

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: BIOCHEMIE

Studijní obor: BIOCHEMIE



**Eliška Jandová**

**Studium interakcí potravních doplňků s enzymy biotransformace  
xenobiotik**

**Interaction of food additives with xenobiotic metabolising enzymes**

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2015

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením svého školitele prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....  
Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych na prvním místě poděkovala svému školiteli panu prof. RNDr. Petru Hodkovi CSc. za cenné rady, ochotu a trpělivost při psaní této práce.

## Abstrakt

Užívání různých potravních doplňků v rámci pěstování zdravého životního stylu je v poslední době velmi populární. Přestože se většinou jedná o přírodní produkty, jejich konzumace ve velkých dávkách nemusí být vždy zdraví prospěná.

Potravní doplňky jsou velmi často flavonoidního charakteru. Flavonoidní sloučeniny se nacházejí v rostlinách a prokazatelně příznivě působí na lidské zdraví. Pro své antioxidační, antialergenní a chemopreventivní účinky jsou široce studované. V posledních letech se byly dokumentovány i negativní vlivy flavonoidů, často způsobené jejich nadměrnou konzumací. Byla mimo jiné prokázána jejich interakce s cytochromy P450, které hrají důležitou roli při biotransformaci xenobiotik. Změny v metabolismu cizorodých látek (ať už léčiv či karcinogenů) mohou způsobit vážné poškození organismu, včetně nádorového bujení. Dalším z možných bodů zásahu potravních doplňků je i cytochrom  $b_5$  (resp. NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasa), který katalytický cyklus cytochromů P450 významně ovlivňuje.

Potenciálně nebezpečné jsou i interakce potravních doplňků při vylučování cizorodých látek z organismu. Tohoto procesu se účastní složitý systém transportérů, mezi nimiž hraje velmi důležitou roli P-glykoprotein. Jejich hlavním úkolem je efluxní transmembránový přenos xenobiotik, čímž zabraňují hromadění cizorodých látek v buněčné cytoplazmě. Existují však inhibitory těchto přenašečů (mezi nimi i některé flavonoidy), které znemožňují eliminaci škodlivých látek a mohou tak způsobit vážné zdravotní komplikace.

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem vybraných flavonoidních sloučenin na lidský organismus se zaměřením na jejich chemopreventivní vlastnosti. Dále se pojednává o vlivu flavonoidů na reakční cyklus cytochromů P450, funkci cytochromu  $b_5$  (a cytochrom  $b_5$  reduktasy) a transport xenobiotik P-glykoproteiny.

**Klíčová slova:** Cytochrom P450, enzymy II. fáze biotransformace, indukce, metabolismus

## **Abstract**

Recently the use of various food supplements as a part of a healthy lifestyle has been very popular. Although most of them are natural products, their excessive consumption may not always be beneficial for health.

Dietary supplements are usually of a flavonoid character. Flavonoid compounds are found in plants and they have beneficial effects on human health. For their antioxidant, anti-allergy and chemopreventive effects they are extensively studied. However, in recent years the negative impacts of flavonoids have been described, often caused by their excessive consumption. It has been shown that they interact with cytochrome P450, which play an important role in the biotransformation of xenobiotics. The change in the metabolism of xenobiotics (whether drugs or carcinogens) can cause serious health problems, including a tumor growth. Beside cytochrome P450, there is another possible points of intervention, cytochrome b<sub>5</sub> (or NADH:cytochrome b<sub>5</sub> reductase), which effects the catalytic cycle of cytochrome P450.

Another point of potential danger is the elimination of xenobiotics out of the organism. There is a complex system of transporters, in which P-glycoprotein plays a very significant role. P-glycoprotein is involved in transmembrane efflux of xenobiotics, preventing the aggregation of these substances in the cell cytoplasm. Nevertheless, there are inhibitors of these transporters (among them also some flavonoids) that prevent the elimination of harmful substances and may cause serious health complications.

This thesis examines the influence of some flavonoid compounds on the human organism, focusing on their chemopreventive properties. In addition, the influence of flavonoids on cytochrome P450 reaction cycle, cytochrome b<sub>5</sub> (and cytochrome b<sub>5</sub> reductase) functions and on the transport of xenobiotics *via* P-glycoprotein is discussed.

**Key words:** Cytochrome P450, phase II enzymes, induction, metabolism

## Obsah

|   |    |
|---|----|
| Seznam použitých zkratk   | 7  |
| 1 Úvod  | 9  |
| 2 Cíl práce   | 10 |
| 3 Metabolismus xenobiotik   | 11 |
| 3.1 První fáze biotransformace  | 11 |
| 3.2 Druhá fáze biotransformace  | 12 |
| 4 Cytochromy P450   | 13 |
| 4.1 Klasifikace   | 13 |
| 4.2 Vlastnosti a reakce   | 14 |
| 4.3 Indukce cytochromu P450   | 15 |
| 4.4 Inhibice cytochromu P450  | 17 |
| 4.5 Cytochrom b <sub>5</sub>  | 18 |
| 4.5.1 Mechanismus účinku cytochromu b <sub>5</sub> na cytochromy P450 | 18 |
| 4.5.2 Vliv cytochromu b <sub>5</sub> na karcinogenesi                 | 19 |
| 5 ABC transportéry  | 21 |
| 5.1 P-glykoproteiny   | 23 |
| 5.1.1 Lokalizace a funkce   | 23 |
| 5.1.2 Mechanismus transportu  | 24 |
| 6 Karcinogeneze   | 26 |
| 6.1 Mechanismus karcinogeneze   | 26 |
| 6.2 Mechanismy potlačení buněčné proliferace                          | 27 |
| 7 Chemopreventivní sloučeniny   | 28 |
| 7.1 Flavonoidy  | 28 |
| 7.1.2 Účinky a toxicita flavonoidů                                    | 30 |
| 7.1.3 Vybrané flavonoidy s chemopreventivními účinky                  | 30 |
| 7.1.4 Flavonoidy a cytochromy P450                                    | 32 |
| 7.1.5 Flavonoidy a cytochromy b <sub>5</sub>                          | 33 |
| 7.1.6 Flavonoidy a ABC transportéry                                   | 34 |
| 7.1.6.1 Inhibice mnohačetné lékové rezistence                         | 35 |
| Závěr   | 36 |
| Seznam použité literatury   | 37 |

## Seznam použitých zkratk

|                    |   |
|--------------------|---|
| ABC                | superrodina aktivních transportérů poháněných hydrolyzou ATP („ATP-binding cassette“) |
| AhR                | receptor pro aromatické uhlovodíky („aryl hydrocarbon receptor“)                      |
| APS                | persíran amonný   |
| ARNT               | AhR jaderný faktor („AhR nuclear translocator“)                                       |
| ATP                | adenosintrifosfát   |
| BaP                | benzo[a]pyren   |
| CAR                | konstitutivní androstatový receptor („constitutive androstane receptor“)              |
| CYP                | cytochrom P450  |
| cyt b <sub>5</sub> | cytochrom b <sub>5</sub>  |
| DNA                | deoxyribonukleová kyselina  |
| FAD                | flavinadenindinukleotid   |
| FMO                | flavinové monooxygenasy („flavin-containing monooxygenases“)                          |
| HSP                | proteiny teplotního šoku („heat shock proteins“)                                      |
| MDR                | mnohačetná léková rezistence („multi-drug resistance“)                                |
| MFO                | system monooxygenas se smíšenou funkcí („mixed function oxidases“)                    |
| NADH               | redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidu  |
| NADPH              | redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu                                  |
| NBD                | nukleotid vázající doména P-glykoproteinu („nucleotide-binding domain“)               |

|               |   |
|---------------|---|
| P-gp          | P-glykoprotein  |
| PPAR $\alpha$ | receptor aktivovaný proliferátorem peroxisomu<br>(„peroxisome proliferator activated receptor“) |
| ROS           | reaktivní formy kyslíku („reactive oxygen species“)   |
| RXR           | retionoidní X receptor  |
| TMD           | transmembránová doména P-glykoproteinu<br>(„transmembrane domain“)                              |



## 1 Úvod

Flavonoidy jsou nejrozšířenější skupinou fenolických sloučenin nacházejících se v rostlinách, poskytují mnoho chutí a barev ovoci a zelenině, a jsou tak přirozenou složkou lidské stravy. Konzumace flavonoidů je spojována s prospěšnými účinky na lidské zdraví. Především se zkoumají jejich chemopreventivní vlastnosti a schopnost snížit riziko kardiovaskulárních chorob [1]. Nicméně epidemiologické studie posledních let přinášejí často výsledky o neprůkazné roli těchto fenolických sloučenin v lidském organismu, některé dokonce varují před jejich možnými toxickými účinky [2].

I přes přírodní původ flavonoidních sloučenin se stále jedná o cizorodé látky, které nejsou tělu vlastní a jsou v organismu metabolizovány řadou biotransformujících enzymů. Důležitá je interakce flavonoidů se systémem cytochromů P450. Některé flavonoidy jsou známy tím, že dokáží inhibovat aktivaci určitých karcinogenů, ale současně mohou indukovat cytochromy P450, které aktivují jiný typ karcinogenů. Znalost interakcí flavonoidů s cytochromy P450 je tedy velice podstatná pro pochopení jejich vlivu na lidské zdraví a pro případnou prevenci před karcinogenní aktivitou a změnami metabolismu léčivých a endogenních sloučenin [3].

Katalytický systém cytochromů P450 je mimo jiné modulován cytochromem  $b_5$ . Ačkoli přesný mechanismus není dosud znám, spekuluje se o více možnostech transportu elektronu do reakčního cyklu cytochromů P450 i o allosterické stimulaci [4]. Inhibicí cytochromu  $b_5$  by mohlo dojít k vážnému narušení metabolismu katalyzovaného cytochromy P450, a tedy i k nepříznivým změnám v metabolismu cizorodých látek, které mohou vést až k vážným zdravotním komplikacím. Bylo zjištěno, že k inhibitorům NADH:cytochrom  $b_5$  reductasy patří i některé flavonoidy (např. luteolin) [5].

Vylučování cizorodých látek a jejich metabolitů na buněčné úrovni mají za úkol specifické transportéry. Velmi často se jedná o aktivní ABC transportéry, které k transportu vyžadují dvě molekuly ATP a vyznačují se širokou specifitou. Metabolismu xenobiotik se výrazně účastní P-glykoprotein, který je známý pro tvorbu mnohačetné lékové rezistence v rakovinných buňkách. I zde hrají flavonoidy velmi podstatnou roli. Byly prokázány jak stimulující (glabridin), tak inhibující (quercetin) účinky na aktivitu P-glykoproteinu [6, 7].

## 2 Cíl práce

Lidé se každý den dostávají do styku s potravními doplňky flavonoidního charakteru a konzumují je často ve větším než doporučeném množství. Tyto látky však nemusí být zdraví prospěšné, jak by se na základě některých studií dalo očekávat. Cílem této bakalářské práce bylo shromáždit informace o různých, převážně chemopreventivních flavonoidech vyskytujících se v potravě a jejich působení v lidském organismu. Konkrétněji se zaměřuje na jejich interakce s multienzymovým systémem cytochromů P450, především s cytochromem  $b_5$ , a dále s ABC transportéry s důrazem na P-glykoproteiny.

### 3 Metabolismus xenobiotik

Člověk přijme za celý svůj život nesmírné množství chemických látek. Některé z nich jsou pro správné fungování lidského organismu nezbytné a slouží především jako zdroj energie. Avšak existují i látky cizorodé, které nejsou tělu vlastní a zdravý jedinec se bez jejich přítomnosti obejde. Takové látky nazýváme xenobiotika [8].

Xenobiotika mohou mít pozitivní (v podobě léčiv) i negativní vliv na náš organismus. O míře negativního dopadu rozhoduje především toxicita, koncentrace a doba působení dané cizorodé látky. Xenobiotikum se nejprve dýcháním, vstřebáním pokožkou či trávicím traktem dostává do krevního oběhu. Následně dochází k jeho metabolické přeměně (biotransformaci), která je do určité míry stanovena rozpustností dané látky v tucích či ve vodě [8, 9]. Mnoho cizorodých látek během biotransformace ztrácí svou biologickou aktivitu na základě zvýšení jejich hydrofility, čímž se podpoří jejich vylučování. Tento proces má dvě hlavní fáze [10].

#### 3.1 První fáze biotransformace

Hydrolytické štěpení spolu s oxidací a redukcí představují hlavní reakce první fáze biotransformace xenobiotik, která se též nazývá derivatizační. Tyto reakce zahrnují všechny metabolické procesy, které mají schopnost měnit cizorodé látky chemicky, a probíhají především v játrech. Během této fáze dochází ke zvýšení polaritě cizorodé látky, které katalyzují enzymy převážně ze skupiny monooxygenas a dioxygenas. Obě skupiny potřebují ke své aktivitě molekulu kyslíku a kofaktor [10–12].

Klíčovou funkci má systém monooxygenas se smíšenou funkcí („mixed function oxygenases“, MFO) obsahující cytochrom P450 [13]. Zajišťuje inkorporaci jednoho atomu kyslíku do molekuly zpravidla hydrofobního xenobiotika, zatímco druhý atom kyslíku se redukuje na vodu. Do tohoto enzymového systému patří kromě hemových enzymů také jejich reductasy NADPH:cytochrom P450 reductasa a NADH: cytochrom b<sub>5</sub> reductasa [11].

Důležitou funkci mají také flavinové monooxygenasy (FMO), které se v lidském organismu podílí na biotransformaci řady endogenních sloučenin (např. cysteaminu), léčiv (cimetidin, tamoxifen) i xenobiotik (kokain, nikotin). Stejně jako cytochromy P450 jsou FMO mikrosomální enzymy, které vyžadují NADPH a molekulu kyslíku, a často dokáží metabolizovat stejné substráty jako CYP [14]. Dalšími významnými enzymy I. fáze

biotransformace jsou dioxygenasy, které do molekuly substrátu inkorporují oba atomy kyslíku. Dělí se na dvě hlavní skupiny podle toho, zda štěpí či neštěpí aromatické kruhy metabolizovaných sloučenin [11].

### 3.2 Druhá fáze biotransformace

V druhé fázi biotransformace, která se též označuje jako konjugační, dochází k tvorbě ještě polárnějšího produktu z původně hydrofobní cizorodé látky. Xenobiotikum reaguje s endogenní sloučeninou či funkční skupinou dané sloučeniny, čímž vzniká konjugát, který se daleko lépe rozpouští ve vodě, a je tedy snadněji vylučován z lidského organismu. Každá taková látka musí při vstupu do druhé fáze biotransformace obsahovat skupinu (ať už je v původní molekule nebo se tvoří v první fázi), která je schopna s konjugačním činidlem reagovat [8, 9].

K nejvýznamnějším reakcím této fáze patří glukuronidace, která vyžaduje aktivovanou formu kyseliny glukuronové, UDP-glukuronovou kyselinu. Spojení s danou molekulou poté katalyzuje glukuronyl transferasa. Konjugace může probíhat i se samotnou glukosou (přes činidlo UDP-glukosu) či jinými sacharidy. Významnou roli hraje i sulfatace, při které dochází k esterifikaci N-hydroxylovaných aminů kyselinou sírovou. Reakci katalyzují sulfotransferasy, přičemž nejprve musí dojít k aktivaci substrátu konjugačním činidlem PAPS (3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát) [14]. Dalšími významnými reakcemi je acetylace nebo konjugace s glutathionem či aminokyselinou (např. glycinem, glutamátem) [10, 15].

Po této fázi dochází k vylučování přeměněného xenobiotika z organismu ve stolici, potu, moči nebo výdechem. Některé hydrofilní látky, které se po biotransformaci v játrech dostanou do žluče a z ní do střev, se poté ve střevech nedokáží zpětně resorbovat. V některých případech však může dojít vlivem bakteriální hydrolýzy konjugátu ke zpětné resorpci toxické látky a dochází k tvorbě enterohepatálního oběhu, který způsobí, že je metabolit udržován v organismu. O vylučování těchto cizorodých látek se mimo jiné starají i ABC transportéry, především P-glykoproteiny (viz dále) [8].

## 4 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (Obr. 1) představují superrodinu hemových enzymů, které lze nalézt snad v každém živém organismu na Zemi, od bakterií až po člověka. Zapojují se do různých metabolických a biosyntetických procesů a jejich počet se odhaduje na více než 1000, přičemž endogenní substráty většiny z nich zůstávají dosud neznámé. Společným rysem všech cytochromů P450 je jejich struktura a obecný mechanismus účinku. Nicméně existují značné rozdíly ve funkci jednotlivých enzymů a ve struktuře a vlastnostech jejich aktivních míst. [16]. Na základě těchto kritérií se dříve cytochromy P450 třídily do jednotlivých rodin a podrodin. Dnes se rozdělují podle genetické podobnosti.



**Obr. 1:** Cytochrom P450 3A4 (převzato z [17])

### 4.1 Klasifikace

Od roku 1991 se pro cytochromy P450 používá název CYP, který je doplněn o arabskou číslici vyjadřující číslo rodiny (např. CYP2). Enzymy v jedné rodině se musí podobat svými sekvencemi nejméně ze 40%. U vyššího stupně podobnosti (nad 55%) se CYP řadí do tzv. podrodin, které se označují abecedně (CYP2A, CYP2B atd.). Celkový název jednotlivých členů či podskupin, které se liší o méně než 3% sekvencí, bývá doplněn o další arabskou číslici (např. CYP2A1) [16, 18].

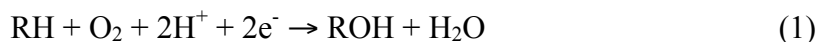
## 4.2 Vlastnosti a reakce

Cytochromy P450 získaly svůj název podle specifického absorpčního pásu při vlnové délce 450 nm, který se projevuje u jejich redukované formy v komplexu s oxidem uhelnatým. Písmeno P je označením pro pigment [19–21].

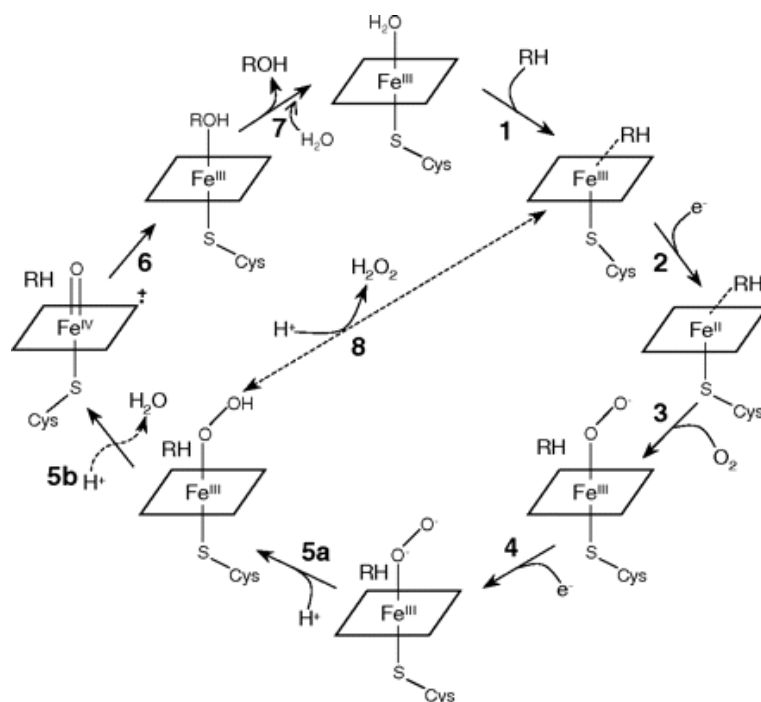
Všechny isoformy CYP disponují některými společnými strukturními vlastnostmi, které jsou pro ně charakteristické. Skládají se z proteinu, v němž je hydrofobně vázán skelet protoporfyrinu IX. Centrální atom železa je v tomto skeletu vázán pomocí čtyř koordinačně kovalentních vazeb. Důležitou roli zde hraje pátá koordinačně kovalentní vazba atomu železa s thiolátovou sírou cysteinu, která společně s hydrofobními vazbami udržuje aktivní centrum na správném místě v rámci makromolekuly. Šestým ligandem trojmocného atomu železa je molekula vody (resp. její atom kyslíku). Právě molekula vody má klíčový význam v katalytickém cyklu cytochromů P450 (viz dále) [12, 22].

V průběhu vývoje života získávaly cytochromy P450 stále nové funkce, například hydroxylace organických látek u prehistorických mikroorganismů či biosyntéza barviv květů, mastných kyselin a dalších fyziologicky významných sloučenin v rostlinách. V současnosti se zkoumá především kvůli jeho funkci během detoxikace cizorodých látek. Člověk tyto látky přijímá cíleně (nejčastěji v podobě léčiv) či nezáměrně jako složky potravy či jako vedlejší produkty lidské aktivity [12]. V některých případech se může jednat o látky karcinogenní. CYP se tak díky schopnosti eliminace toxických látek a aktivace léčiva podílel na důležité adaptaci organismů. Nicméně ve stejné míře se uplatňují i potenciálně nebezpečné reakce, kterými jsou aktivovány protoxikanty a prokarcinogeny, čímž se CYP zúčastňuje procesu karcinogeneze [12].

Cytochromy P450 jsou u savců zakotveny v membráně endoplasmatického retikula a mitochondrií a katalyzují reakce typu:



Zdrojem elektronů je kofaktor NAD(P)H, který je dodává hemové prostetické skupině cytochromu P450 přes NADPH:cytochrom P450 reduktasu (či NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasu). RH obecně reprezentuje široký výběr lipofilních sloučenin, pro které jsou různé cytochromy P450 specifické [21]. Reakční cyklus cytochromů P450 je znázorněn na obrázku 2.



**Obr. 2:** Reakční cyklus cytochromů P450 (převzato z [23])

Elektrony jsou do cyklu dodávány z NAD(P)H v krocích 2 a 4, RH představuje substrát, ROH hydroxylační produkt, Fe hemový atom železa, Cys je zkratkou pro cystein.

### 4.3 Indukce cytochromu P450

Společným rysem některých cytochromů P450 je, že expozicí organismu xenobiotikům dojde ke zvýšení jejich exprese. Tato adaptivní odpověď je známá jako indukce a jedná se o přísně regulovaný proces, který je v první řadě řízen na úrovni transkripce. Inducibilní CYP mohou být ve tkáních a orgánech zastoupeny ve větším množství podle výskytu látky (induktoru), která jejich expresi vyvolá. Kromě inducibilních existují také konstitutivní CYP, jejichž obsah je neměnný a které se zaměřují především na metabolismus endogenních sloučenin [24].

Expresí CYP je regulována velmi přísně vůči expozici xenobiotik a umožňuje buňce zvýšení obsahu potřebných cytochromů P450 k usnadnění odstranění potenciálně toxické cizorodé látky. Indukce se v buňce uskutečňuje pomocí receptorů, které působí primárně v jádře. Jedná se o signalizační molekuly, které fungují jako ligand vázající transkripční faktory [24]. Společně jsou schopné rozpoznat velké množství cizorodých látek a v důsledku toho regulovat mnoho enzymů první a druhé fáze biotransformace

xenobiotik a transportních proteinů. Mezi tyto intracelulární receptory patří především [25]:

- AhR („aryl hydrocarbon receptor“)
- CAR („constitutive androstane receptor“)
- PPAR $\alpha$  („peroxisome proliferator activated receptor“)
- PXR („pregnane X receptor“)

První zmíněný receptor AhR patří do superrodiny PAS (Per-Arnt-Sim, „Period-Ah receptor-nuclear translocator Single minded“), zatímco ostatní tři jsou členy superrodiny jaderných hormonálních receptorů (NHR, „nuclear hormone receptor“).

AhR je široce exprimován v lidských tkáních, především v placentě, plicích, srdci, slinivce břišní a v játrech [26]. Jako ligandy přijímá hydrofobní, planární sloučeniny, např. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), halogenové dioxiny, polychlorované bifenyly či polycyklické aromatické uhlovodíky (např. benzo[a]pyren). AhR primárně reguluje expresi genů v rodině CYP1 (tj. CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1), ale i některé příslušníky rodiny CYP2 [25]. Za počátečního stavu buňky bez navázaného ligandu se AhR nachází v cytoplazmě a teprve po vazbě ligandu se přemístí do jádra, kde interaguje s AhR jaderným faktorem (ARNT, „AhR nuclear translocator“) za tvorby heterodimeru. Ten se poté váže na specifickou sekvenci DNA a aktivuje transkripci cílových genů. Použitý AhR může být nakonec exportován z jádra a degradován v proteasomu nebo je recyklován v cytoplazmě [24, 25].

Receptory CAR a PXR transkripčně regulují rodiny CYP2 a CYP3, PPAR $\alpha$  se zaměřuje na CYP4. Po vazbě ligandu tvoří heterodimer s retinoidním X receptorem (RXR). Heterodimer se poté váže na tzv. rozpoznávací element genu, který kóduje daný CYP [25]. Jsou také zodpovědné za interakce s jinými jadernými receptory a se širokou řadou dalších intracelulárních signálních drah, včetně těch aktivovaných určitými cytokiny a růstovými faktory. Ligandem je například fenobarbital (pro CAR), rifampicin (PXR) či kyselina klofibrová (PPAR $\alpha$ ) [27].

S ohledem na zkoumání základních příčin vážných nežádoucích účinků léčiv se uvádí, že indukce CYP obecně vyvolává méně závažné změny v organismu než jejich inhibice. Inhibice cytochromů P450 totiž může způsobit rychlé a velmi znatelné zvýšení krevních hladin léčiva, což může vést až k příznakům podobným předávkování léky. Oproti tomu,



indukce cytochromu P450 snižuje hladinu metabolizovaného léčiva v krvi, což snižuje terapeutický účinek. Nicméně existují i výjimky jako například alkohol, jehož zesilující účinky způsobují stejný efekt indukce jako inhibice CYP [14].

#### 4.4 Inhibice cytochromu P450

Inhibice cytochromů P450 je nejčastější příčinou škodlivých lékových interakcí a její odhalení zapříčinilo odstranění několika léků z trhu [28]. V katalytickém cyklu cytochromů P450 (viz kapitola 4.2) jsou tři kroky obzvláště citlivé na inhibici. V první řadě sem patří navázání substrátu, dále vazba molekulárního kyslíku následovaná prvním přenosem elektronu a nakonec samotná oxidace substrátu [29].

Inhibice může zvýšit biologickou dostupnost výchozí látky a koncentraci léčiva v ustáleném stavu. Zejména u proléčiv může dojít ke snížení množství aktivní formy léčiva, což obvykle vede až k toxicitě či nedostatečné účinnosti léčiva. Inhibitory cytochromů P450 se dělí na tři mechanismem odlišné skupiny – reverzibilní, kvazi-ireverzibilní a ireverzibilní [25].

Reverzibilní inhibice je nejčastějším typem inhibice enzymu (zejména kompetitivní a nekompetitivní) a může probíhat přímo, tedy bez metabolismu inhibitoru. Dochází k ní v důsledku konkurence v aktivním místě enzymu a pravděpodobně ovlivňuje pouze první krok katalytického cyklu cytochromů P450. Vazby na enzym jsou však většinou slabé a snadno se štěpí. Při kompetitivní inhibici soutěží substrát a inhibitor o vazbu na stejnou pozici aktivního centra enzymu, při nekompetitivní jsou aktivní vazná místa odlišná [25].

Ireverzibilní a kvazi-ireverzibilní inhibitory působí v průběhu nebo po druhém kroku katalytického cyklu CYP (tedy při přenosu kyslíku). Ireverzibilní inhibitory jsou pomocí CYP aktivovány na reaktivní intermediáty, které deaktivují CYP kovalentní vazbou. Kvazi-ireverzibilní inhibitory tvoří komplexy s centrálním atomem železa CYP [29]. Tato vazba je sice pevná, ale za specifických podmínek reverzibilní. Oproti tomu po navázání ireverzibilních inhibitorů nemůže dojít ke zpětnému obnovení funkce cytochromů P450 [29].

## 4.5 Cytochrom b<sub>5</sub>

Jak již bylo uvedeno výše (viz kapitola 4.2), savčí cytochrom P450 je membránově vázaná monooxygenasa, jejíž katalytické aktivity vyžadují dva elektrony, které jsou postupně dodávány od jeho redoxních partnerů – cytochrom P450 reduktasy a případně cytochromu b<sub>5</sub> [30].

Cytochrom b<sub>5</sub> je hemový protein menší velikosti, přibližně 16 700 Da [31]. Existují dvě membránově vázané formy cytochromu b<sub>5</sub> kódované různými geny, které se liší jak v buněčné lokalizaci, tak ve funkční roli. První z nich se nachází v membráně endoplasmatického retikula (mikrosomální), zatímco druhá je ukotvena ve vnější mitochondriální membráně. Obě isoformy sestávají z hydrofilní N-koncové domény, obsahující hemovou skupinu, a hydrofobní C-koncové domény. Třetí isoforma cyt b<sub>5</sub> se nachází v cytoplasmě maturovaných erytrocytů a nazývá se solubilní erytrocytární [32, 33].

N-koncová doména obsahuje přibližně 100 aminokyselin a zprostředkovává vazbu ferriprotoporfyriu IX. Tato část proteinu se otáčí směrem k cytosolu a poskytuje elektron cytochromu P450 [34]. C-koncová doména interaguje s fosfolipidovou membránou a ukotvuje samotný protein. Předpokládá se, že 10 aminokyselinových zbytků C-koncové domény obsahuje nezbytnou informaci o membránové lokalizaci isoformem [32].

### 4.5.1 Mechanismus účinku cytochromu b<sub>5</sub> na cytochromy P450

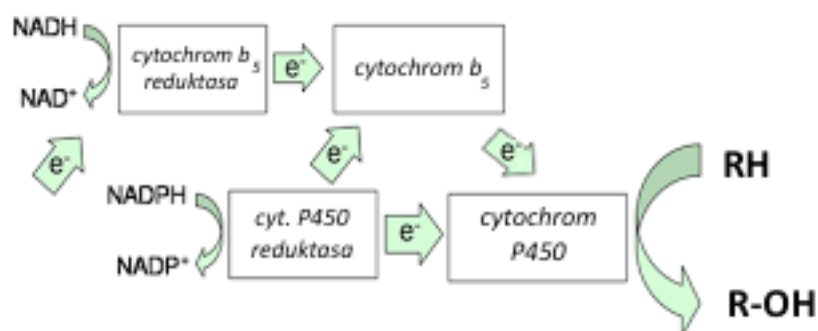
Bylo prokázáno, že cytochrom b<sub>5</sub> stimuluje některé monooxygenasové reakce cytochromu P450, nicméně mechanismus (či mechanismy) je stále diskutován. V posledních letech byly navrženy dvě hlavní hypotézy [4]:

- přímý elektronový přenos jednoho či dvou elektronů prostřednictvím cytochromu b<sub>5</sub>
- allosterická stimulace CYP bez přenosu elektronu

V případě, že jsou oba elektrony přenášeny pouze NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou, se nezapojuje NADPH: cytochrom P450 reduktasa. Elektrony jsou transportovány nejprve z NADH na NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasu, která je přenáší na cytochrom b<sub>5</sub> a ten nakonec na cytochrom P450.

Existuje také možnost, že se na transportu elektronu mohou podílet obě reduktasy a směr transportu je různý. Cesta elektronu od NADPH na NADPH:cytochrom P450 reduktasu může dále vést buď k cytochromu  $b_5$  a od něj k cytochromu P450, nebo je namířena rovnou k CYP [4, 35].

Všechny tyto možnosti transportu elektronů v rámci katalytického cyklu CYP jsou znázorněny na obrázku 3.



**Obr. 3:** Transport elektronů v rámci systému MFO (převzato a upraveno z [36])

Elektrony mohou být transportovány různými cestami, než se dostanou k cytochromu P450. RH značí substrát, R-OH hydroxylační produkt.

Některé CYP (např. CYP3A4, 2C9, 17A, 4A7) jsou ovlivněny allosterickou stimulací cytochromem  $b_5$ , přičemž nedochází k žádnému elektronovému přenosu. Tato stimulace byla vyvolána apoformou cyt  $b_5$  postrádající schopnost transportu elektronů [37].

Role cytochromu  $b_5$  je tedy v systému CYP velmi podstatná. Díky němu se zvyšuje rychlost katalýzy cytochromu P450 a navíc může cyt  $b_5$  i zvýšit zdánlivou afinitu, s níž jsou některé CYP schopné vázat své substráty [14].

### 3.5.2 Vliv cytochromu $b_5$ na karcinogenesi

Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole, přesný mechanismus interakce cytochromu  $b_5$  s CYP není dosud objasněna. Studie se v posledních letech zaměřují na interakce cyt  $b_5$  s jednotlivými členy rodin cytochromů P450, kteří se navíc zapojují do procesu karcinogenese. Jedním z nejdůležitějších enzymů je CYP1A1, který se účastní aktivace i detoxikace karcinogenu benzo[a]pyrenu (v kombinaci s mikrosomální epoxid hydrolasou) [38]. Bylo prokázáno, že oxidace benzo[a]pyrenu lidskou CYP1A1 je

stimulována cytochromem  $b_5$ , což nakonec vede k efektivnějšímu oxidačnímu metabolismu tohoto karcinogenu. Cyt  $b_5$  je podle těchto výsledků důležitým biologickým faktorem, který ovlivňuje karcinogenesi zprostředkovanou benzo[a]pyrenem [39].

V další studii se uvádí, že katalýza zprostředkovaná CYP1A1 je stimulována cytochromem  $b_5$  i při metabolismu markerového substrátu Sudanu I. Tato stimulace CYP1A1 vede k oxidaci azobarviva Sudanu I a ke tvorbě jeho DNA aduktů a závisí na koncentraci cyt  $b_5$  [40].

Cytochrom  $b_5$  ovlivňuje i oxidaci protinádorového léčiva ellipticinu *in vitro*. Úpravou poměru metabolitů ellipticinu vytvořených CYP1A1 a 1A2 může cytochrom  $b_5$  způsobit výraznou změnu v oxidaci tohoto léčiva. Detoxikační metabolity ellipticinu (9/7-hydroxyellipticin) se přeměňují v metabolity tvořící DNA (12/13-hydroxyellipticin), což může vést až k poškození DNA vznikem vyšších hladin kovalentních DNA aduktů. Klíčovou roli v poškození DNA vyvolaném ellipticinem hraje pouze holofорма cytochromu  $b_5$ , která dokáže oproti apoformě modulovat oxidaci ellipticinu cytochromem P450 1A1. Absence účinku apoformy se přisuzuje ztrátě schopnosti přenosu elektronu i změnou ve 3D struktuře cyt  $b_5$ , která neumožňuje dostatečnou interakci s CYP1A1 [41].

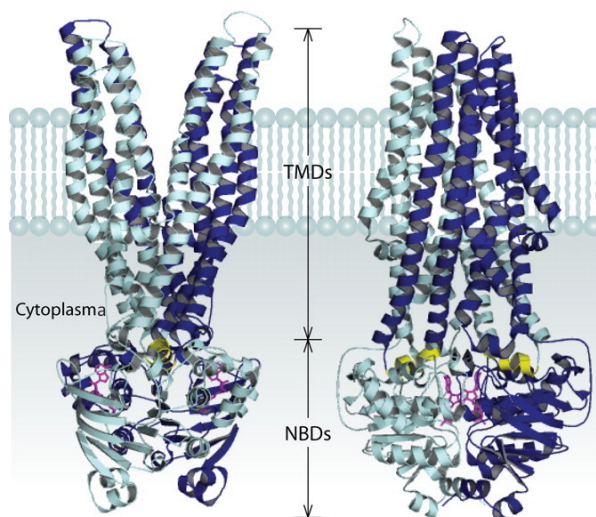
## 5 ABC transportéry

V buňkách probíhají metabolické pochody oddělené od okolního prostředí cytoplasmatickou membránou. V eukaryotických buňkách se navíc nacházejí organely a jejich vnitřní struktury, které jsou ohraničené vnitrobuněčnými membránami. Nepochopitelný povrch biologických membrán je činí málo propustnými pro většinu sloučenin polárního a iontového charakteru a k jejich transportu jsou zapotřebí specifické transportní proteiny [21]. Transport může být pasivní či aktivní. Při pasivním transportu (nebo také usnadněné difúzi) proudí specifické molekuly po jejich koncentračním spádu. Oproti tomu aktivní transport je endergonický proces, který spojuje pohyb jednoho typu molekul proti a jiného typu po jejich koncentračním gradientu. K tomu vyžaduje určité množství energie, proto je velmi často spřažen s hydrolyzou ATP [7, 21].

ABC („ATP-binding cassette“, v překladu ATP-vázající kazety) rodina transportérů patří mezi největší a nejpodrobněji popsané superrodiny transportérů. Patří mezi aktivní transportéry, čemuž napovídá i význam zkratky ABC. Většina z ABC transportérů je zodpovědná za transport velkého množství sloučenin přes biologické membrány, včetně léčiv a jiných xenobiotik [42]. ABC transportéry jsou v organismech všudypřítomné, nalezneme je u prokaryot, rostlin, hub, kvasinek i živočichů. Konkrétně u savců jsou exprimovány především v játrech, střevech, hematoencefalické bariéře, placentě a ledvinách [7].

Ze zkratky ABC vyplývá, že se tyto transportéry řadí mezi ATP poháněné pumpy. energii, která se uvolní hydrolyzou ATP, využívají k transportu substrátu přes membrány dovnitř nebo ven z buněk proti jejich koncentračnímu gradientu [43].

Lidský genom obsahuje 49 ABC genů, uspořádaných do 7 podrodin (ABCA až ABCG). Každá transportní jednotka se obvykle skládá ze dvou intracelulárních nukleotid vázajících domén (NBD) a dvou transmembránových domén (TMD) (Obr. 4) [44]. V takovém případě se jedná o tzv. plný („full“) transportér. Polypeptidový řetězec, který obsahuje pouze jednu NBD a jednu TMD, se nazývá poloviční („half“) transportér [45].



**Obr. 4:** Modely ABC transportérů v konformaci uzavřené (vlevo) a otevřené (vpravo) (převzato a upraveno z [46])

TMD je zkratkou pro transmembránovou doménu, NBD pro nukleotid vázající doménu. V otevřené konformaci dochází k navázání substrátu a molekul ATP. Hydrolyzou ATP dojde ke změně konformace (na uzavřenou) a substrát se uvolní.

Ve struktuře NBD lze mimo jiné nalézt dva sekvenční úseky – Walker A a Walker B. Zbytek lysinu ve Walker A se zapojuje do vazby s  $\beta$ -fosfátem ATP, zatímco zbytek kyseliny asparagové ve Walker B interaguje s hořčnatými ionty. Mezi nimi se nachází vysoce konzervovaná aminokyselinová sekvence ABC motivu (ABC signature motif nebo také C-loop). Společně rozpoznávají, váží a hydrolyzují ATP [1].

Součástí transmembránových domén je několik hydrofobních  $\alpha$ -šroubovic. Podílí se na rozpoznávání substrátů a na jejich transportu přes fosfolipidovou membránu [43].

ABC transportéry tedy participují na přenosu většiny léčiv a jejich metabolitů přes membrány buněk i buněčných organel. Konkrétně u nádorových buněk dochází ke zmnožení ABC transportérů s vysokou afinitou pro dané protinádorové léčivo, což vede až k tvorbě mnohačetné lékové rezistenci. Tato rezistence se přisuzuje snižující se závislosti na ATP při akumulaci léčiv v buňkách, což může mít mimo jiné na svědomí exprese jednoho konkrétního transportního proteinu – P-glykoproteinu [7, 47].

## 5.1 P-glykoproteiny

Několik členů podskupiny ABCB je známo pro vznik mnohočetné rezistence k lékům v rakovinných buňkách. Jsou proto také označeny jako MDR („multi-drug resistance“) rodina ABC transportérů [48]. Mezi ně patří i P-glykoproteiny (P-gp; P jako permeabilní), které jsou v potkaních buňkách tvořeny sekvencí 1277 aminokyselin o celkové velikosti přibližně 141 kDa [49].

P-gp mají nezvykle širokou specifitu a dokáží rozpoznat stovky sloučenin různých velikostí (od 330 až po 4000 Da) [50, 51]. Kromě protinádorových látek transportují i léky na srdeční onemocnění, inhibitory vápenatých kanálů a HIV proteas, antibiotika či imunosupresiva [52].

P-glykoproteiny se vyskytují konstitutivně u normálních buněk, avšak jejich exprese se výrazně zvyšuje především při ničení rakovinných buněk protinádorovými léčivými. Jsou tedy indukovatelné. Předpokládá se, že společně s enzymy metabolizujícími xenobiotika je exprese P-gp důležitým ochranným mechanismem proti potenciálně toxickým sloučeninám [53, 54].

### 5.1.1 Lokalizace a funkce

P-glykoproteiny jsou exprimovány na mnoha místech. Nachází se na apikální straně epiteliálních buněk, zejména v tenkém střevě, jaterních buňkách a epiteliálních buňkách hematoencefalické bariéry. Hlavním předmětem studia těchto transportérů je jejich schopnost regulovat absorpci, distribuci, metabolismus a eliminaci xenobiotik v těchto tkáních [1, 45].

P-gp fungují jako ATP-dependentní vylučovací „full-transportéry“, které pumpují své substráty ven z buněk různými způsoby podle anatomické lokalizace. Ve střevním lumenu P-gp omezuje přechod léčiv do krevního oběhu po jejich perorálním podání v důsledku jejich exprese na apikální membráně enterocytů. Obsah P-gp se zvyšuje směrem od dvanáctníku do tlustého střeva [52].

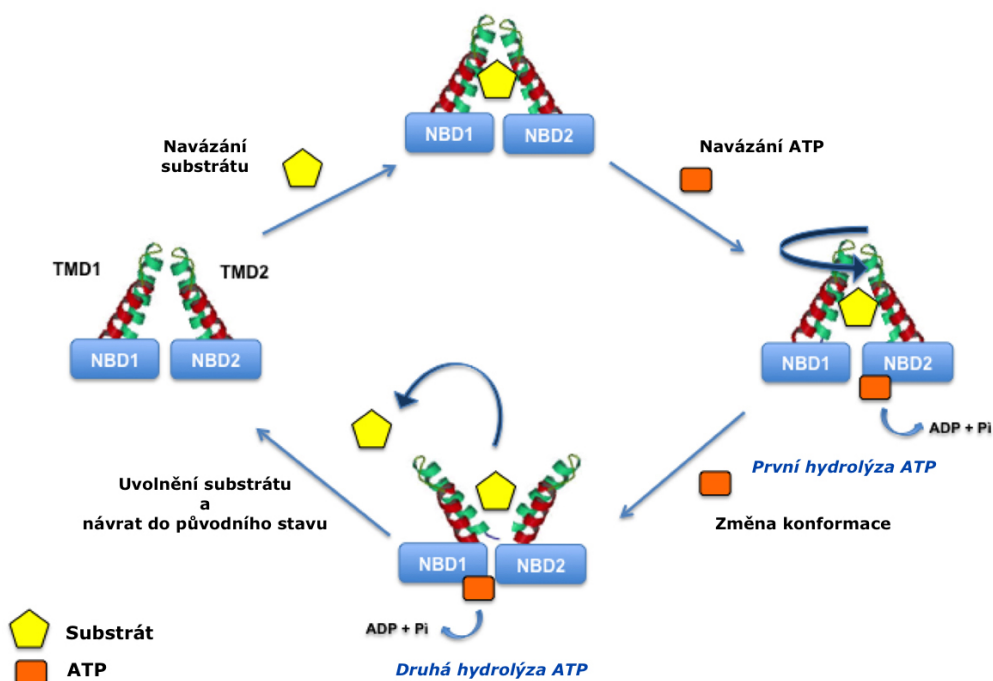
Jakmile se léčivo dostane do krevního oběhu, P-gp podporuje jeho vylučování do žluči a moči. V tomto případě se P-gp exprimuje v kanalikulární membráně hepatocytů a v lumenální membráně proximálních tubulárních buněk v ledvinách [55]. Během závažných onemocnění jater člověka dochází k indukci P-gp. Předpokládá se, že společně

s dalším transportérem MRP1 hraje důležitou roli při ochraně hepatocytů a progenitorových buněk proti poškození vyvolaném xenobiotiky [56].

Léčivo eventuálně vstupuje i do systémového krevního oběhu. P-gp brání jeho pronikání do citlivých tkání, např. do mozku, varlat, lymfocytů či krevního oběhu plodu. Tato funkce je pravděpodobně rozhodujícím faktorem, který vede k úspěšné léčbě, jelikož adekvátní koncentrace lokálních intracelulárních léčiv jsou nezbytné pro terapeutickou účinnost (např. CD4<sup>+</sup> lymfocyty během léčby HIV) [52].

### 5.1.2 Mechanismus transportu

P-glykoproteiny, stejně jako ostatní členové ABC rodiny, patří mezi aktivní transportéry. Iniciačním krokem translokačního procesu je vazba sloučeniny na stranu P-gp s vyšší afinitou a současně navázání ATP k NBD, načež dochází k hydrolýze ATP. Ke změně konformace P-gp a vyloučení substrátu z buňky jsou zapotřebí celkem 2 molekuly ATP. První molekula zodpovídá za transport substrátu, zatímco druhá vrací P-gp do původního stavu (Obr. 5) [57].



**Obr. 5:** Mechanismus transportu substrátu ven z buňky (převzato a upraveno z [57])  
V otevřené konformaci je navázán substrát, po první hydrolýze ATP se konformace změní a substrát se uvolní. Druhou hydrolýzou ATP se transportér vrací do původního stavu.



Jak již bylo zmíněno, za interakci P-gp se substráty jsou zodpovědné transmembránové domény. Pro zjištění přesného místa této interakce se užívá např. fotoafinitních analogů substrátů P-gp. Tímto přístupem byla identifikována hlavní místa interakce, která se nachází v TMD na  $\alpha$ -šroubovicích 5, 6 a 11, 12 (z celkových dvanácti) [58], dále v extracelulárních smyčkách, které tyto TMD spojují, a nakonec v samotné doméně ATP [59, 60].

Sloučeniny interagující s P-gp se dělí na tři hlavní skupiny – substráty, modulátory a inhibitory. Substráty jsou molekuly, které P-gp aktivně transportují. Mají tak vyšší koncentraci vně buňky, avšak vysoká koncentrace substrátů může blokovat transportér nasycením vazného místa pro substrát. Přesné umístění tohoto místa není dosud známo [61].

Modulátory upravují vazebné místo pro substrát negativním allosterickým mechanismem. Bylo prokázáno, že jsou modulátory schopny měnit vazebné místo substrátu nekompetitivním způsobem, což naznačuje možnost allosterické komunikace mezi vazebným místem pro substrát a modulátor [61].

Inhibicí P-gp často dojde k potlačení translokační aktivity P-glykoproteinů, a to díky interferenci ATP vazby s NBD (více o inhibitech dále) [57, 61].

## 6 Karcinogenese

Rakovina patří v klinické medicíně k nejzávažnějším onemocněním a k nejpočetnějším příčinám úmrtí celosvětové populace. Postihuje všechny věkové kategorie, avšak za poslední léta se především kvůli nezdravému životnímu stylu zvyšuje incidence u stále mladších lidí. Příčin vzniku nádorového bujení je celá řada, od špatné skladby potravin bohatých na cukry a tuky přes stres, věk, pohlaví až expozici karcinogenním látkám, které se vyskytují v životním prostředí [9, 62].

Karcinogenese (též kancerogenese) je označením pro komplexní proces vzniku nádoru. Nádor (či tumor) je definován jako nově vznikající abnormální tkáň, vyznačující se nadměrným autonomním růstem, který vede k poškození celého organismu [9]. Rozlišují se dva typy nádorů - benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné). Benigní tumory prudce expandují a obvykle jsou opouzdřeny vrstvou pojivové tkáně. Ve většině případů neohrožují život jedince (jedná se např. o bradavice či mateřská znaménka). Maligní nádory se oproti tomu šíří invazivním způsobem a metastázuji (umísťují své buňky v dalších částech těla), a zejména tím jsou pro život jedince značně nebezpečné [21].

Člověk je každý den vystaven mnoha faktorům, které mohou vyvolat nádorové bujení. Mnohastupňový proces karcinogenese je podmíněn mutacemi určitých genů, které způsobují nekontrolovatelnou buněčnou proliferaci. Kritické je poškození genů kódujících proteiny, které se účastní signalizačních drah, kontroly exprese genů či regulace buněčného cyklu, dělení a diferenciace buněk [62]. Tyto geny se nazývají protoonkogeny a tumorsupresorové geny a jejich mutace vede k maligní transformaci buněk [9].

### 6.1 Mechanismus karcinogenese

Proces chemické karcinogenese se dělí na tři hlavní fáze – iniciace, promoce a progres. Během iniciační fáze dochází k modifikaci DNA zdravých buněk. Kovalentní modifikace zejména bází DNA ultimátními formami karcinogenů je jednou z nejčastějších genotoxických vlivů. Mohou vznikat také cyklické adukty, pyrimidinové dimery, interkaláty nebo může být DNA poškozena radiací [12]

Iniciovaná buňka může být zničena imunitním systémem. Pokud se tak nestane, dojde po určité době k expozici faktorů s promočním účinkem, které způsobí ještě větší

změny genetické informace. Iniciační buňky s porušenou diferenciací a mezibuněčnou komunikací tak začnou ještě více proliferovat a dojde ke vzniku benigního nádoru [9].

Progresní fáze je konečnou fází karcinogeneze a lze ji označit jako razantnější formu procesů fáze iniciační. V této fázi dochází k nekontrolovatelnému růstu dosud částečně kontrolovatelného benigního nádoru, což vede k tvorbě maligního tumoru, který proniká i do sousedních tkání [9, 12].

## **6.2 Mechanismy potlačení buněčné proliferace**

Bylo navrženo několik mechanismů účinku na iniciační a promoční fázi karcinogeneze, včetně vlivů na hormonální činnost [63]. Mezi ně patří snížení exprese tumorsupresorového genu p53, zastavení buněčného cyklu, inhibice tyrosinkinasy či inhibice „heat shock“ proteinů.

Nejběžnější genetické abnormality v lidských nádorech jsou vyvolány mutací p53. Tumorsupresorový gen p53 reguluje zpomalení buněčného cyklu a apoptózu (programovanou buněčnou smrt). Inhibice exprese p53 může vést až k zadržení rakovinných buněk v G2 fázi buněčného cyklu [63, 64].

Tyrosinkinasy patří do rodiny proteinkinasy lokalizovaných v nebo blízko buněčné membrány a zapojují se do regulace buněčných signálních drah [65]. Tyrosinkinasy mají schopnost kontrolovat regulaci buněčného růstu, proto se předpokládá, že jejich exprese ovlivňuje vznik nádorů [64].

„Heat shock“ proteiny (HSP) vytváří komplexy se zmutovaným p53, což umožňuje nádorovým buňkám, aby se vyhnuly mechanismu potlačení buněčného cyklu. Díky možnosti zajistit univerzální stresovou odpověď prodlužují HSP dobu života nádorových buněk. Je známo, že některé flavonoidy inhibují produkci „heat shock“ proteinů v několika maligních buněčných liniích, včetně rakoviny prsu, leukémie či karcinomu tlustého střeva [64, 65].

Na těchto mechanismech se podílejí různé sloučeniny s chemopreventivními účinky včetně některých flavonoidů (např. quercetin, viz dále).

## 7 Chemopreventivní sloučeniny

Chemoprevence může být definována jako prevence rakoviny podáváním jedné nebo více chemických látek ve formě léčiv nebo jako přirozeně se vyskytující složky potravy [66].

Klasifikace všech známých chemopreventivních sloučenin je obtížná, jelikož dosud nebyl zjištěn přesný mechanismus inhibice karcinogeneze mnoha z nich. Jedno z možných uspořádání zveřejnil Wattenberg, který roztrídil tyto inhibitory do tří kategorií podle časového úseku procesu karcinogeneze, na který působí [67]:

1. sloučeniny, které brání tvorbě karcinogenů z prekurzorů
2. blokátory („blocking agents“), neboli inhibitory karcinogeneze, které vytváří bariéry bránící karcinogenním sloučeninám, aby dosáhly cílových míst ve tkáních, kde mohou následně i reagovat
3. potlačující látky („suppressing agents“), které tlumí expresi nádorového bujení

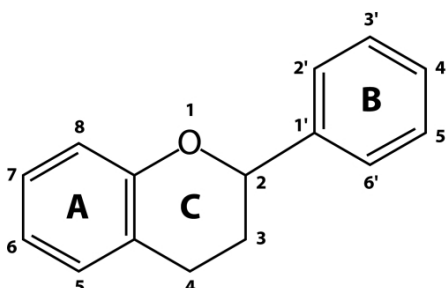
Jedním z prokázaných způsobů chemoprevence je například konzumace ovoce a zeleniny, které obsahují celou řadu prospěšných látek včetně flavonoidů. Mnohé flavonoidy jsou považovány za bioaktivní sloučeniny, které jsou zodpovědné za snížení rizika rakoviny. Stejně jako u jiných xenobiotik se však musí dbát na skutečnost, že se jedná o cizorodé látky a jejich nadměrný přísun by mohl naopak působit nevhodně či dokonce toxicky. Ke zhodnocení potenciálních rizik i přínosů flavonoidů pro lidské zdraví se tak stále provádí různé studie jejich fyziologického chování v lidském organismu [68].

### 7.1 Flavonoidy

Flavonoidy patří do skupiny přírodních látek s fenolickou strukturou. Nacházejí se především v ovoci, zelenině, obilí, květinách či dokonce v čaji a ve víně. Jsou vyhledávané pro své příznivé účinky na lidské zdraví. V současnosti bylo popsáno přibližně 4000 druhů, přičemž mnohé z nich zodpovídají za zbarvení květů, plodů a listů rostlin a jejich ochranu před UV zářením [69–71].

Základní struktura flavonoidů (Obr. 6) je tvořena benzenovým kruhem (A), kondenzovaným se šestičlenným heterocyklickým pyranovým kruhem (C), jenž je na druhém uhlíku substituován fenylovou skupinou (B) [71]. Podle stupně oxidace a typu

substituentů (hydroxy či keto skupiny) na kruhu C se flavonoidy dělí na flavony, flavonoly, flavanony, flavanoly (či katechiny) a isoflavony. Jednotlivé sloučeniny ve třídách jsou poté rozděleny podle substituentů na kruzích A a B. Základní struktury každé třídy včetně zástupců a jejich výskytu jsou znázorněny v tabulce 1.



**Obr. 6:** Základní struktura flavonoidů (převzato z [72])

**Tab. 1:** Struktury flavonoidů, zástupci jednotlivých tříd a jejich výskyt (vytvořeno podle [64])

| <i>Třídy flavonoidů</i>  | <i>Struktura</i> | <i>Příklady zástupců</i>                           | <i>Výskyt</i>  |
|--------------------------|------------------|--|--|
| flavony                  |                  | apigenin, chrysin,<br>luteolin, rutin              | červené víno,<br>rajčatové slupky,<br>celer, petržel,        |
| flavonoly                |                  | kaemferol,<br>myricetin, quercetin,<br>tamarixetin | cibule, olivový olej,<br>brokolice, čaj,<br>bobulovité ovoce |
| flavanony                |                  | hesperidin, naringin,<br>naringerin, taxifolin     | citrusy  |
| flavanoly<br>(katechiny) |                  | (-)-epikatechin,<br>(+)-katechin                   | čaj  |
| isoflavony               |                  | daidzin, genistein                                 | sójové boby  |

Většina flavonoidů se v přírodě vyskytuje vázaná na sacharidy ve formě O-glykosidů. Během metabolického zpracování se tato sacharidová složka odštěpuje a zbývá pouze volný aglykon [2, 73, 74]. Aglykony jsou poté absorbovány a procházejí rozsáhlou biotransformací ve tkáních či střevní mikroflóře. Obecně jsou aglykony účinnějšími antioxidanty než jim odpovídající glykosidy [75, 76].

### **7.1.2 Účinky a toxicita flavonoidů**

Zájem o možné terapeutické využití flavonoidů se zvyšuje díky jejich silným antioxidačním vlastnostem a vychytávání volných radikálů pozorované *in vitro* [73]. Dále se projevují antialergickými, antivirovými a již zmíněnými antikarcinogenními účinky. Nicméně epidemiologické studie, které zkoumaly vliv flavonoidů na lidské zdraví, byly neprůkazné. Některé výsledky experimentů například podporují ochranný účinek flavonoidů při kardiovaskulárních chorobách. Opírají se mimo jiné o tzv. „French paradox“, označující nízkou úmrtnost na kardiovaskulární onemocnění u středomořské populace (konkrétně Francouzů) v souvislosti se značnou spotřebou červeného vína a příjmem nasycených tuků v porovnání s ostatními sousedními státy [70]. Nicméně jiné studie uvedly, že flavonoidy žádný vliv na lidské zdraví nemají. Další naznačují, že tyto látky naopak působí škodlivě [2, 73].

Jednou z možných příčin nežádoucích účinků flavonoidů může být interakce s podobnými sloučeninami či léky. Také podávání velkých dávek jediného flavonoidu může snižovat biologickou aktivitu stopových prvků, vitamínů a kyseliny listové. Kromě toho může mít nepříznivý vliv na funkci štítné žlázy [70, 77].

### **7.1.3 Vybrané flavonoidy s chemopreventivními účinky**

Jak již bylo zmíněno výše, flavonoidy patří mezi chemopreventivní sloučeniny a zasahují nejen proti potenciálnímu vzniku nekontrolovatelné buněčné proliferace, ale i během ostatních fází karcinogeneze. Využívají převážně mechanismy potlačení buněčné proliferace uvedené v kapitole 6.2. V následující části kapitoly jsou podrobnější informace o čtyřech flavonoidech, které se významně podílí na chemoprevenci a na léčbě rakoviny. Byly vybrány proto, že se často objevují v publikacích o chemopreventivních sloučeninách a v této práci jsou zmíněny i dále.

## Quercetin

Flavonol quercetin je vůbec jednou z nejvíce zkoumaných flavonoidních látek s chemopreventivními účinky. Studie z roku 1992 uvádí, že podávání vysokého množství quercetinu po několik let může u starších potkanů vyvolat nádorové bujení ledvin [78, 79]. Při hlubším výzkumu se později ukázal spíše opačný, tedy antimutagenní účinek tohoto (ale i dalších) flavonoidů *in vivo* [70]. Negativní výsledky první studie zřejmě ovlivnil pokročilý věk zvířat i dlouhodobé příjmu vysokých dávek této flavonoidní sloučeniny. Teorii o chemopreventivních účincích quercetinu podpořila například studie z roku 2000, která se zaměřila na vliv vybraných flavonoidů na maligní buněčné kolonie v plicích potkanů. Ukázalo se, že quercetin, apigenin i tamoxifen významně snížily počet nádorových kolonií v závislosti na dávce (tamoxifen z nich byl nejméně účinný). Podobné výsledky byly zaznamenány i u stejného pokusu prováděného *in vitro*. Quercetin a apigenin se díky tomu mohou stát velmi důležitým nástrojem pro odstranění metastázujícího melanomu [80].

Biologické vlastnosti quercetinu jsou spojovány i s určitým vlivem na kardiovaskulární systém. Společně s dalšími flavonoidy působí preventivně proti aterosklerotickým plakům, zabraňují shlukování krevních destiček a podporují relaxaci kardiovaskulárního hladkého svalstva (antihypertenzivní i antiarytmické účinky). Zůstává však otázkou, jaké množství quercetinu musí být dodáno, aby při jeho nízké biologické dostupnosti byly v organismu dosaženy terapeutické koncentrace [78]. To samé platí v souvislosti s chemoprevencí a léčbou rakoviny.

## Apigenin

Apigenin patří mezi flavony a stejně jako quercetin byla prokázána jeho schopnost inhibice růstu plicního melanomu u potkanů [80]. Kromě toho aktivuje tumorsupresorový gen p53 a indukuje apoptózu nádorových buněk prostaty člověka. Apoptóza je iniciována narušením potenciálu mitochondriální membrány, které je vyvoláno zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS, „reactive oxygen species“) či fosforylací p53. [81].

Další studie zaznamenala schopnost apigeninu pozastavit buněčný cyklus nádorových buněk v G2 fázi. Buněčný cyklus je terčem i jiných flavonoidních sloučenin, jako např. luteolin, kaempferol či quercetin. Místa účinků v rámci buněčného cyklu se liší podle rozdílů ve struktuře jednotlivých flavonoidů. Zatímco quercetin a luteolin mají

substituovanou hydroxy skupinu na C3 v kruhu B a potlačují G1 fázi buněčného dělení, kaempferol a apigenin, postrádající tuto substituci, inhibují fázi G2 [82].

### **Luteolin**

Dalším významným flavonem je luteolin, který je hojně využíván v tradičním čínském lékařství k léčbě hypertenze, zánětlivých onemocnění a v neposlední řadě rakoviny. Protinádorové vlastnosti luteolinu se projevují indukcí apoptózy a inhibicí buněčné proliferace, metastáz a angiogeneze [83].

Jak již bylo řečeno u apigeninu, luteolin zasahuje do buněčného cyklu. Pozastavuje G1 fázi u nádorových buněk žaludku a prostaty a je spojován s inhibicí podjednotky cyklin-dependentní kinasy 2, která kontroluje S fázi [82, 83].

### **Genistein**

Isoflavon genistein se též podílí na pozastavení buněčného cyklu v G2 fázi, avšak oproti ostatním výše zmíněným flavonoidům se vyznačuje přítomností hydroxy skupiny na C5 v kruhu A [82].

Genistein má silný inhibiční účinek na proliferaci endoteliálních buněk závislý na dávce, ale rovněž potlačuje růst nádoru prsu *in vivo*. Ukázalo se, že je několikanásobně účinnější než jiné isoflavony. Navíc experimenty prokázaly, že navzdory vysokým koncentracím genisteinu se neprojevují žádné toxické příznaky u normálních buněk. Genistein tedy specificky působí pouze na proliferující buňky. Tato vlastnost má ohromný význam při případném použití této sloučeniny pro léčbu rakoviny [84].

Následující kapitoly jsou zaměřeny na interakce flavonoidů s CYP, cytochromem b<sub>5</sub> a ABC transportéry. Na těchto interakcích se podílí kromě čtyř výše zmíněných zástupců i jiné flavonoidní sloučeniny.

#### **7.1.4 Flavonoidy a cytochromy P450**

Mechanismus, kterým flavonoidy působí, může být ovlivněn interakcemi s různými enzymovými systémy. Prokázána byla interakce s cytochromy P450, flavonoidy tedy zasahují i do metabolismu xenobiotik [77]. Cytochromy P450 obvykle přeměňují xenobiotika na méně toxické sloučeniny, avšak někdy dochází ke tvorbě reaktivních



meziproduktů, případně k úniku volných radikálů. CYP s flavonoidy interagují nejméně třemi způsoby [74]:

1. flavonoidní sloučeniny indukují biosyntézu některých cytochromů P450
2. inhibují či stimulují enzymové aktivity CYP
3. CYP některé flavonoidy metabolizují.

Indukční efekt na monooxygenasovou aktivitu CYP byl prokázán u syntetické flavonoidní sloučeniny 7,8-benzoflavonu, která způsobuje aktivaci jaterního karcinogenu aflatoxinu B1. Předpokládá se, že 7,8-benzoflavon indukuje především CYP3A4 [85].

Naopak inhibičně zasahuje do katalytického cyklu CYP luteolin, který inhibuje rodiny CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1. Tím napomáhá snížit tvorbu aktivních forem mutagenů a redukovat vznik aduktů, např. benzo[a]pyrenu [83].

Významnou roli mezi všemi isoformami cytochromů P450 hraje podrodina CYP3A (především již zmíněný CYP3A4), která patří mezi majoritní isoformy CYP v játrech a v intestinálním traktu a je zodpovědná až za 50% metabolismu všech léčiv [86, 87]. Funkci CYP3A ovlivňují flavonoly quercetin a kaempferol. Například tyto flavonoidy dokáží za pomoci CYP3A4 v lidských jaterních mikrosomech inhibovat metabolismus blokátorů kalciových kanálů [77, 88].

### 7.1.5 Flavonoidy a cytochromy b<sub>5</sub>

Jak již bylo uvedeno výše (viz. kapitola 4.5), NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasa je klinicky a toxikologicky důležitý enzym, jež se podílí na cytochromem b<sub>5</sub> zprostředkovaný metabolismus endogenních substrátů a cytochromem P450 katalyzovaný metabolismus léčiv. Jelikož cyt b<sub>5</sub> i jeho reduktasa hrají velmi důležitou roli v biologické aktivitě a toxicitě celé řady chemických sloučenin, zaměřují se studie na jejich modulace přírodními produkty. Modulace jejich aktivity mohou vést ke změnám v toxicitě léčiv, bioaktivaci proléčiv a ke karcinogenní aktivitě různých látek. Bylo například prokázáno, že NADH:cyt b<sub>5</sub> reduktasa je zodpovědná za tvorbu volných radikálů z heterocyklických aminů, které vznikají při tepelné úpravě potravin [5, 89].

Flavonoidní sloučeniny sice sdílejí značnou strukturní podobnost, avšak vykazují rozdíly v inhibici cyt b<sub>5</sub> reduktasy. Rozdíl v substituci v kruhu C v poloze C3 může vést k rozdílným interakcím s enzymem. Například absence substituce hydroxylové skupiny v

pozici C3 luteolinu usnadňuje silnou interakcí s jinými sloučeninami (interakce FAD s kruhem B, Lys185 s kruhem A a C apod.). Tuto substituci naopak nepostrádají flavonoidy taxifolin či quercetin a nejsou schopné podobné interakce vytvářet [89]. Absence této hydroxylové skupiny v poloze C3 tedy zvyšuje inhibiční účinnost pro cyt b<sub>5</sub> reduktasy (v porovnání mezi luteolinem a quercetinem až desetinásobně). Luteolin je díky tomu považován za jeden z velmi účinných inhibitorů buněčné proliferace [5, 70].

Flavonoidy mohou redukcí cytochromu b<sub>5</sub> modulovat aktivitu cytochrom b<sub>5</sub> reduktasy. Velmi účinným inhibitorem cyt b<sub>5</sub> je myricetin, naopak slabou inhibici vykazuje např. taxifolin. Analýza struktur a aktivity těchto flavonoidů naznačuje, že současná přítomnost tří hydroxy skupin v kruhu B u myricetinu způsobuje silnou inhibici enzymů. Přesný mechanismus inhibice však není dosud znám, nicméně předpokládá se, že tato inhibice myricetinem (podaného samostatně či jako součást potravy) může mít vliv na metabolismus terapeutických léčiv i na detoxikaci xenobiotik [90].

Co se týče indukce cytochromu b<sub>5</sub> flavonoidy s nebo bez chemopreventivních účinků, nebyly nalezeny žádné literární zdroje, které by indukční efekt doložily.

### **7.1.6 Flavonoidy a ABC transportéry**

S ohledem na roli ABC transportérů při vylučování cizorodých látek z lidského organismu, je důležité poznat i jejich interakce s flavonoidy. Tyto informace napomáhají objasnit potenciální interakce mezi potravinami či rostlinnými produkty s léčivými [6]. ABC transportéry mohou být ovlivněny flavonoidy přes jejich ATPasovou aktivitu. Tato aktivita může být jednak inhibována působením flavonoidů genisteinu nebo quercetinu či naopak stimulována pomocí glabridinu [6, 91].

Dalším možným mechanismem inhibice ABC transportérů je působení flavonoidů jako substrátů. ABC transportéry je tak mohou přenášet, což vede ke kompetitivní inhibici vůči ostatním substrátům. Tato představa je však komplikovanější, jelikož transportéry mají více vazných míst, které poskytují různé druhy interakcí [6].

S inhibicí ABC transportérů vyvolanou flavonoidy se úzce pojí i enzymy metabolizující léčiva, mezi které patří několik zástupců cytochromů P450 [92]. Velmi dobře je známa kooperace mezi P-glykoproteinem a enzymy CYP450 (především CYP3A4), která inhibuje perorální absorpci, tedy i biologickou dostupnost jejich substrátů.

CYP3A4 a P-gp fungují jako detoxifikační systémy a tvoří koordinovaný obranný mechanismus proti různým endogenním a škodlivým sloučeninám [93].

#### **7.1.6.1 Inhibice mnohačetné lékové rezistence**

V klinické farmakologii se zvláštní pozornost věnuje schopnosti mnohačetné lékové rezistence některých ABC transportérů. Zvýšená exprese MDR1 genu se využívá k predikci špatné prognózy u určitých typů onkologických onemocnění. Mnohačetná léková rezistence P-glykoproteinů však může být i inhibována specifickými inhibitory, jejichž vlastnosti jsou velmi důležité pro pochopení lékových interakcí s P-gp. V řadě případů dochází při vzájemném podávání inhibitoru i substrátu P-gp k výraznému zvýšení hladiny substrátu, což vede až k vážným vedlejším účinkům. Typickými příklady jsou lékové interakce s inhibitory digoxinem, loperamidem a saquinavirem [44, 60].

Při léčbě rakoviny může omezením funkce P-gp dojít ke zvýšení intracelulárních koncentrací cytostatika. Mezi nejdůležitější zástupce první generace inhibitorů P-gp patří cyklosporin, tamoxifen či verapamil [94]. Účinnost sloučenin první generace však není příliš vysoká. Mimo jiné proto, že inhibitory tlumí aktivitu P-gp i v jiných tkáních (především v játrech a ledvinách), kde P-gp stimuluje eliminaci protinádorových léčiv [60].

Existuje také druhá generace inhibitorů, jejímž účelem je překonání mnohačetné lékové rezistence. Patří sem například valspodar, který je analogem cyklosporinu, avšak je oproti němu účinnější a méně toxický [95]. Na druhou stranu vyžaduje značnou redukci dávkování chemoterapeutik, stejně jako další člen druhé generace inhibitorů biricodar, který má schopnost obnovovat buněčnou citlivost vůči protinádorovým léčivům [60].

Aby byly co nejvíce eliminovány nežádoucí farmakokinetické interakce, vyvíjí se i třetí generace inhibitorů. Navržené sloučeniny jsou specifické k P-glykoproteinům, jejich biologická dostupnost je dobrá, účinek dlouhodobý a navíc se u nich výrazněji neprojevují interakce s chemoterapeutiky. Patří sem např. pyronaridin či tariquidar [60, 95].

## Závěr

Složení potravy má velký význam pro celkové zdraví. V dnešní době neustále roste zájem o potravní doplňky s obsahem látek flavonoidního charakteru, které by měly lidskému organismu prospívat. Flavonoidy jsou často dávány do souvislosti se sníženým výskytem závažných onemocnění včetně karcinogeneze. U některých flavonoidních sloučenin byly prokázány významné chemopreventivní vlastnosti, které by mohly být velmi užitečné při protinádorové terapii.

Z dosavadních studií vychází jako jedna z nejúčinnějších chemopreventivních sloučenin quercetin. Proti proliferujícím nádorovým buňkám účinkuje různými mechanismy a byla prokázána dokonce jeho schopnost inhibice maligních plicních kolonií buněk u potkanů. Projevil se i jako inhibitor mnohačetné lékové rezistence u P-glykoproteinů. Účinek quercetinu však velmi závisí na jeho dávkování. Při různém množství podané látky docházelo ke zcela odlišným výsledkům. Rozhodně je nasnadě provést detailnější výzkumy této sloučeniny, která by mohla velmi pomoci při terapii malignit i prevenci karcinogeneze.

Flavonoidy jsou i přes veškeré nadějně vyhlídky stále cizorodé látky, které procházejí procesem biotransformace. Výzkumy potvrdily možnost jak indukce, tak inhibice cytochromů P450, které mohou vést k hromadění xenobiotik v organismu, a tedy k vážným zdravotním komplikacím. Na léčbě rakoviny se významně podílí i cytochrom b<sub>5</sub>, stimulující reakce zprostředkované určitými cytochromy P450, které vedou k oxidaci karcinogenních sloučenin (např. benzo[a]pyrenu) i protinádorových léčiv (ellipticinu). Výsledkem však není vždy detoxikace toxických látek a v mnohých případech dochází naopak k modifikaci DNA. Byla také prokázána inhibice cytochromu b<sub>5</sub> některými flavonoidy, např. myricetinem.

Stále není zcela vyřešen problém interakcí mezi více léčivy. Efluxní transportéry, P-glykoproteiny, znesnadňují transport protinádorových léčiv v důsledku mnohačetné lékové rezistence. Studie se proto zaměřují na výzkum inhibitorů, které by mohly zvýšit biologickou dostupnost i účinek podávaných léků.

Mnoho flavonoidních sloučenin se tedy vyznačuje chemopreventivními vlastnostmi, avšak stále je třeba provést mnoho studií, které pomohou lépe pochopit mechanismus jejich působení v organismu a vysvětlit vzájemné interakce mezi nimi.

## Seznam použité literatury

1. Leslie, E. M., Deeley, R. G., a Cole, S. P. C. (2005): Multidrug resistance proteins: Role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204. 216–237.
2. Ross, J. A. a Kasum, C. M. (2002): Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* 22. 19–34.
3. Hodek, P., Tepla, M., Krizkova, J., Sulc, M., a Stiborova, M. (2009): Modulation of cytochrome P450 enzyme system by selected flavonoids. *Neuro Endocrinol. Lett.* 30. 67–71.
4. Porter, T. D. (2002): The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16. 311–316.
5. Celik, H. a Kosar, M. (2012): Structure-Activity Relationships of Flavonoids as Inhibitors of Purified Hepatic NADH-Cytochrome b5 Reductase. *Chem Biol Interact.* 197. 103–109.
6. Alvarez, A. I., Real, R., Pérez, M., Mendoza, G., Prieto, J. G., a Merino, G. (2010): Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *J. Pharm. Sci.* 99. 598–617.
7. Vasiliou, V., Vasiliou, K., a Nebert, D. W. (2009): Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum. Genomics.* 3. 281–290.
8. Knejzlik, Z., Kas, J., a Ruml, T. (2000): Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. Listy.* 94. 913–918.
9. Stiborová, M. (1996): Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace, 1996. Dostupné z: <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf> (cit. 4.4.2015)
10. Lüllmann, H. (2000): *Color Atlas of Pharmacology*, 2. vydání. Thieme. New York.
11. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J., a Martínek, V. (2004): Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy.* 98. 876–890.
12. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., a Frei, E. (1999): Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy.* 93. 229–237.
13. Omiecinski, C. J., Vanden Heuvel, J. P., Perdew, G. H., a Peters, J. M. (2011): Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: From biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol. Sci.* 120.

14. Parkinson, A., Ogilvie, B. W., Buckley, D. B., Kazmi, F., Czerwinski, M., a Parkinson, O. (2013): *Biotransformation of Xenobiotics*, 8. vydání. McGraw-Hill Education. New York.
15. Chat, M., Bayol-Denizot, C., Suleman, G., Roux, F., a Minn, A. (1998): Drug metabolizing enzyme activities and superoxide formation in primary and immortalized rat brain endothelial cells. *Life Sci.* 62. 151–163.
16. Anzenbacher, P. a Anzenbacherová, E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* 58. 737–747.
17. C&EN: LATEST NEWS - CRYSTAL STRUCTURE REVEALS SURPRISES. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/cen/news/8229/8229notw6.html> (cit. 26.7.2015)
18. Nebert, D. W. a Nelson, D. R. (1991): P450 gene nomenclature based on evolution. *Methods in Enzymology.* 206. 3–11.
19. Omura, T. a Sato, R. (1964): The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification and Properties. *J. Biol. Chem.* 239. 2379–2385.
20. Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G., a Schlichting, I. (2005): Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem. Rev.* 105. 2253–2277.
21. Voet, D. a Voet, J. G. (2004): *Biochemistry*, 3. vydání. John Wiley & Sons, Inc. United States of America.
22. Shaik, S., Kumar, D., de Visser, S. P., Altun, A., a Thiel, W. (2005): Theoretical perspective on the structure and mechanism of cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.* 105. 2279–2328.
23. Shebley, M., Kent, U. M., Ballou, D. P., a Hollenberg, P. F. (2009): Mechanistic analysis of the inactivation of cytochrome P450 2B6 by phencyclidine: effects on substrate binding, electron transfer, and uncoupling. *Drug Metab. Dispos.* 37. 745–752.
24. Williams, S. N., Dunham, E., a Bradfield, C. A. (2005): Induction of Cytochrome P450, v knize *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry (de Montellano, P. R. O.)*, Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, 323–346.
25. Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., a Raunio, H. (2008): Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch. Toxicol.* 82. 667–715.
26. Dolwick, K. M., Schmidt, J. V, Carver, L. A., Swanson, H. I., a Bradfield, C. A. (1993): Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.* 44. 911–917.

27. Waxman, D. J. (1999): P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch. Biochem. Biophys.* 369. 11–23.
28. Friedman, M. A., Woodcock, J., Lumpkin, M. M., Shuren, J. E., Hass, A. E., a Thompson, L. J. (1999): The safety of newly approved medicines: do recent market removals mean there is a problem? *JAMA.* 281. 1728–1734.
29. Correia, M. A. a Montellano, P. R. O. (2005): Inhibition of Cytochrome P450, v knize *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry (de Montellano, P. R. O.)*, Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, 247–310.
30. Zhang, M., Huang, R., Im, S.-C., Waskell, L., a Ramamoorthy, A. (2015): Effects of Membrane Mimetics on Cytochrome P450-Cytochrome b5 Interactions Characterized by NMR Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 290. 12705–12718.
31. Spatz, L. a Strittmatter, P. (1971): A form of cytochrome b5 that contains an additional hydrophobic sequence of 40 amino acid residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68. 1042–1046.
32. Altuve, A., Silchenko, S., Lee, K. H., Kuczera, K., Terzyan, S., Zhang, X., Benson, D. R., a Rivera, M. (2001): Probing the differences between rat liver outer mitochondrial membrane cytochrome b5 and microsomal cytochromes b5. *Biochemistry.* 40. 9469–9483.
33. Giordano, S. J. a Steggles, A. W. (1993): Differential expression of the mRNAs for the soluble and membrane-bound forms of rabbit cytochrome b5. *Biochim. Biophys. Acta.* 1172. 95–100.
34. Sergeev, G. V., Gilep, A. A., a Usanov, S. A. (2014): The role of cytochrome b5 structural domains in interaction with cytochromes P450. *Biochemistry.* 79. 406–416.
35. Porter, T. D. (2012): New insights into the role of cytochrome P450 reductase (POR) in microsomal redox biology. *Acta Pharm. Sin. B.* 2. 102–106.
36. NMR Methodology - Ramamoorthy Group. Dostupné z: <http://rams.biop.lsa.umich.edu/research/nmr-methodology> (cit. 31.7.2105)
37. Yamazaki, H., Shimada, T., Martin, M. V, a Guengerich, F. P. (2001): Stimulation of cytochrome P450 reactions by apo-cytochrome b5: evidence against transfer of heme from cytochrome P450 3A4 to apo-cytochrome b5 or heme oxygenase. *J. Biol. Chem.* 276. 30885–30891.
38. Indra, R., Moserova, M., Sulc, M., Frei, E., a Stiborova, M. (2013): Oxidation of carcinogenic benzo[a]pyrene by human and rat cytochrome P450 1A1 and its influencing by cytochrome b5 - a comparative study. *Neuro Endocrinol. Lett.* 34. 55–63.

39. Indra, R., Moserova, M., Kroftova, N., Sulc, M., Martinkova, M., Adam, V., Eckschlager, T., Kizek, R., Arlt, V. M., a Stiborova, M. (2014): Modulation of human cytochrome P450 1A1-mediated oxidation of benzo[a]pyrene by NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase and cytochrome b5. *Neuro Endocrinol. Lett.* 35. 105–113.
40. Stiborová, M., Martínek, V., Schmeiser, H. H., a Frei, E. (2006): Modulation of CYP1A1-mediated oxidation of carcinogenic azo dye Sudan I and its binding to DNA by cytochrome b5. *Neuro Endocrinol. Lett.* 27. 35–39.
41. Kotrbová, V., Mrázová, B., Moserová, M., Martínek, V., Hodek, P., Hudeček, J., Frei, E., a Stiborová, M. (2011): Cytochrome b(5) shifts oxidation of the anticancer drug ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to activation, thereby modulating its pharmacological efficacy. *Biochem. Pharmacol.* 82. 669–680.
42. Klein, I., Sarkadi, B., a Váradi, A. (1999): An inventory of the human ABC proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1461. 237–262.
43. Verrier, P. J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P. A., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E. J., Yazaki, K., a Theodoulou, F. L. (2008): Plant ABC proteins - a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci.* 13. 151–159.
44. Montanari, F. a Ecker, G. F. (2015): Prediction of Drug-ABC Transporter Interaction - Recent Advances and Future Challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 86. 17–26.
45. Tarling, E. J., de Aguiar Vallim, T. Q., a Edwards, P. A. (2013): Role of ABC transporters in lipid transport and human disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 24. 342–350.
46. Cuthbertson, L., Kos, V., a Whitfield, C. (2010): ABC transporters involved in export of cell surface glycoconjugates. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74. 341–362.
47. Ambudkar, S. V, Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I., a Gottesman, M. M. (1999): Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39. 361–398.
48. Dean, M., Rzhetsky, A., a Allikmets, R. (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 11. 1156–1166.
49. Silverman, J. A., Raunio, H., Gant, T. W., a Thorgeirsson, S. S. (1991): Cloning and characterization of a member of the rat multidrug resistance (mdr) gene family. *Gene.* 106. 229–236.



50. Ramachandra, M., Ambudkar, S. V., Chen, D., Hrycyna, C. A., Dey, S., Gottesman, M. M., a Pastan, I. (1998): Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. *Biochemistry*. 37. 5010–5009.
51. Lam, F. C., Liu, R., Lu, P., Shapiro, A. B., Renoir, J. M., Sharom, F. J., a Reiner, P. B. (2001): beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J. Neurochem*. 76. 1121–1128.
52. Fromm, M. F. (2004): Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers. *Trends Pharmacol. Sci.* 25. 423–429.
53. Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I., a Willingham, M. C. (1987): Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84. 7735–7738.
54. Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J. R., a Melamed, M. R. (1990): Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 38. 1277–1287.
55. Elferink, R. P. J. O. (2002): Understanding and controlling hepatobiliary function. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 16. 1025–1034.
56. Ros, J. E., Libbrecht, L., Geuken, M., Jansen, P. L. M., a Roskams, T. A. D. (2003): High expression of MDR1, MRP1, and MRP3 in the hepatic progenitor cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease. *J. Pathol.* 200. 553–560.
57. Zinzi, L., Capparelli, E., Cantore, M., Contino, M., Leopoldo, M., a Colabufo, N. A. (2014): Small and Innovative Molecules as New Strategy to Revert MDR. *Front. Oncol.* 4. 2.
58. Abdallah, H. M., Al-Abd, A. M., El-Dine, R. S., a El-Halawany, A. M. (2015): P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. *J. Adv. Res.* 6. 45–62.
59. Loo, T. W. a Clarke, D. M. (1999): The transmembrane domains of the human multidrug resistance P-glycoprotein are sufficient to mediate drug binding and trafficking to the cell surface. *J. Biol. Chem.* 274. 24759–24765.
60. Pechandová, K., Buzková, H., Slanář, O., a Perlík, F. (2006): Efluxní transmembránový transportér – P-glykoprotein. *Klin. Biochem. Metab.* 14. 196–201.
61. Martin, C., Berridge, G., Mistry, P., Higgins, C., Charlton, P., a Callaghan, R. (2000): Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis. *Biochemistry*. 39. 11901–11906.
62. Stratil, P. a Kubáň, V. (2004): Princip karcinogeneze a přírodní karcinogenní sloučeniny v potravinách. *Chem. Listy.* 98. 379–387.

63. Duthie, G. G., Duthie, S. J., a Kyle, J. A. (2000): Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr. Res. Rev.* 13. 79–106.
64. Kumar, S. a Pandey, A. K. (2013): Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* 2013. 16.
65. Lamson, D. W. a Brignall, M. S. (2000): Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Altern. Med. Rev.* 5. 196–208.
66. Morse, M. A. a Stoner, G. D. (1993): Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis.* 14. 1737–1746.
67. Wattenberg, L. W. (1985): Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* 45. 1–8.
68. Prasain, J. K. a Barnes, S. (2007): Metabolism and bioavailability of flavonoids in chemoprevention: current analytical strategies and future prospectus. *Mol. Pharm.* 4. 846–864.
69. Mouradov, A. a Spangenberg, G. (2014): Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Front. Plant Sci.* 5. 1–16.
70. Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K., a van Leeuwen, P. A. (2001): Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74. 418–425.
71. Groot, H. a Rauen, U. (1998): Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 12. 249–255.
72. Stefek, M. (2011): Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract. *Interdiscip. Toxicol.* 4. 69–77.
73. Middleton, E. (1998): Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 439. 175–182.
74. Hodek, P., Trefil, P., a Stiborová, M. (2002): Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact.* 139. 1–21.
75. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., a Bobilya, D. J. (2002): Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13. 572–584.
76. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., a Jiménez, L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79. 727–747.
77. Egert, S. a Rimbach, G. (2011): Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements? *Adv. Nutr.* 2. 8–14.

78. Formica, J. V a Regelson, W. (1995): Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 33. 1061–1080.
79. Dunnick, J. K. a Hailey, J. R. (1992): Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. *Fundam. Appl. Toxicol.* 19. 423–431.
80. Caltagirone, S., Rossi, C., Poggi, A., Ranelletti, F. O., Natali, P. G., Brunetti, M., Aiello, F. B., a Piantelli, M. (2000): Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int. J. Cancer.* 87. 595–600.
81. Shukla, S. a Gupta, S. (2008): Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. *Free Radic. Biol. Med.* 44. 1833–1845.
82. Casagrande, F. a Darbon, J. M. (2001): Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem. Pharmacol.* 61. 1205–1215.
83. Lin, Y., Shi, R., Wang, X., a Shen, H.-M. (2008): Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Curr. Cancer Drug Targets.* 8. 634–646.
84. Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H., Hase, T., Montesano, R., a Schweigerer, L. (1995): Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J. Nutr.* 125. 790–797.
85. Guengerich, F. P. (1995): Influence of nutrients and other dietary materials on cytochrome P-450 enzymes. *Am. J. Clin. Nutr.* 61. 651–658.
86. Wojnowski, L. a Kamdem, L. K. (2006): Clinical implications of CYP3A polymorphisms. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2. 171–182.
87. Rendic, S. (2002): Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab. Rev.* 34. 83–448.
88. Miniscalco, A., Lundahl, J., Regårdh, C. G., Edgar, B., a Eriksson, U. G. (1992): Inhibition of dihydropyridine metabolism in rat and human liver microsomes by flavonoids found in grapefruit juice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261. 1195–1199.
89. Verma, S., Singh, A., a Mishra, A. (2012): Molecular construction of NADH-cytochrome b5 reductase inhibition by flavonoids and chemical basis of difference in inhibition potential: Molecular dynamics simulation study. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2. 33.
90. Çelik, H., Koşar, M., a Arinç, E. (2013): In vitro effects of myricetin, morin, apigenin, (+)-taxifolin, (+)-catechin, (-)-epicatechin, naringenin and naringin on cytochrome b5 reduction by purified NADH-cytochrome b5 reductase. *Toxicology.* 308. 34–40.

91. Cao, J., Chen, X., Liang, J., Yu, X.-Q., Xu, A.-L., Chan, E., Wei, D., Huang, M., Wen, J.-Y., Yu, X.-Y., Li, X.-T., Sheu, F.-S., a Zhou, S.-F. (2007): Role of P-glycoprotein in the intestinal absorption of glabridin, an active flavonoid from the root of *Glycyrrhiza glabra*. *Drug Metab. Dispos.* 35. 539–553.
92. Dresser, G. K. a Bailey, D. G. (2003): The effects of fruit juices on drug disposition: a new model for drug interactions. *Eur. J. Clin. Invest.* 33. 10–16.
93. Zhang, Y. a Benet, L. Z. (2001): The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin. Pharmacokinet.* 40. 159–168.
94. Aller, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Harrell, P. M., Trinh, Y. T., Zhang, Q., Urbatsch, I. L., a Chang, G. (2009): Structures of P-glycoproteins reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*. 323. 1718–1722.
95. Leonard, G. D. (2003): The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *Oncologist*. 8. 411–424.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

| Jméno a příjmení<br>s adresou | Číslo OP | Datum vypůjčení | Poznámka |
|-------------------------------|----------|-----------------|----------|
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |
|                               |          |                 |          |