu (10 – 500 μM) bez přítomnosti inhibitoru a poté s přídatkem 100 μM pelargonidinu nebo 25 μM delfinidinu. Pomocí programu GraphPad Prism byly na základě rovnice Michaelis-Mentenové získány kinetické parametry K_M a V_{MAX} pro neinhibovanou reakci a zároveň K'_M a V'_{MAX} pro inhibovanou reakci.

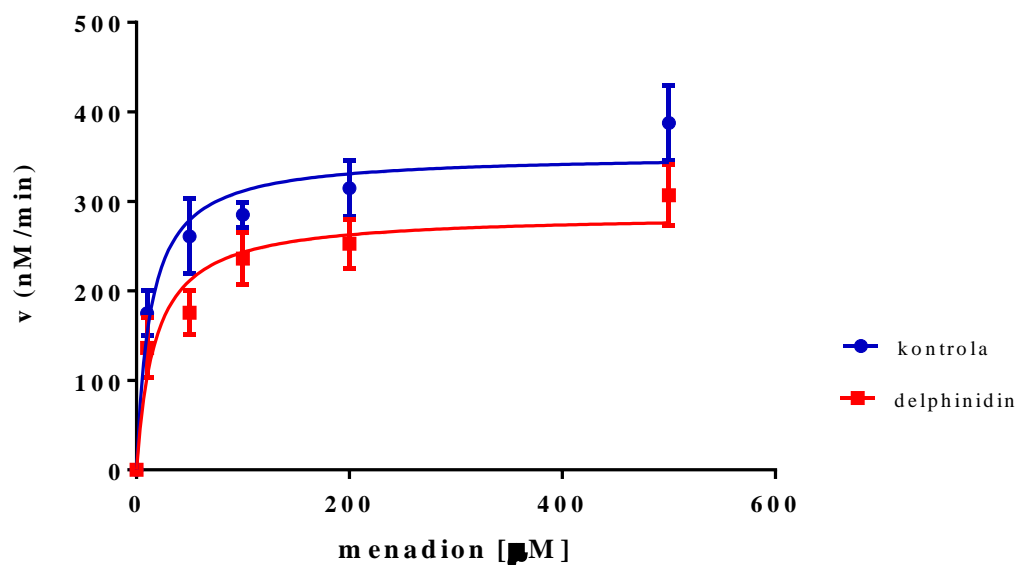
Tabulka 15 - Kinetické parametry inhibovaných a neinhibovaných reakcí

inhibitor	K_M [μM]	K'_M [μM]	V_{MAX} [nM/min]	V'_{MAX} [nM/min]
pelargonidin	102 \pm 11	272 \pm 43	1294 \pm 51	528 \pm 41
delfinidin	13 \pm 3	18 \pm 5	353 \pm 14	285 \pm 14



Obrázek 22 - Závislost aktivity CBR na množství substrátu u reakce neinhibované a inhibované pelargonidinem

Jak je patrné z grafu (Obrázek 22), závislost aktivity CBR na množství substrátu se liší u neinhibované reakce a reakce inhibované pelargonidinem. V_{MAX} inhibované reakce je nižší než V_{MAX} neinhibované reakce, což by naznačovalo nekompetitivní průběh inhibice. Hodnota K'_M je však jednoznačně vyšší než K_M a tato odlišnost Michaelisových konstant teorii nekompetitivní inhibice nepodporuje. Jedná se tedy zřejmě o typ inhibice smíšené.



Obrázek 23 - Závislost aktivity CBR na množství substrátu u reakce neinhibované a inhibované delphinidinem

Po zakreslení hodnot získaných při zkoumání mechanismu inhibice CBR delphinidinem byly získány křivky typické pro nekompetitivní průběh inhibice (Obrázek 23). Pro tuto skutečnost svědčí i to, že hodnoty Michaelisových konstant pro inhibovanou a neinhibovanou reakci K'_M a K_M jsou podobné, zatímco V'_{MAX} je nižší než V_{MAX} .

6. DISKUZE

CBR je důležitý biotransformační enzym s širokou substrátovou tolerancí. Redukcí karbonylové skupiny se podílí na metabolismu mnoha exogenních látek, mezi nimi i významných léčiv (Matsunaga et al., 2006). Přítomnost tohoto enzymu byla potvrzena v širokém spektru lidských tkání, zahrnujícím i orgány, jež se běžně nepodílejí na biotransformaci xenobiotik (Wirth and Wermuth, 1992). Je proto pravděpodobné, že kromě detoxikace škodlivin a léčiv hraje CBR roli i v endogenním metabolismu. V této souvislosti byly jako substráty CBR zkoumány např. prostaglandiny (Schieber et al., 1992) nebo isatin (Usami et al., 2001). Přesto však dosud není přesně známo, jakou funkci má CBR ve fyziologických procesech organismu.

Je prokázáno, že exprese i aktivita biotransformačních enzymů se mohou lišit u různých jedinců, stejně tak jako se mohou měnit u konkrétního organismu v průběhu života. Tyto odlišnosti nejčastěji souvisejí s věkem, pohlavím, genetickými faktory, stravou a patofyziologickými podmínkami. Změny v expresi či aktivitě jaterních biotransformačních enzymů významně ovlivňují metabolismus a následně i biologický efekt mnoha léčiv. To ve svém důsledku vede k rozdílné efektivitě a bezpečnosti léčby pacientů či k různým lékovým interakcím (Yun et al., 2010).

Aktivitu enzymů mohou kromě výše uvedených faktorů ovlivňovat také látky fungující jako inhibitory těchto enzymů. Tyto inhibitory bývají často součástí léčiv nebo potravy. Inhibicí enzymu je potlačena metabolizace substrátu, například léčivé látky, což má často zásadní farmakologické i toxikologické důsledky, jako je např. prodloužený biologický poločas léčiva (Boušová et al., 2012; Eaton et al., 1996).

CBR patří k důležitým detoxikačním enzymům, protože metabolizuje molekuly xenobiotik na snáze konjugovatelné hydroxysloučeniny, čímž urychluje eliminaci těchto potenciálně toxických látek (Oppermann, 2007). Pro efektivní a bezpečnou terapii léčivem, jež patří mezi substráty CBR, je důležitá znalost okolností, které mohou ovlivňovat expresi a aktivitu CBR u lidí či u zvířat. Proto byly cíle této diplomové práce zaměřeny na získání informací o rozdílech v expresi a aktivitě CBR u mladých a starých jedinců a dále pak na posouzení inhibičního vlivu anthokyanidinů na aktivitu CBR u lidí a potkanů. Nové poznatky v této oblasti by mohly přispět k rozšíření vědomostí o vlastnostech CBR a o metabolismu jejích substrátů.

Věk, jako jeden z důležitých faktorů, může ovlivnit farmakokinetiku léčiva. Stárnutí je spojeno se změnami ve stavbě těla, ve smyslu zvýšení množství tělesného tuku a snížení obsahu vody. Klesá také průtok krve játry a ledvinami, což zřejmě snižuje hepatální a renální exkreci léčiv a redukce jaterní hmoty zase může způsobit pokles metabolické činnosti (Benedetti et al., 2007; Klotz, 2009).

Bylo již uskutečněno mnoho studií, jež měly za cíl objasnit souvislost věku organismu a aktivity jeho biotransformačních enzymů. Zaměřovaly se dosud především na zkoumání cytochromů P450 (CYP). V těchto studiích bylo opakovaně dokázáno, že se zvyšujícím se věkem dochází k poklesu aktivity u různých isoform CYP u lidí i u zvířat, a proto může docházet k omezení oxidativní biotransformace některých léčiv (Tanaka, 1998; Warrington et al., 2004; Yun et al., 2010). Na druhou stranu existují i výzkumy, z nichž vyplývá, že aktivity biotransformačních enzymů je srovnatelná u mladých a starých jedinců, a nemění se tedy v přímé závislosti na věku (Schmucker, 2001; Woodhouse et al., 1984). Jednou ze skutečností, které by mohly zastírat případné rozdíly související s věkem, je fakt, že činnost jaterních enzymů vykazuje ve stáří signifikantně zvýšenou interindividuální variabilitu (Schmucker, 2001). Naše vědomosti o změnách aktivity biotransformačních enzymů v souvislosti s vyšším věkem zatím zůstávají omezené, a to zejména u enzymů nepatřících k CYP, např. u enzymů redukčních. Doposud získané informace vztahující se k této problematice podrobně shrnují ve svých pracích například autoři Benedetti (2007) a Klotz (2009).

Změnám aktivity CBR souvisejícím s věkem nebylo zatím věnováno moc pozornosti, přestože se tento enzym podílí na biotransformaci širokého spektra xenobiotik obsahujících karbonylovou skupinu. Inazu a Fuji (1993) například publikovali výsledky, které ukazují, že aktivita testikulární CBR u potkanů dosahuje vrcholu ve věku 3 týdnů, poté prudce klesá a následně zůstává nezměněna do 20. týdne věku. Gonzalez-Covarrubias et al. (2006) sledovali rozdíly exprese i aktivity jaterní CBR u bělochů a černochů. Okrajově se výzkum zabýval i otázkou, zda věk několika pediatrických dárců ovlivnil výsledky experimentu. Nebyla však odhalena žádná signifikantní změna aktivity enzymu v souvislosti s věkem, stejně jako nebyly nalezené významné rozdíly v aktivitě CBR u dárců různé barvy pleti.

Tato diplomová práce se podrobněji zaměřuje na hledání rozdílů v činnosti jaterní CBR u starých a mladých jedinců. Pro účely této práce byla aktivita CBR měřena spektrofluorometricky v potkaní a lidské cytosolické frakci jaterního homogenátu, za použití menadionu jako specifického substrátu. U starých potkanů bylo zaznamenáno

zvýšení aktivity CBR v průměru o 157 % oproti mladým jedincům. S vyšším věkem také výrazně vzrostla interindividuální variabilita. Rozdíl aktivity mezi dvěma starými potkany dosahoval až 189 % oproti skupině mladých, kde byla tato hodnota maximálně 69 %.

Odlišná situace byla zjištěna při měření aktivity CBR v lidském cytosolu. U člověka nebyla pozorována souvislost mezi vyšší věku a aktivitou CBR, tak jako tomu bylo u potkanů. Nejvyšší hodnota specifické enzymové aktivity 37 ± 5 (nmol menadionu/min/mg proteinu) byla naměřena u mladého člověka, naopak nejnižší 27 ± 1 (nmol menadionu/min/mg proteinu) u vzorku cytosolu starého člověka. Z těchto výsledků však nelze vyvozovat jakýkoli závěr týkající se závislosti aktivity CBR na věku člověka, protože v rámci obou skupin, mladých i starých lidí, se hodnoty aktivity lišily v průměru pouze o 20 %. Dá se říci, že aktivita CBR byla srovnatelná u všech lidských vzorků, a nebyly tedy pozorovány signifikantní rozdíly v souvislosti s věkem ani větší odchylky interindividuální.

Je zřejmé, že informace o činnosti biotransformačních enzymů musíme vždy posuzovat v kontextu konkrétního živočišného druhu. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že zatímco u potkanů by zvýšená aktivita CBR ve stáří mohla hrát roli ve farmakokinetice některých léčiv, u lidí se toto zdá nepravděpodobné. Jednou z možných hypotéz vysvětlujících vyšší aktivity CBR u starých potkanů je schopnost organismu přizpůsobit se vnějším podmínkám. Činnost CBR jako detoxikačního a antioxidačního enzymu by mohla být stimulována častějším stykem jedince s exogenními substráty.

Jedním z faktorů, které mohou ovlivnit výsledky terapie, jsou rozdíly v expresi biotransformačních enzymů. Například Kassner et al. (2008) uvádějí, že exprese CBR, důležité reductasy antineoplastika doxorubicinu (DOX), se v lidské jaterní tkáni různých dárců podstatně lišila. Byly zjištěny i rozdíly v množství redukovaného DOX mezi jedinci, avšak signifikantní souvislost mezi mírou exprese CBR a její redukční aktivitou byla nalezena pouze u šesti z devíti individuálních western blotů. Je jisté, že interindividuálně rozdílná farmakokinetika DOX může ovlivnit jak antitumorový efekt léčby, tak riziko kardiotoxicity způsobené redukovaným metabolitem DOX (Kassner et al., 2008).

Jedním z cílů této diplomové práce bylo porovnat expresi CBR u starých a mladých potkanů. Za účelem rozdělení proteinů obsažených v cytosolu podle relativní molekulové hmotnosti byla provedena SDS-PAGE elektroforéza. Poté byly bílkoviny z gelu přebíjeny na nitrocelulózovou membránu a na CBR byla navázána primární

protilátka. Detekce byla uskutečněna chemiluminiscenčně pomocí sekundární protilátky konjugované s alkalickou fosfatase. U výsledných blotů byla provedena denzitometrická kvantifikace pomocí softwaru One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), při níž byl jako kontrolní protein použit β -aktin. Takto bylo zjištěno insignifikantně vyšší množství proteinu CBR u starých potkanů. Také však byly zaznamenány poměrně velké interindividuální rozdíly mezi jedinci. Výsledek experimentu naznačuje, že exprese CBR by se v závislosti na věku mohla zvyšovat a ovlivňovat tak biotransformaci. Bude však nutné provést další studie, které by potvrdily, nebo vyvrátily tuto hypotézu.

Anthokyanidiny jsou aglykony rostlinných barviv anthokyanů, které jsou považovány za největší a nejdůležitější skupinu flavonoidů (Markakis, 1982). Pro své příznivé účinky na lidské zdraví se často stávají součástí doplňků stravy, díky jejichž konzumaci denní příjem anthokyanů často převyšuje množství přijaté v běžné stravě (Wang and Stoner, 2008). Je známo, že anthokyaniny a flavonoidy obecně mají schopnost inhibovat biotransformační enzymy a ovlivňovat jejich expresi (Rodríguez-Fragoso et al., 2011). To může vést k ovlivnění metabolismu enzymových substrátů a způsobovat např. neočekávané lékové interakce (Boušová and Skálová, 2012; Moon et al., 2006).

Studie zabývající se těmito jevy se však dosud spíše než na anthokyaniny zaměřovaly na jiné skupiny flavonoidů, např. na flavony, flavonoly a isoflavony. U anthokyanů a anthokyaninů byl jejich inhibiční potenciál studován především ve spojitosti s CYP, kde se většinou projeví jako slabší inhibitory isoform CYP v porovnání s jinými polyfenolickými látkami (Dreiseitel et al., 2008; Kimura et al., 2010; Sand et al., 2010). Protože vliv těchto látek na CBR nebyl dosud podrobněji studován, bylo jedním z cílů této diplomové práce zjistit, jaký inhibiční efekt vůči CBR vykazují čtyři hojně se vyskytující anthokyanidiny (delfinidin, cyanidin, malvinidin a pelargonidin).

Výsledky této práce ukazují, že anthokyanidiny působí jako mírné až středně silné inhibitory CBR v potkaním i lidském cytosolu. U mladých potkanů byla aktivita CBR vůči menadionu (o koncentraci 500 μ M) po přidání anthokyanidů o koncentraci 100 μ M do reakční směsi snížena o 25-75 %. U starých potkanů byla inhibice jen o málo vyšší, v rozmezí 30-80 %. U obou věkových skupin potkanů se jako nejsilnější inhibitor projevil pelargonidin, u nějž byla pro mladé potkany stanovena IC_{50} rovna 23 μ M a zjištěn smíšený typ inhibice. Největší rozdíl mezi skupinami mladých a starých potkanů byl zaznamenán v inhibičním vlivu cyanidinu. Zatímco u starých se projevil

jako druhý nejúčinnější inhibitor a snížil aktivitu CBR o 75 %, u mladých to bylo pouze o 45 %. Z tohoto výsledku můžeme usuzovat, že existují jisté rozdíly ve vnímavosti jednotlivců či skupin k jednotlivým inhibitorům.

CBR v lidských vzorcích byla nejvíce inhibována delfinidinem, který při koncentraci 100 μM zcela potlačil aktivitu enzymu. Na druhou stranu ostatní anthokyanidiny působily pouze jako slabé inhibitory a snížily aktivitu CBR přibližně o 30 %. Pelargonidin, který působil nejsilnější inhibicí u potkanů, se u lidí projevil jako nejslabší inhibitor, což dokládá, že inhibiční vliv anthokyanidinů se liší u jednotlivých živočišných druhů.

Pro delfinidin byla dále stanovena IC_{50} rovna 16 μM a byl také zjištěn nekompetitivní průběh inhibice. Hodnota IC_{50} je asi 30krát nižší než koncentrace substrátu a svědčí o významné schopnosti delfinidinu snižovat metabolismus léčiv, která jsou substráty CBR.

V jiné studii byly jako silnější inhibitory CBR odhaleny katechiny, konkrétně (-)-epigallokatechin galát s $\text{IC}_{50} = 0,6$ a epikatechin galát s $\text{IC}_{50} = 2,3$ μM při koncentraci substrátu 200 μM (Huang et al., 2010). Nejen katechinům, ale i dalším flavonoidům je dnes věnována pozornost jako potenciálním kardioprotektivním látkám při léčbě anhracyklinovými cytostatiky. Existuje předpoklad, že podáváním inhibitorů CBR při léčbě DOX nebo DAU by se mohl snížit vznik kardiotoxických alkoholických metabolitů a zároveň zvýšit antitumorové účinky. Jako látka slibná pro praktické užití je testován například flavonoid 7-monohydroxyethylrutosid (Gonzalez-Covarrubias et al., 2006).

V porovnání s těmito flavonoidy se u anthokyanidinů projevuje nižší schopnost inhibice CBR. Riziko zásadního ovlivnění metabolismu substrátů CBR je u nich tedy pravděpodobně relativně nízké. Stejně tak zřejmě anthokyanidiny nebudou nejvhodnějšími kandidáty pro zefektivnění léčby anhracyklinovými chemoterapeutiky. Přesto by bylo vhodné pokračovat v podrobnějším studiu této skupiny flavonoidů a jejího vlivu na činnost CBR.

7. ZÁVĚR

Dosažené výsledky lze shrnout do následujících bodů:

- U starých potkanů byla zjištěna vyšší aktivita CBR než u mladých potkanů. Projevila se u nich také větší interindividuální variabilita. Je možné, že u potkanů dochází zatím neznámými mechanismy ke zvýšení aktivity CBR v závislosti na věku a z tohoto důvodu může docházet k rozdílné metabolizaci substrátů.
- U člověka nebyly nalezeny změny aktivity CBR v souvislosti s věkem. U skupiny mladých i starých lidí byly aktivity CBR srovnatelné.
- Exprese CBR byla u starých potkanů nesignifikantně vyšší než u mladých potkanů.
- Anthokyanidiny působily při experimentech jako slabé až středně silné inhibitory CBR. Ze zkoumaných látek působil jako nejsilnější inhibitor u lidí delfinidin ($IC_{50} = 16 \mu M$) a u potkanů pelargonidin ($IC_{50} 23 \mu M$) při koncentraci substrátu $500 \mu M$.
- Delfinidin působil jako nekompetitivní inhibitor CBR, zatímco pelargonidin vykazoval smíšený typ inhibice CBR.

SEZNAM ZKRATEK

- 11 β -HDS – 11 β -hydroxysteroidní dehydrogenasa
3 α -HDS – 3 α -hydroxysteroidní dehydrogenasa
AA – akrylamid
AKR – aldo-ketoreduktasy
ALDH – aldehyd-dehydrogenasa
ANP – atriální natriuretický peptid
AP – (Alkaline Phosphatase) – alkalická fosfatasa
APS – (Ammonium Persulfate) – persíran amonný
ARE/EpRE – (Antioxidant/Electrophile Response Element) – antioxidační a elektrofilní
responsní element
BCA – (Bicinchoninic Acid) – kyselina bicinchoninová
Bis-AA – bis-akrylamid
BPB – (Bromophenol Blue) – bromfenolová modř
BSA – bovinní sérový albumin
CBR – (Carbonyl Reductase) – karbonylreduktasa
CYP – cytochrom P450
DAU – daunorubicin
DMSO – dimethylsulfoxid
DOX – doxorubicin
EC kód – označení enzymu podle Enzyme Commision
GSH – glutathion
GST – glutation-S-transferasa
IC50 – koncentrace vyvolávající 50 % inhibici daného parametru
NADPH – redukovaná forma nikotinamid adenin dinukleotidfosfátu
PG – prostaglandin
ROS – (Reactive Oxygen Species) – reaktivní formy kyslíku
SD – (Standard Deviation) – směrodatná odchylka
SDR – (Short-chain Dehydrogenases/Reductases) – dehydrogenasy a reduktasy
s krátkým řetězcem

SDS – (Sodium Dodecyl Sulfate) – dodecylsulfát sodný

SDS-PAGE elektroforéza – (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) – elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným

TBS – (Tris-Buffered Saline) – Tris pufr obsahující chlorid sodný

TBST – (Tris-Buffered Saline with Tween 20) – Tris pufr obsahující chlorid sodný a Tween 20

TEMED – tetramethylethylenediamin

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan

Tween 20 – polysorbát, polyoxyethylen sorbitan monolaurát

UGT – UDP-glukuronosyltransferasa

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Monografie:

- Anzenbacher, P., Zanger, U.M., 2012. *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. 1. vydání, Wiley, Hoboken, NJ, USA.
- Augusti, K.T., Faizal, P., Suneesh, K., 2009. *Role of Dietary Fibers and Nutraceuticals in Preventing Diseases*. 1. vydání, Global Media, Hyderabad, IND.
- Markakis, P., 1982. *Anthocyanins as Food Colors*. 1. vydání, Elsevier.
- Nassar, A.F., 2010. *Biotransformation and Metabolite Elucidation of Xenobiotics: Characterization and Identification*. 1. vydání, Wiley, Hoboken, NJ, USA.
- Xu, Z., Howard, L.R., 2012. *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*. 1. vydání, Wiley-Blackwell, Somerset, NJ, USA.

Časopisy:

- Atalla, A., Breyer-Pfaff, U., Maser, E., 2000. Purification and characterization of oxidoreductases-catalyzing carbonyl reduction of the tobacco-specific nitrosamine 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human liver cytosol. *Xenobiotica; The Fate Of Foreign Compounds In Biological Systems* 30, 755–769.
- Bagchi, D., Sen, C.K., Bagchi, M., Atalay, M., 2004. Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry Mosc.* 69, 75–80.
- Barski, O.A., Tipparaju, S.M., Bhatnagar, A., 2008. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metab. Rev.* 40, 553–624.
- Bast, A., Haenen, G.R.M.M., Bruynzeel, A.M.E., Vijgh, W.J.F., 2007. Protection by flavonoids against anthracycline cardiotoxicity: from chemistry to clinical trials. *Cardiovascular Toxicology* 7, 154–159.
- Bateman, R.L., Rauh, D., Tavshanjian, B., Shokat, K.M., 2008. Human carbonyl reductase 1 is an S-nitrosoglutathione reductase. *J. Biol. Chem.* 283, 35756–35762.
- Bauman, D.R., Steckelbroeck, S., Penning, T.M., 2004. The roles of aldo-keto reductases in steroid hormone action. *Drug News Perspect.* 17, 563–578.
- Benedetti, M.S., Whomsley, R., Canning, M., 2007. Drug metabolism in the paediatric population and in the elderly. *Drug Discov. Today* 12, 599–610.
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., Monks, T.J., 2000. Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 135–160.
- Boušová, I., Hájek, J., Dršata, J., Skálová, L., 2012. Naturally occurring flavonoids as inhibitors of purified cytosolic glutathione S-transferase. *Xenobiotica* 42, 872–879.
- Boušová, I., Skálová, L., 2012. Inhibition and induction of glutathione S-transferases by flavonoids: possible pharmacological and toxicological consequences. *Drug Metab. Rev.* 44, 267–286.

- Bowen-Forbes, C.S., Zhang, Y., Nair, M.G., 2010. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 554–560.
- Carlquist, M., Frejd, T., Gorwa-Grauslund, M.F., 2008. Flavonoids as inhibitors of human carbonyl reductase 1. *Chem. Biol. Interact.* 174, 98–108.
- Curin, Y., Andriantsitohaina, R., 2005. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacol Rep* 57 Suppl, 97–107.
- Doorn, J.A., Petersen, D.R., 2002. Covalent modification of amino acid nucleophiles by the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1445–1450.
- Dreiseitel, A., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak, G., Sand, P.G., 2008. Anthocyanins and their metabolites are weak inhibitors of cytochrome P450 3A4. *Mol Nutr Food Res* 52, 1428–1433.
- Eaton, E.A., Walle, U.K., Lewis, A.J., Hudson, T., Wilson, A.A., Walle, T., 1996. Flavonoids, potent inhibitors of the human P-form phenolsulfotransferase. Potential role in drug metabolism and chemoprevention. *Drug Metab Dispos* 24, 232–237.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., Dianzani, M.U., Poli, G., Slater, T.F., 1982. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochem. J.* 208, 129–140.
- Fimognari, C., Berti, F., Nüsse, M., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P., 2004. Induction of apoptosis in two human leukemia cell lines as well as differentiation in human promyelocytic cells by cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside. *Biochem. Pharmacol.* 67, 2047–2056.
- Forrest, G.L., Gonzalez, B., 2000. Carbonyl reductase. *Chem. Biol. Interact.* 129, 21–40.
- Gavelová, M., Hladíková, J., Vildová, L., Novotná, R., Vondráček, J., Kremár, P., Machala, M., Skálová, L., 2008. Reduction of doxorubicin and oracin and induction of carbonyl reductase in human breast carcinoma MCF-7 cells. *Chem. Biol. Interact.* 176, 9–18.
- Gonzalez-Covarrubias, V., Kalabus, J.L., Blanco, J.G., 2008. Inhibition of polymorphic human carbonyl reductase 1 (CBR1) by the cardioprotectant flavonoid 7-mono-hydroxyethyl rutoside (monoHER). *Pharm. Res.* 25, 1730–1734.
- Gonzalez-Covarrubias, V., Lakhman, S.S., Forrest, A., Relling, M.V., Blanco, J.G., 2006. Higher activity of polymorphic NAD(P)H:quinone oxidoreductase in liver cytosols from blacks compared to whites. *Toxicol. Lett.* 164, 249–258.
- Hayeshi, R., Mutingwende, I., Mavengere, W., Masiyanise, V., Mukanganyama, S., 2007. The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin. *Food Chem. Toxicol.* 45, 286–295.
- He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M.J., Duan, C.-Q., 2012. Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules* 17, 1571–1601.
- He, J., Giusti, M.M., 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annu Rev Food Sci Technol* 1, 163–187.
- Hidaka, M., Okumura, M., Fujita, K.-I., Ogikubo, T., Yamasaki, K., Iwakiri, T., Setoguchi, N., Arimori, K., 2005. Effects of pomegranate juice on human cytochrome p450 3A (CYP3A) and carbamazepine pharmacokinetics in rats. *Drug Metab. Dispos.* 33, 644–648.

- Hoffmann, F., Maser, E., 2007. Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metab. Rev.* 39, 87–144.
- Hrdina, R., Gersl, V., Klimtová, I., Šimůnek, T., Machácková, J., Adamcová, M., 2000. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 43, 75–82.
- Huang, W., Ding, L., Huang, Q., Hu, H., Liu, S., Yang, X., Hu, X., Dang, Y., Shen, S., Li, J., Ji, X., Jiang, S., Liu, J.O., Yu, L., 2010. Carbonyl reductase 1 as a novel target of (–)-epigallocatechin gallate against hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 52, 703–714.
- Hüsken, B.C., de Jong, J., Beekman, B., Onderwater, R.C., van der Vijgh, W.J., Bast, A., 1995. Modulation of the in vitro cardiotoxicity of doxorubicin by flavonoids. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 37, 55–62.
- Hwang, Y.P., Choi, J.H., Yun, H.J., Han, E.H., Kim, H.G., Kim, J.Y., Park, B.H., Khanal, T., Choi, J.M., Chung, Y.C., Jeong, H.G., 2011. Anthocyanins from purple sweet potato attenuate dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes and reducing COX-2 and iNOS expression. *Food and Chemical Toxicology* 49, 93–99.
- Inazu, N., Fujii, T., 1993. Effects of age and calcium ion on testis carbonyl reductase in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 63, 65–71.
- Jarabak, R., Harvey, R.G., Jarabak, J., 1998. Redox cycling of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones: metal ion-catalyzed oxidation of catechols bypasses inhibition by superoxide dismutase. *Chem. Biol. Interact.* 115, 201–213.
- Jez, J.M., Flynn, T.G., Penning, T.M., 1997. A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. Pharmacol.* 54, 639–647.
- Jin, Y., Penning, T.M., 2007. Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 263–292.
- Jörnvall, H., Höög, J.O., Persson, B., 1999. SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett.* 445, 261–264.
- Kaiserová, H., Šimůnek, T., van der Vijgh, W.J.F., Bast, Aalt, Kvasničková, E., 2007. Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 1065–1074.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Persson, B., 2010. Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models. *FEBS J.* 277, 2375–2386.
- Kassner, N., Huse, K., Martin, H.-J., Gödtel-Armbrust, U., Metzger, A., Meineke, I., Brockmöller, J., Klein, K., Zanger, U.M., Maser, E., Wojnowski, L., 2008. Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver. *Drug Metab. Dispos.* 36, 2113–2120.
- Kavanagh, K.L., Jörnvall, H., Persson, B., Oppermann, U., 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cell Mol Life Sci* 65, 3895–3906.
- Kim, H., Yoon, Y.-J., Shon, J.-H., Cha, I.-J., Shin, J.-G., Liu, K.-H., 2006. Inhibitory effects of fruit juices on CYP3A activity. *Drug Metab. Dispos.* 34, 521–523.
- Kimura, Y., Ito, H., Ohnishi, R., Hatano, T., 2010. Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *Food Chem. Toxicol.* 48, 429–435.
- Kitagawa, S., 2006. Inhibitory effects of polyphenols on p-glycoprotein-mediated transport. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1–6.

- Klotz, U., 2009. Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. *Drug Metab. Rev.* 41, 67–76.
- Kong, A.N., Owuor, E., Yu, R., Hebbar, V., Chen, C., Hu, R., Mandlekar, S., 2001. Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Metab. Rev.* 33, 255–271.
- Kowalczyk, E., Krzesiński, P., Kura, M., Szmigiel, B., Błaszczuk, J., 2003. Anthocyanins in medicine. *Pol J Pharmacol* 55, 699–702.
- Krook, M., Ghosh, D., Strömberg, R., Carlquist, M., Jörnvall, H., 1993. Carboxyethyllysine in a protein: native carbonyl reductase/NADP(+)-dependent prostaglandin dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 502–506.
- Lamson, D.W., Plaza, S.M., 2003. The anticancer effects of vitamin K. *Altern Med Rev* 8, 303–318.
- Lee, S.C., Levine, L., 1974. Prostaglandin metabolism. I. Cytoplasmic reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent and microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent prostaglandin E 9-ketoreductase activities in monkey and pigeon tissues. *J. Biol. Chem.* 249, 1369–1375.
- Lin, D., Lee, H., Liu, Q., Perry, G., Smith, M.A., Sayre, L.M., 2005. 4-Oxo-2-nonenal is both more neurotoxic and more protein reactive than 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1219–1231.
- Liu, Q., Raina, A.K., Smith, M.A., Sayre, L.M., Perry, G., 2003. Hydroxynonenal, toxic carbonyls, and Alzheimer disease. *Mol. Aspects Med.* 24, 305–313.
- Malátková, P., Maser, E., Wsól, V., 2010. Human carbonyl reductases. *Curr. Drug Metab.* 11, 639–658.
- Maté, L., Virkel, G., Lifschitz, A., Ballent, M., Lanusse, C., 2008. Hepatic and extra-hepatic metabolic pathways involved in flubendazole biotransformation in sheep. *Biochem. Pharmacol.* 76, 773–783.
- Matsunaga, T., Shintani, S., Hara, A., 2006. Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 1–18.
- Medvedev, A., Buneeva, O., Glover, V., 2007. Biological targets for isatin and its analogues: Implications for therapy. *Biologics* 1, 151–162.
- Medvedev, A., Igosheva, N., Crumeyrolle-Arias, M., Glover, V., 2005. Isatin: role in stress and anxiety. *Stress* 8, 175–183.
- Meyers, K.J., Watkins, C.B., Pritts, M.P., Liu, R.H., 2003. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6887–6892.
- Moon, Y.J., Wang, X., Morris, M.E., 2006. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* 20, 187–210.
- Moummou, H., Kallberg, Y., Tonfack, L.B., Persson, B., van der Rest, B., 2012. The plant short-chain dehydrogenase (SDR) superfamily: genome-wide inventory and diversification patterns. *BMC Plant Biol.* 12, 219.
- Nabae, K., Hayashi, S.-M., Kawabe, M., Ichihara, T., Hagiwara, A., Tamano, S., Tsushima, Y., Uchida, K., Koda, T., Nakamura, M., Ogawa, K., Shirai, T., 2008. A 90-day oral toxicity study of purple corn color, a natural food colorant, in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.* 46, 774–780.
- Ngo, N., Yan, Z., Graf, T.N., Carrizosa, D.R., Kashuba, A.D.M., Dees, E.C., Oberlies, N.H., Paine, M.F., 2009. Identification of a cranberry juice product that inhibits enteric CYP3A-mediated first-pass metabolism in humans. *Drug Metab. Dispos.* 37, 514–522.

- Nobel, S., Abrahmsen, L., Oppermann, U., 2001. Metabolic conversion as a pre-receptor control mechanism for lipophilic hormones. *Eur. J. Biochem.* 268, 4113–4125.
- Ohara, H., Miyabe, Y., Deyashiki, Y., Matsuura, K., Hara, A., 1995. Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonyl reductase and aldehyde reductase of human liver. *Biochem. Pharmacol.* 50, 221–227.
- Olson, R.D., Mushlin, P.S., Brenner, D.E., Fleischer, S., Cusack, B.J., Chang, B.K., Boucek, R.J., 1988. Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 3585–3589.
- Oppermann, U., 2007. Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 293–322.
- Oppermann, U., Nagel, G., Belai, I., Bueld, J.E., Genti-Raimondi, S., Koolman, J., Netter, K.J., Maser, E., 1998. Carbonyl reduction of an anti-insect agent imidazole analogue of metyrapone in soil bacteria, invertebrate and vertebrate species. *Chem. Biol. Interact.* 114, 211–224.
- Oppermann, U., Maser, E., 1996. Characterization of a 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *Eur. J. Biochem.* 241, 744–749.
- Owuor, E.D., Kong, A.-N.T., 2002. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* 64, 765–770.
- Parry, J.D., Pointon, A.V., Lutz, U., Teichert, F., Charlwood, J.K., Chan, P.H., Athersuch, T.J., Taylor, E.L., Singh, R., Luo, J., Phillips, K.M., Vetillard, A., Lyon, J.J., Keun, H.C., Lutz, W.K., Gant, T.W., 2009. Pivotal role for two electron reduction in 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone and 2-methyl-1,4-naphthoquinone metabolism and kinetics in vivo that prevents liver redox stress. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 717–725.
- Persson, B., Kallberg, Y., 2013. Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem. Biol. Interact.* 202, 111–115.
- Persson, B., Kallberg, Y., Bray, J.E., Bruford, E., Dellaporta, S.L., Favia, A.D., Duarte, R.G., Jörnvall, Hans, Kavanagh, K.L., Kedishvili, N., Kisiela, M., Maser, E., Mindnich, R., Orchard, S., Penning, T.M., Thornton, J.M., Adamski, J., Oppermann, U., 2009. The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chem. Biol. Interact.* 178, 94–98.
- Persson, B., Krook, M., Jörnvall, H., 1991. Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur. J. Biochem.* 200, 537–543.
- Reed, J., 2002. Cranberry flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42, 301–16.
- Ris, M.M., von Wartburg, J.P., 1973. Heterogeneity of NADPH-dependent aldehyde reductase from human and rat brain. *Eur. J. Biochem.* 37, 69–77.
- Rodeiro, I., Donato, M.T., Lahoz, A., Garrido, G., Delgado, R., Gómez-Lechón, M.J., 2008. Interactions of polyphenols with the P450 system: possible implications on human therapeutics. *Mini Rev Med Chem* 8, 97–106.
- Rodríguez-Fragoso, L., Martínez-Arismendi, J.L., Orozco-Bustos, D., Reyes-Esparza, J., Torres, E., Burchiel, S.W., 2011. Potential Risks Resulting from Fruit/Vegetable–Drug Interactions: Effects on Drug-Metabolizing Enzymes and Drug Transporters. *Journal of Food Science* 76, R112–R124.

- Sand, P.G., Dreiseitel, A., Stang, M., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak, G., 2010. Cytochrome P450 2C19 inhibitory activity of common berry constituents. *Phytother Res* 24, 304–307.
- Sciotti, M.A., Nakajin, S., Wermuth, B., Baker, M.E., 2000. Mutation of threonine-241 to proline eliminates autocatalytic modification of human carbonyl reductase. *Biochem. J.* 350 Pt 1, 89–92.
- Seeram, N.P., Nair, M.G., 2002. Inhibition of Lipid Peroxidation and Structure–Activity-Related Studies of the Dietary Constituents Anthocyanins, Anthocyanidins, and Catechins. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5308–5312.
- Shih, P.-H., Yeh, C.-T., Yen, G.-C., 2005. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem. Toxicol.* 43, 1557–1566.
- Schieber, A., Frank, R.W., Ghisla, S., 1992. Purification and properties of prostaglandin 9-ketoreductase from pig and human kidney. Identity with human carbonyl reductase. *Eur. J. Biochem.* 206, 491–502.
- Schmucker, D.L., 2001. Liver function and phase I drug metabolism in the elderly: a paradox. *Drugs Aging* 18, 837–851.
- Srivastava, A., Akoh, C.C., Fischer, J., Krewer, G., 2007. Effect of Anthocyanin Fractions from Selected Cultivars of Georgia-Grown Blueberries on Apoptosis and Phase II Enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 55, 3180–3185.
- Szotáková, B., Bártíková, H., Hlaváčová, J., Boušová, I., Skálová, L., 2013. Inhibitory effect of anthocyanidins on hepatic glutathione S-transferase, UDP-glucuronosyltransferase and carbonyl reductase activities in rat and human. *Xenobiotica*.
- Tanaka, 1998. In vivo age-related changes in hepatic drug-oxidizing capacity in humans. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 23, 247–255.
- Thijssen, H.H.W., Vervoort, L.M.T., Schurgers, L.J., Shearer, M.J., 2006. Menadione is a metabolite of oral vitamin K. *Br. J. Nutr.* 95, 260–266.
- Usami, N., Kitahara, K., Ishikura, S., Nagano, M., Sakai, S., Hara, A., 2001. Characterization of a major form of human isatin reductase and the reduced metabolite. *Eur. J. Biochem.* 268, 5755–5763.
- Vamanu, E., Nita, S., 2013. Antioxidant Capacity and the Correlation with Major Phenolic Compounds, Anthocyanin, and Tocopherol Content in Various Extracts from the Wild Edible *Boletus edulis* Mushroom. *Biomed Res Int* 2013.
- Wang, G.-X., Wang, Y.-X., Zhou, X.-B., Korth, M., 2001. Effects of doxorubicin on excitation–contraction coupling in guinea pig ventricular myocytes. *European Journal of Pharmacology* 423, 99–107.
- Wang, L.-S., Stoner, G.D., 2008. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett* 269, 281–290.
- Warrington, J.S., Greenblatt, D.J., von Moltke, L.L., 2004. Age-related differences in CYP3A expression and activity in the rat liver, intestine, and kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 720–729.
- Wermuth, B., 1981. Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. Relationship to prostaglandin 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase. *J. Biol. Chem.* 256, 1206–1213.
- Wermuth, B., Bohren, K.M., Ernst, E., 1993. Autocatalytic modification of human carbonyl reductase by 2-oxocarboxylic acids. *FEBS Lett.* 335, 151–154.
- Wermuth, B., Bohren, K.M., Heinemann, G., von Wartburg, J.P., Gabbay, K.H., 1988. Human carbonyl reductase. Nucleotide sequence analysis of a cDNA and amino acid sequence of the encoded protein. *J. Biol. Chem.* 263, 16185–16188.

- Wermuth, B., Platts, K.L., Seidel, A., Oesch, F., 1986. Carbonyl reductase provides the enzymatic basis of quinone detoxication in man. *Biochem. Pharmacol.* 35, 1277–1282.
- Wiedemann, K., Jahn, H., Kellner, M., 2000. Effects of natriuretic peptides upon hypothalamo-pituitary-adrenocortical system activity and anxiety behaviour. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 108, 5–13.
- Wirth, H., Wermuth, B., 1992. Immunohistochemical localization of carbonyl reductase in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 1857–1863.
- Woodhouse, K.W., Mutch, E., Williams, F.M., Rawlins, M.D., James, O.F., 1984. The effect of age on pathways of drug metabolism in human liver. *Age Ageing* 13, 328–334.
- Wrolstad, R.E., Durst, R.W., Lee, J., 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology* 16, 423–428.
- Wsól, V., Szotaková, B., Martin, Hans-Joerg, Maser, E., 2007. Aldo-keto reductases (AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the carbonyl reduction of the novel anticancer drug oracin in man. *Toxicology* 238, 111–118.
- Xu, C., Li, C.Y.-T., Kong, A.-N.T., 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research* 28, 249–268.
- Yun, K.U., Oh, S.J., Oh, J.M., Kang, K.W., Myung, C.-S., Song, G.Y., Kim, B.-H., Kim, S.K., 2010. Age-related changes in hepatic expression and activity of cytochrome P450 in male rats. *Arch. Toxicol.* 84, 939–946.
- Zelinski, T., Kula, M.R., 1994. A kinetic study and application of a novel carbonyl reductase isolated from *Rhodococcus erythropolis*. *Bioorg. Med. Chem.* 2, 421–428.
- Zhang, Y., Vareed, S.K., Nair, M.G., 2005. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sci.* 76, 1465–1472.

Internetové zdroje:

- Carbonyl reductase [NADPH] 1 - Homo sapiens (Human) [on-line databáze], URL <http://www.uniprot.org/uniprot/P16152> (cit 28.3.2013).
- Databáze SDR enzymů [on-line databáze], URL <http://www.sdr-enzymes.org/search/connectDB.php> (cit 28.3.2013).