

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Aneta Skotnicová

**Studium vybraných flavonoidů jako modulátorů
cytochromu P450 3A4**

Study of selected flavonoids as modulators of cytochrome P450 3A4

Bakalářská práce

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

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení této bakalářské práce, cenné rady, trpělivost a ochotu. Dále bych chtěla poděkovat svým kolegům za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Flavonoidy jsou sekundární metabolity rostlin vykazující širokou škálu biologických aktivit. Velká pozornost jim je věnována hlavně pro jejich antioxidační vlastnosti. Proto se v současné době zvyšuje konzumace těchto přírodních látek především ve formě potravních doplňků. Navíc tyto sloučeniny vykazují antivirové, protizánětlivé či hepatoprotektivní účinky a některé z nich mají také mutagenní a/nebo prooxidační vlastnosti. Mimo jiné jsou důležité interakce flavonoidů s biotransformačními enzymy, např. cytochromy P450, čímž mohou zasahovat do metabolismu léčiv nebo procesů kancerogeneze.

V této bakalářské práci byl studován vliv vybraných flavonoidních sloučenin dihydromyricetinu a myricetinu na expresi a aktivitu cytochromu P450 3A4.

Po premedikaci potkanů těmito flavonoidy nebyla zjištěna indukce CYP3A4. Dihydromyricetin i myricetin však inhibují CYP3A4. Byla stanovena jejich koncentrace, při které je dosaženo 50% maxima inhibičního efektu, pro dihydromyricetin $IC_{50} = 25 \mu M$ a pro myricetin $IC_{50} = 24 \mu M$.

Klíčová slova: Imunodetekce, HPLC, inhibice, indukce

Abstract

Flavonoids are secondary metabolites of plants exhibiting a wide range of biological activities. Special attention is paid to them mainly because of their antioxidant properties. Consumption of these natural substances is currently increasing especially in the form of dietary supplements. In addition, these compounds exhibit antiviral, anti-inflammatory or hepatoprotective effects and some of them also exhibit mutagenic and/or pro-oxidative properties. The study of flavonoid interactions with biotransformation enzymes such as cytochromes P450 are important because of their possible interference with the metabolism of drugs or carcinogenesis processes.

In this bachelor thesis the influence of selected flavonoid compounds, dihydromyricetin and myricetin, on the expression and activity of cytochrome P450 3A4 was studied.

The flavonoid premedication of rats did not result in induction of CYP3A4. However, dihydromyricetin and myricetin inhibit CYP3A4. IC_{50} were determined as 25 μ M for dihydromyricetin and 24 μ M for myricetin.

Key words: Immunodetection, HPLC, inhibition, induction

(In Czech)

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
1 Úvod	9
1.1 Biotransformace xenobiotik	9
1.1.1 I. fáze biotransformace	10
1.1.2 II. fáze biotransformace.....	11
1.2 Cytochrom P450	12
1.2.1 Funkce cytochromů P450.....	12
1.2.2 Reakční cyklus cytochromů P450	13
1.2.3 Cytochrom P450 3A4.....	15
1.3 Flavonoidy	16
1.3.1 Interakce flavonoidů s cytochromem P450	18
1.3.2 Myricetin	19
1.3.3 Dihydromyricetin	20
2 Cíl práce	22
3 Materiál a metody	23
3.1 Použité chemikálie	23
3.2 Použité přístroje	24
3.3 Metody	25
3.3.1 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného.....	25
3.3.2 Western blot	26
3.3.3 Inhibice aktivity CYP3A4 působením flavonoidů	28
4 Výsledky	30
4.1 Western blot	30
4.2 Inhibice aktivity CYP3A4 působením flavonoidů	31
5 Diskuze	34
6 Závěr	36
Seznam použité literatury	37

Seznam použitých zkratek

6 β -OH-TST	6 β -hydroxytestosteron
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky ("aryl hydrocarbon receptor")
ATP	adenosintrifosfát
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
CBB	Coomassie brilliant blue
CYP	cytochrom P450
DHM	dihydromyricetin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GABA	kyselina 4-aminobutanová
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IC ₅₀	koncentrace sloučeniny, při které je dosaženo 50% maxima inhibičního efektu ("half maximal inhibition concentration")
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou ("low density protein")
MFO	mikrosomální monooxygenasový systém ("mixed function oxidases")
MYR	myricetin
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukováná forma)
NADPH-GS	NADPH-generující systém
NBT	nitrotetrazolová modř
PBS	isotonický fosfátový pufr
PVDF	polyvinylidenfluorid
PXR	jaderný receptor ("pregnane X receptor")
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPM	otáčky za minutu
SDS	dodecylsírán sodný

SDS-PAGE	diskontinuální elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
TEMED	N,N,N',N-tetramethylethylendiamin
Tris/HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid
UDP	uridindifosfát
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem

1 Úvod

V dnešní době je čím dál více kladen důraz na zdravý životní styl, se kterým je spojena i konzumace různých přírodních látek ve formě potravních doplňků. Ačkoliv by se mohlo zdát, že je tradiční medicína, kde je klíčovou součástí právě používání rostlin, na ústupu, opak je pravdou. Již od pradávna jsou léčivé rostliny využívány a v dnešní době tomu není jinak. V rozvojových zemích patří tzv. bylinkářství do základní zdravotní péče, v Číně mají dokonce ve více než 90 % nemocnic oddělení tradiční medicíny a v USA tuto léčebnou metodu praktikuje kolem 40 % dospělých lidí. Látky obsažené v rostlinách jsou využívány například k léčení kardiovaskulárních chorob, depresí, k posílení imunitního systému, atd. [1]. Značná část výzkumu se tedy zabývá efekty těchto přírodních látek na lidský organismus, které nemusí být vždy jen pozitivní. Nejpodstatnější skupiny látek izolovaných z rostlin jsou alkaloidy, terpeny, glykosidy a flavonoidy [2].

Flavonoidy, sekundární metabolity rostlin, jsou považovány za zdraví prospěšné látky a jsou přirozenou složkou naší potravy [3]. Řada z nich se používá právě jako potravní doplňky pro různé účely. Flavonoidní sloučeniny jsou studovány hlavně pro jejich chemopreventivní potenciál vycházející z jejich antioxidačních účinků, ale jsou důležité i pro své antibakteriální, antivirové, analgetické či protizánětlivé účinky [4, 5]. Mnohé studie nyní však poukazují na fakt, že některé flavonoidy mohou být i toxické a zasahovat do základních biochemických procesů jako jsou například interakce s monooxygenasami metabolizujícími xenobiotika [4]. Flavonoidy vykazují schopnost inhibovat aktivaci určitých karcinogenů a na druhé straně také indukovat expresi některých cytochromů P450 aktivujících jiné skupiny karcinogenů. Studium interakcí cytochromů P450 s flavonoidy je tedy velmi důležité pro pochopení jejich vlivu na zdraví člověka [6].

1.1 Biotransformace xenobiotik

Xenobiotika (z řeckého *xenos* = cizí, *bios* = život) jsou látky, které se přirozeně nevyskytují v organismu a nejsou pro něj jakkoliv nezbytné [7].

V dnešní době se s vývojem nových technologií začíná v životním prostředí hromadit velké množství těchto cizorodých látek, které mají většinou negativní dopad na lidské zdraví

[8]. Důležité je, že riziko poškození organismu je závislé na toxicitě, koncentraci a době působení dané látky. Za primární zdroj xenobiotik se považuje chemický průmysl a za sekundární pak oblasti lidské činnosti, ve kterých se produkty chemického průmyslu využívají. Jedná se například o lékařství a syntetické léky nebo potravinářství a ony hojně užívané potravní doplňky.

Xenobiotikum se do organismu dostává v několika fázích. Nejprve dochází ke vstupu xenobiotika, kdy závisí na jeho fyzikálně-chemických vlastnostech, do krevního řečiště a to hlavně třemi způsoby: trávicím ústrojím (žaludek, střeva), respiračním systémem (nosní sliznice, plíce) a pokožkou. Tyto tkáně jsou typické svým velkým povrchem, díky kterému mají vysokou resorpční schopnost. Poté dochází k distribuci cizorodé látky do cílových buněk. Transport xenobiotik může probíhat několika způsoby - volnou difúzí, zprostředkovanou difúzí (prostřednictvím interakcí s plazmatickými proteiny sloužícími jako transportéry), aktivním transportem nebo endo/exocytosou. Následně dochází k biotransformaci (viz dále) a eliminaci, kdy se přeměněné xenobiotikum dostává z buněk do krve a z organismu se vylučuje především ve stolici, moči, potu či vydechaném vzduchu [7].

Osud a odstranění xenobiotika z organismu závisí především na jeho metabolismu (biotransformaci), který je zprostředkován enzymovými systémy organismů [8]. Termín biotransformace cizorodých látek označuje degradační procesy, které probíhají ve všech živých systémech a jsou nepostradatelné pro zachování jedince, jelikož při vysokých koncentracích nebo dlouhodobém působení toxické látky dochází k nevratnému poškození organismu [7]. Při biotransformaci nejčastěji dochází ke ztrátě biologické aktivity a zvýšení polarita, která vede ke snadnějšímu vyloučení. V určitých případech však místo detoxikace dochází naopak k aktivaci xenobiotika, což je sice klíčové pro řadu léčiv, ale jsou tak také aktivovány genotoxické kancerogeny (enzymy, které jsou nezbytné pro detoxikaci jedné cizorodé látky, mohou zároveň zvyšovat toxicitu látky jiné) [9, 10].

U živočichů jsou rozlišovány dvě hlavní fáze biotransformace xenobiotik [7].

1.1.1 I. fáze biotransformace

V první fázi biotransformace, která se také nazývá derivatizační, dochází k odkrytí nebo zavedení chemicky reaktivních skupin (např. -OH, -COOH, -NH₂) a zvyšuje se tak hydrofilita xenobiotika. Tyto metabolity jsou nejen více rozpustné ve vodě a nedochází tak

k jejich hromadění, ale jsou schopné účastnit se konjugace s aminy, kyselinami a alkoholy při II. fázi biotransformace a mohou tak být snáze vylučovány z těla ven [7, 11]. Mezi nejdůležitější reakce I. fáze patří oxidace postranního řetězce, hydroxylace aromátů, deaminace, tvorba epoxidů, sulfooxidace, redukce nebo hydrolytické reakce.

Většina enzymových systémů přispívajících k metabolismu xenobiotik je lokalizována v endoplazmatickém retikulu. U savců se vyskytují zejména v játrech, a ta jsou díky tomu považována za hlavní biotransformační orgán xenobiotik [9, 11].

Mezi nejdůležitější skupiny enzymů účastnících se první fáze biotransformace patří monooxygenasy a dioxygenasy, přičemž monooxygenasy inkorporují jeden atom kyslíku do molekuly substrátu a dioxygenasy včleňují dva atomy. Monooxygenasy lze ještě dále rozdělit do dvou základních skupin. První skupinou jsou monooxygenasy flavinové, které katalyzují monohydroxylaci aromatického kruhu, a druhou skupinou jsou oxygenasy se smíšenou funkcí (viz dále). Další neméně významnou skupinou enzymů jsou peroxidasy, které redukují peroxid vodíku za současné oxidace další sloučeniny [8].

Řada xenobiotik, jako jsou například flavonoidy, obchází první fázi a přímo se účastní konjugačních reakcí druhé fáze biotransformace, jelikož již obsahují vhodnou funkční skupinu [11, 12].

1.1.2 II. fáze biotransformace

Ve druhé fázi biotransformace xenobiotik dochází ke konjugačním reakcím, kdy xenobiotikum, obsahující vhodnou funkční skupinu, interaguje s endogenní sloučeninou a produktem je konjugát, který je obvykle ve vodě rozpustnější než původní sloučenina a je tak snadněji vylučován z těla.

Mezi nejdůležitější konjugační reakce patří acetylace, methylace, sulfatace, glukuronidace, konjugace s glutathionem a s aminokyselinami. Tyto reakce jsou většinou katalyzovány enzymy ze třídy transferas, které se nacházejí v endoplazmatickém retikulu a v cytosolu buněk. Opět se jedná o enzymy vyskytující se v mnoha tkáních, především v játrech. Jako příklady těchto enzymů lze uvést glutathion-*S*-transferasu, sulfotransferasu nebo *N*-acetyltransferasu [7].

1.2 Cytochrom P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou enzymy účastníci se většiny biotransformačních procesů. Jedná se o membránové hemoproteiny patřící do skupiny monooxygenas, u kterých je pomocí hydrofobních sil a prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu vázán porfyrinový skelet. Evolučně se jedná o velmi staré enzymy s relativní molekulovou hmotností okolo 50 000, které byly nalezeny jak u prokaryot, tak v eukaryotických organismech. V lidském těle se nachází zejména v játrech, ale také v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku nebo v nadledvinkách [13, 14].

Cytochrom P450 byl pojmenován v roce 1961, kdy se zjistilo, že tento pigment (proto v názvu písmeno P) v redukovaném stavu tvoří komplexy s oxidem uhelnatým s charakteristickým absorpčním maximem při 450 nm. Tím se liší od ostatních hemoproteinů, u nichž absorpční maximum, Soretův pás, leží při nižších vlnových délkách [15, 16].

Jelikož je již známo značné množství genů kódující různé formy cytochromu P450, byla zavedena systematická nomenklatura, kde jsou tyto formy uspořádány do rodin a podrodin na základě procentuální aminokyselinové sekvenční podobnosti [17]. Enzymy, které sdílejí $\geq 40\%$ podobnost, spadají do rodin, a ty, které mají sekvenční podobnost $\geq 55\%$, tvoří podrodiny. Za zkratkou CYP, označující cytochrom P450, následuje číslo rodiny, písmeno podrodiny a číslo konkrétní isoformy (např. CYP3A4) [18]. V lidském organismu se nachází 18 rodin a 44 podrodin cytochromu P450, z čehož se nejvíce na metabolismu xenobiotik podílí rodiny CYP1, CYP2 a CYP3 [12].

1.2.1 Funkce cytochromů P450

Cytochromy P450 patří mezi enzymy jejichž aktivita může být ovlivněna dvěma způsoby - regulací exprese enzymu a modulací enzymové aktivity. Enzymová aktivita může být ovlivněna tzv. modulátory, které dělíme na aktivátory a inhibitory.

Inhibice cytochromu P450 může být buď reverzibilní, nebo ireverzibilní. Ireverzibilní inhibice vyžaduje biotransformaci inhibitoru a dochází ke vzniku kovalentní vazby reaktivního meziproduktu na protein nebo hem CYP. Pokud tento metabolický produkt inaktivuje enzym, jedná se o tzv. sebevražednou inhibici. Jako příklad pro takovou inhibici lze uvést furafyllin, inhibitor CYP1A2 nebo gestoden, inhibitor CYP3A4

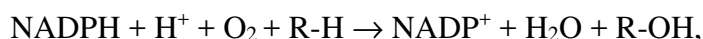
[19]. Reverzibilní inhibice nastává v důsledku kompetice v aktivním centru enzymu a pravděpodobně zahrnuje pouze první krok reakčního cyklu CYP. Vznikají zde pouze slabé vazby a v důsledku toho se jedná o dočasnou inhibici.

Indukce exprese cytochromů P450 exogenními sloučeninami je do značné míry zprostředkována aktivovanými transkripčními faktory. Mezi tyto nejznámější intracelulární receptory zapojené do iniciace transkripce CYP genů patří receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR z anglického "aryl hydrocarbon receptor").

V důsledku změny exprese genu a genetického polymorfismu vykazují jednotlivé lidské isoformy CYP rozdílné aktivity [8, 19, 20]. Z pohledu regulace na úrovni genové exprese se enzymy dělí na dva typy. Pokud nelze ovlivnit jejich genovou expresi nějakým exogenním stimulem, jedná se o enzymy konstitutivní, pokud genová exprese ovlivnit lze a zvyšuje se množství enzymu v organismu, jedná se o enzymy inducibilní. Exogenním stimulem jsou pak většinou sloučeniny, které nazýváme induktory.

1.2.2 Reakční cyklus cytochromů P450

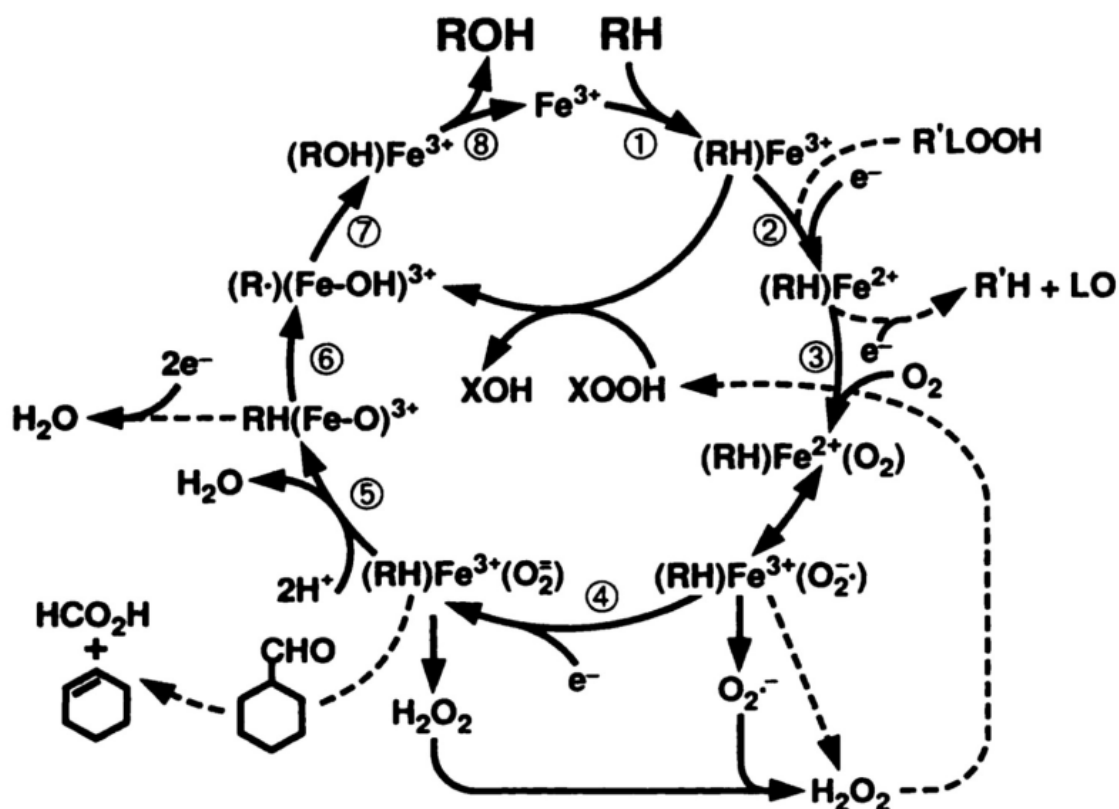
Pro metabolismus cizorodých látek jsou pravděpodobně nejdůležitější mikrosomální monooxygenasy (MFO, z anglického "mixed function oxidases") využívající molekulární kyslík. MFO systém se skládá z: flavinového enzymu NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy, hemthiolátového enzymu cytochromu P450, fakultativně může systém také obsahovat cytochrom b₅ a NADH:cytochrom b₅ reduktasu a důležité jsou také membránové lipidy [8]. Cytochrom P450 zde funguje jako terminální oxidasa, a v organismu je tak zodpovědný především za reakce I. fáze biotransformace, kde katalyzuje oxidační, redukční nebo peroxidační reakce [10, 21]. Obecnou reakci katalyzovanou cytochromem P450 lze vyjádřit rovnicí:



kde R-H představuje substrát a R-OH produkt. Reakce se nazývají monooxygenační, protože pouze jeden ze dvou atomů kyslíku se včlení do molekuly substrátu. Druhý atom kyslíku se redukuje na vodu [13]. Jako donory kyslíku pro oxidační reakce CYP slouží také peroxidy nebo peroxikyseliny.

Schéma reakčního cyklu cytochromu P450 se skládá z několika kroků (viz Obrázek 1, str. 14). 1) V počátečním stavu je atom hemového železa ve ferri formě

(s oxidačním číslem III) a nachází se v nízkospinovém stavu, přičemž šestá valence je obsazena nejčastěji atomem kyslíku vody. Poté, co substrát (R-H) vnikne do aktivního místa, vytlačí šestý ligand železa. Atom železa se dostává do vysokospinového stavu, čímž dochází ke změně konformace molekuly enzymu (projevuje se také posunem absorpčního pásu hemu). 2) V této formě může dojít k přijetí elektronu od NADPH:cytochrom P450 reductasy. Atom hemového železa se redukuje na oxidační číslo II, kdy ale stále zůstává ve vysokospinovém stavu. 3) Komplex cytochrom P450-O-O-substrát vzniká po navázání molekulárního kyslíku (atom železa se dostává do nízkospinové formy) a následně 4) je atom Fe podruhé redukován přijetím elektronu od NADPH:cytochrom P450 reductasy nebo od b₅ reductasy. 5, 6) Tím dochází k aktivaci molekuly kyslíku na peroxidový anion a ke štěpení vazby O-O. Jeden atom kyslíku přijímá dva protony a dochází k uvolnění vody, druhý zůstává vázán na atom železa hemu a vzniká tak ferrioxenový komplex. 7, 8) Nakonec se uvolňuje hydroxylovaná molekula substrátu a nativní forma CYP [8].



Obrázek 1: Schéma reakčního cyklu cytochromu P450. RH - substrát, ROH - produkt monooxygenace, Fe - atom hemového železa enzymu, R'LOOH - lipidický hydroperoxid, R'H + LO - redukční produkty hydroperoxidu, XOOH - peroxy sloučenina. Převzato z [14].

Cytochromy P450 hrají klíčovou roli v bioaktivaci a detoxikaci velmi širokého spektra cizorodých látek a jsou také zodpovědné za přeměny látek endogenních. Účastní se například biosyntézy sterolů, vitaminů nebo mastných kyselin [10, 17, 21]. CYP jsou proto stále intenzivně studovány, jelikož porozumění metabolismu xenobiotik umožňuje například modulovat účinky léčiv a zároveň tak snižovat jejich účinky vedlejší. Důležité jsou také pro výzkum chemoprevence, jelikož se uplatňují při aktivačních reakcích, kdy přeměňují cizorodé látky na prokarcinogeny, což jsou sloučeniny vykazující vyšší reaktivitu než sloučeniny původní. Jako příklad lze uvést benzo(a)pyren vznikající při nedokonalém spalování organických sloučenin (kouření, uzení masa), který je aktivován CYP1A1 na karcinogen [8, 14, 22]. I přes značné množství probíhajících výzkumů stále ještě existují takové cytochromy P450, u kterých není dosud zjištěna jejich funkce či regulace (tzv. sirotčí CYP) [23].

1.2.3 Cytochrom P450 3A4

Lidské cytochromy P450 3A se podílejí na biotransformaci až 50 % oxidačně metabolizovaných léčiv, na oxidaci endogenních látek či na oxidaci karcinogenů [14].

Součástí této rodiny jsou čtyři formy CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 a nedávno objevená CYP3A43, které jsou hojně zastoupeny v lidských játrech (30-40 % celkového obsahu cytochromů P450 v játrech) [24]. K expresi CYP3A4, CYP3A5 dochází primárně v dospělých tkáních, CYP3A7 je enzym detekovaný převážně v játrech plodu [25].

Prvním enzymem v lidských játrech, který se podařilo izolovat, byl CYP3A4, v té době nazýván P450NF (pro jeho charakteristický substrát - nifedipin) [26]. Cytochrom P450 3A4 je nejvýznamnějším cytochromem P450, a to jak z hlediska jeho obsahu v lidských játrech (jeho aktivitu se však podařilo detekovat také v tenkém střevě, mozku, placentě, děloze či ledvinách), tak v množství substrátů, které přeměňuje (více než 150 známých léčiv je substrátem právě pro tuto isoformu). Konkrétní příklady sloučenin, které slouží jako substráty, induktory či inhibitory CYP3A4 jsou uvedeny v Tabulce 1 (str. 16) [14, 25]. CYP3A4 je také důležitý pro metabolismus endogenních látek jako jsou testosteron (katalyzuje 6 β -hydroxylaci testosteronu, používanou k měření CYP3A4 aktivity), progesteron, androstenedion či žlučové kyseliny [27, 28].

Tabulka 1: Přehled vybraných substrátů, induktorů a inhibitorů pro CYP3A4.

	Substrát	Inhibitor	Induktor
CYP3A4	aflatoxin B, midazolam, nifedipin, tamoxifen, verapamil	erythromycin, grapefruitový džus, třezalka tečkovaná, ritonavir	dexametazon, fenobarbital, rifampicin

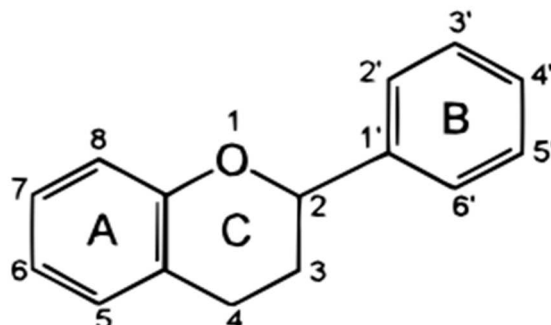
Údaje převzaty z: [26, 29-37].

U této rodiny existují značné interindividuální rozdíly v expresi CYP3A4. Molekulární podstata indukce tkví v jaterních transkripčních faktorech, známých jako PXR (pregnane X receptor), které aktivují expresi CYP3A4 v závislosti na xenobiotiku. Ukazuje se tedy, že PXR spolu s pohlavím a xenobiotiky jsou jedny z hlavních faktorů ovlivňujících expresi CYP3A4 u lidí, což by mohlo vysvětlovat již dříve pozorované variabilní odpovědi na podání léčiva [38]. Četné sekvenční "screeningy" identifikovaly až několik desítek převážně vzácných variant CYP3A4 ve všech hlavních etnických skupinách. Většina z těchto variant nemá žádné funkční důsledky nebo je příliš vzácná, aby mohla významně přispět k variabilitě CYP3A4. Na druhou stranu se ovšem ukazuje, že některé mohou hrát klíčovou roli v atypické odpovědi na léky nebo mohou vést ke změně citlivosti na karcinogeny [39-41]. Jako příklad lze uvést alelu CYP3A4*1B, která je spojována s rakovinou prostaty nebo prsu, přičemž frekvence jejího výskytu se v různých etnických skupinách výrazně liší (od 0% výskytu u Číňanů nebo Japonců až po 40% výskyt u Američanů a Evropanů) [42, 43].

1.3 Flavonoidy

Flavonoidy jsou fenolické sloučeniny rostlin tvořené z aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu a kyseliny malonové. Základní strukturou flavonoidů je flavanové jádro, které je tvořeno patnácti uhlíky spojenými do tří kruhů označených jako A, B, C (viz Obrázek 2, str. 17). Na základě struktury se flavonoidy dělí do osmi skupin: flavany, flavanony, isoflavanony, flavony, isoflavony, anthokyanidiny, flavonolignany a chalkony. Jednotlivé třídy se od sebe liší stupněm oxidace a druhem substituce kruhu C, přičemž

jednotlivé sloučeniny v rámci jedné skupiny se liší rozdílnou substitucí kruhu A a B. V současné době bylo identifikováno již více než 8000 sloučenin flavonoidů [4, 44].



Obrázek 2: Flavanová kostra. Základní struktura flavonoidů. Převzato z [44].

Flavonoidy se v rostlinách obecně vyskytují ve formě glykosidů a přispívají k zářivým odstínům modré, šarlatové a oranžové v listech, květech a plodech. V rostlině hrají několik důležitých rolí: slouží jako atraktanty pro opylující hmyz, jsou součástí obranného systému proti mikroorganismům či jiným škůdcům nebo pomáhají rostlině proti oxidačnímu stresu [4, 44, 45].

Hlavním zdrojem flavonoidů je ovoce (citrusy, jablka, meruňky, třešně, borůvky), zelenina (cibule, brokolice, rajčata, špenát), čaj nebo víno, ořechy či sójové boby [4]. Flavonoidy jsou tedy důležitou součástí lidské stravy a jejich denní příjem v potravě je například oproti vitamínům značně vysoký (vitamín C: 70 mg/den, vitamín E: 7 - 10 mg/den, flavonoidy: 50 - 800 mg/den). Tyto hodnoty jsou ale ve srovnání s hodnotami použitými ve většině studií velmi nízké [44, 46].

Flavonoidy byly objeveny v roce 1930 jako sloučeniny s výraznou antioxidační aktivitou, která je jedním z hlavních důvodů, proč jsou uváděny na trh ve formě potravních doplňků [4, 46]. Je známo, že hlavními volnými radikály v lidském těle jsou reaktivní formy kyslíku (ROS), například superoxidový anion radikál ($O_2^{\bullet-}$), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál (HO^{\bullet}), které mohou způsobit poškození buněčných komponent - DNA, lipidů nebo proteinů, což může vést k závažným onemocněním (např. rakovina, ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění nebo různé neurologické poruchy). Flavonoidy inhibují enzymy, které produkují ROS (například glutathion *S*-transferasu) nebo mohou reaktivní formy kyslíku také přímo vychytávat. Jsou proto v tomto ohledu velmi důležité,

jelikož dokáží zabránit oxidačním stresu vyvolanému nerovnováhou mezi tvorbou a odstraněním ROS [47, 48].

Flavonoidy jsou také studovány v souvislosti s ochranou proti peroxidaci lipoproteinu o nízké hustotě (LDL), což může být výhodou v boji proti kardiovaskulárním onemocněním. Některé studie ukazují vzájemný vztah mezi vysokou hodnotou spotřeby fenolických antioxidantů a snížením rizika onemocnění srdce či některých druhů rakoviny [46]. Protinádorová aktivita je přičítána zejména jejich schopnosti inhibovat topoisomerasu I a II, mohou zpomalovat proliferaci buněk nebo spouštět apoptózu [4]. Některé flavonoidy také vykazují antivirovou a antibakteriální aktivitu [49]. Na druhou stranu některé studie neukázaly žádné účinky nebo naopak zjistily negativní vlastnosti v užívání těchto sloučenin - některé flavonoidy mají mutagenní (např. isoquercitrin) nebo prooxidační účinky, inhibují biosyntézu prostaglandinů nebo mohou indukovat či inhibovat klíčové enzymy biotransformace [4, 46].

1.3.1 Interakce flavonoidů s cytochromem P450

Farmakokinetika flavonoidů je velmi komplexní a ne zcela objasněnou oblastí. Dlouho byla považována absorpce flavonoidů z potravy za zanedbatelnou, ale ukazuje se, že například quercetin je absorbován poměrně dobře a jen velmi málo eliminován z těla, což by mohlo významně přispívat v antioxidační obraně. Dalším faktorem je rozhodně čas. Dekonjugace glykosidů flavonoidů je poměrně dlouhá (23-28 hodin) a dochází tak při pravidelném příjmu k jejich nahromadění, čímž může dojít ke zvýšení koncentrace až na hodnotu potřebnou k projevení sledovaného účinku. V závislosti na typu sloučeniny pouze 5-10 % z množství přijatého flavonoidu se absorbuje v tenkém střevě a vstupuje do cirkulace. Mechanismus absorpce není zcela objasněn, zatímco distribuce pravděpodobně zahrnuje ATP-dependentní pumpy a ATP-independentní transportéry. Nakonec dochází k biotransformaci a vylučování pomocí žluči [50-52].

Pro pochopení biotransformace flavonoidů u lidí je důležité zjistit jejich indukční účinek na cytochromy P450 a jejich schopnost s nimi interagovat. Flavonoidy interagují s cytochromy P450, enzymy důležitými pro biotransformaci xenobiotik, několika způsoby. Jsou schopny indukovat biosyntézu několika CYP, inhibují nebo stimulují jejich enzymovou aktivitu a některé z nich jsou metabolizovány právě těmito enzymy. Do biotransformace

flavonoidů mohou však být zapojeny i enzymy druhé fáze (např. UDP-glukuronyltransferasa a *N*-acetyltransferasa) [4].

Flavonoidy mohou významně ovlivňovat koncentrace léků v krevní plazmě. Při současném podávání flavonoidů a klinicky používaných léčiv dochází k vzájemným interakcím, které mohou vést ke změnám farmakokinetiky léčiv a mít za následek zvýšení jejich toxicity či pokles jejich terapeutického účinku, což je důsledkem indukce CYP a/nebo modulace aktivity CYP flavonoidy. Některé flavonoidy indukují cytochromy P450 přímou stimulací genové exprese přes specifický receptor (AhR), do značné míry však může být tato vazba díky struktuře flavonoidů omezena. Inhibice genové exprese CYP enzymů blokováním AhR hraje důležitou roli u chemopreventivních vlastností flavonoidů. Celkově lze shrnout, že flavonoidy mající hydroxylové skupiny inhibují cytochromy P450, zatímco ty bez hydroxylové skupiny stimulují aktivitu enzymu. Ovšem i tento fakt má své výjimky - nesubstituovaný 7,8-benzoflavon je známý svou stimulací specifické CYP3A4 aktivity [4, 53, 54]. U rodiny cytochromů P450 3A jsou flavonoidy účinnými inhibitory (např. sylimarin) i stimulanty (např. tangerin) [55]. Na závěr lze konstatovat, že flavonoidy inhibují nebo aktivují lidské cytochromy P450 v závislosti na jejich struktuře a koncentraci [56].

1.3.2 Myricetin

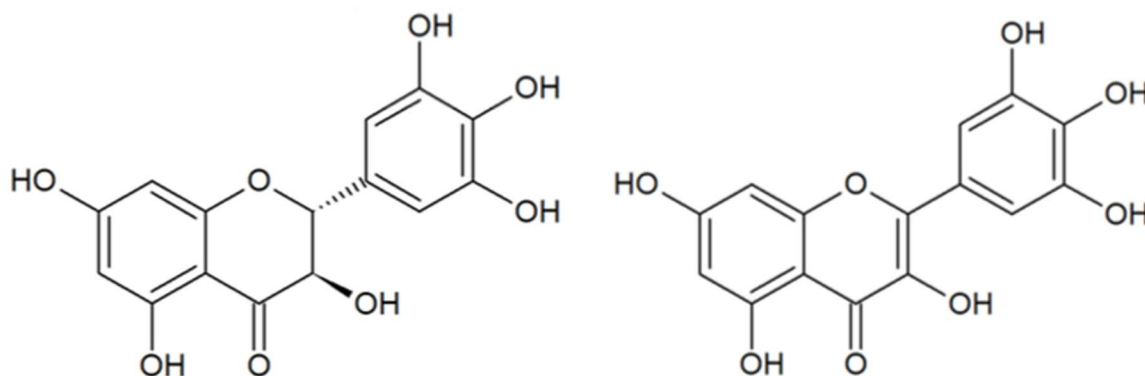
Myricetin (MYR), 3,3',4',5,5',7-hexahydroxyflavon (viz Obrázek 3, str. 20), je přirozeně se vyskytující flavonol. Nalézají se ve velkém počtu rostlin, většinou ve formě glykosidů [57]. Tato lipofilní sloučenina se skládá z 15 uhlíků a má antioxidační či antimikrobiální účinky. Hlavním problémem farmakologického použití MYR je jeho nízká rozpustnost ve vodě, s čím souvisí jeho špatná biologická dostupnost [57-59].

V naší potravě myricetin přijímáme v čajích, červeném víně, zelenině či ovoci (čím zralejší plod, tím větší má obsah této látky), přičemž jeho koncentraci ovlivňuje zpracování i skladování potravin [60]. Průměrný příjem myricetinu ze stravy je zhruba 0,98 - 1,1 mg za den [58]. Hlavním metabolickým orgánem jsou pro tuto sloučeninu játra, případně střevní stěna a ledviny. Degradace myricetinu závisí na teplotě i pH [59]. Jeho hlavním metabolitem je kyselina 3,5-dihydroxyfenyloctová, která se vylučuje močí [58]. Ve vztahu k cytochromům P450 je známo, že je inhibitorem CYP3A4 a CYP2C9 [62].

Myricetin má variabilní terapeutický potenciál [59]. Přestože je hlavně studován pro antioxidační vlastnosti, byly zjištěny i jeho prooxidační účinky. Jedná se o potencionální antikarcinogen, ale zároveň i látku, která může karcinogenesi podpořit [61]. Zkoumají se také jeho analgetické, protizánětlivé, antikoagulační či antitrombotické účinky, podle některých studií má myricetin ochranný charakter vůči stárnutí kůže a v neposlední řadě by mohl výrazně přispívat k léčbě diabetes mellitus.

1.3.3 Dihydromyricetin

Dihydromyricetin (DHM), [(2R,3R)-3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-on (viz Obrázek 3, str. 20), je méně známou a méně prozkoumanou flavonoidní sloučeninou než jakou je myricetin, oproti kterému se liší pouze dvojnou vazbou mezi druhým a třetím uhlíkem pyranového kruhu [63].



Obrázek 3: Strukturální vzorec dihydromyricetinu (vlevo) a myricetinu (vpravo). Převzato z [64, 57].

Vyskytuje se především ve dvou rostlinách: *Hovenia dulcis* (česky dužistopka sladká) a *Ampelopsis grossedentata*, podle níž se také někdy nazývá ampelopsin.

Hovenia dulcis patří do rodu řeštlákovitých, přirozený výskyt této rostliny sahá přes Japonsko, Koreu a východní Čínu až do Himalájí do nadmořských výšek 2 000 m. Pro jeho malé červenohnědé plody, které chutnají jako kombinace rozinek, skořice a hřebíčku, se nazývá někdy jako japonský rozinkový strom. Ve východní Asii je již tisíciletí využíván v tradiční bylinné medicíně k léčbě onemocnění jater, detoxikaci po otravě alkoholem,

podává se také proti horečce či k léčbě parazitárních infekcí. Navzdory těmto značným farmaceutickým výhodám není tato rostlina příliš používána v západních zemích [64].

Ampelopsis grossedentata je révovitá rostlina, ze které byl v roce 1940 poprvé DHM izolován. Lístky této rostliny se používají na přípravu tradičního čínského čaje [65, 66].

Účinky dihydromyricetinu nejsou v dnešní době ještě zcela známy, ale jsou hojně studovány. Ve studiích prováděných na potkanech jsou jedny z jeho nejdůležitějších vlastností zcela jistě jeho antialkoholové účinky působící jak na chování, tak na centrální nervovou soustavu. DHM u potkanů výrazně snižuje chuť na alkohol, působí také velmi dobře u projevů samotné abstinence, kdy potlačuje úzkost a přecitlivělost, a v poslední době se také hovoří o potencionálním ochranném účinku před fetálním alkoholovým syndromem. Tyto vlastnosti jsou pravděpodobně spojeny s faktem, že DHM je antagonist GABA receptorů, což jsou receptory, na které působí ethanol. Dihydromyricetin se také využívá jako látka účinná proti kocovině, jelikož podle některých výzkumů podporuje eliminaci ethanolu prostřednictvím zvýšení aktivity alkoholdehydrogenasy a acetaldehyddehydrogenasy [63, 67].

Dihydromyricetin je dále studován jako kardioprotektivní sloučenina při interakcích s adriamycinem, silnou chemoterapeutickou látkou, která má antioxidační a protizánětlivé účinky. Bylo zjištěno, že DHM může inhibovat růst metastázy rakoviny prostaty, silnou inhibiční aktivitu má také proti buňkám rakoviny prsu a leukemie a v neposlední řadě se také zkoumá jeho vliv na hladinu glukosy v krvi [65, 66, 68, 69].

DHM má mnoho pozitivních vlastností, které by dále mohly být využity v boji proti nejrůznějším onemocněním. Je ovšem důležité studovat také jeho vliv na aktivitu biotransformačních enzymů, které mohou tyto vlastnosti do značné míry ovlivňovat.

2 Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo určení vlivu flavonoidů myricetinu a dihydromyricetinu na expresi a aktivitu cytochromů P450 3A4. Inhibiční a indukční efekt těchto flavonoidů byl studován v mikrosomální frakci izolované z jater a střev orálně premedikovaných potkanů. Pro dosažení tohoto cíle bylo třeba splnit následující dílčí úkoly:

1. Provést imunodetekci CYP3A4 ve směsi elektroforeticky separovaných mikrosomálních proteinů pomocí specifické protilátky.
2. Stanovit inhibiční schopnosti dihydromyricetinu vůči CYP3A4.

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

APIChem (Čína)

dihydromyricetin

Bio-Rad (USA)

Nitrocellulose membranes 0,2 μm , peroxidisíran amonný, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit 10%

Fluka (Švýcarsko)

2-merkptoethanol, dodecylsíran sodný (SDS), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)

Gentest - BD Biosciences (USA)

supersomy (TM) obsahující homologní CYP3A2, NADPH:cytochrom P450 reduktasu a cytochrom b₅

Lachema Brno (Česká republika)

bromfenolová modř, ethanol, glycerol, chlorid hořečnatý, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, methanol, uhličitan sodný

Lach-ner (Česká republika)

dihydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan sodný, glycin, hydrogenfosforečnan sodný, chlorid sodný

Mlékárna Pragolaktos, a.s. (Česká republika)

trvanlivé mléko 0,5%

Promega (USA)

5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát (BCIP), nitrotetrazolová modř (NBT)

Proteintech (Velká Británie)

primární králičí protilátka proti CYP3A4 (18227-1-AP)

Serva (Německo)

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

Sigma-Aldrich (USA)

6 β -hydroxytestosteron, dichlormethan, fenacetin, glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, kozí IgG protilátka proti králíkovi s konjugovanou alkalickou fosfatasou (A3687), NADPH, NADP⁺, testosteron

Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Japonsko)

myricetin

Whatman (USA)

Filtrační papír, č. 3

Mikrosomy izolované z potkanů byly připraveny na katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v roce 2014.

3.2 Použité přístroje

Analytické váhy

Discovery, Ohaus Corp. (USA)

Automatické pipety

Eppendorf (Německo); Nichiryo (Japonsko)

Blotovací systém

Trans-Blot® Turbo™ Blotting Systém, Bio-Rad (USA)

Centrifugy

Centrifuge 5418, Eppendorf (Německo); Spectrafuge Mini Centrifuge C1301B, Labnet International, Inc. (USA)

Elektroforetická aparatura

Mini-PROTEAN® Tetra Cel, Bio-Rad (USA)

HPLC systém

Agilent technologies 1200 (USA) - čtyřkanálová peristaltická pumpa 1200, 1200 automatický dávkovač ALS G1329A, 1200 vakuový degasser G1322A, zahříváč kolony LCO102, ECOM s.r.o.

Injekční mikrostříkačka

MICROLITER Syringe 702RN, Hamilton (Švýcarsko)

Inkubátory

Mini Dry Bath - BS-MINIB-100I, BioMaker (Čína); Thermomixer kompakt, Eppendorf (Německo)

Laboratorní třepačka

SHO-2D, Witeg (Německo); Vortex Genius 3, IKA-Werke GmbH & Co. KG (Německo)

Magnetická míchačka

Monotherm, Variomag (Německo)

Předvážky

KERN EW 600-2M, Kern & Sohn GmbH, (Německo)

Rotační zahušťovací zařízení

CentriVap Benchtop Vacuum Concentrators, LABCONCO (USA)

Zdroj pro elektroforézu

PowerPac Basic, Bio-Rad (USA)

3.3 Metody

3.3.1 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

Jednou z nejrozšířenějších elektroforetických metod je gelová elektroforesa. Jedná se o separační metodu, při níž se proteiny rozdělují na základě molekulové hmotnosti a elektroforetické pohyblivosti. Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE) využívá SDS, který se váže na proteiny a udává jim shodný záporný náboj. V gelové elektroforese se pak bílkoviny dělí především podle jejich relativní molekulové hmotnosti.

Polymerační gely: TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit 10%

4x koncentrovaný vzorkový pufr: 0,25 M Tris/HCl; 8% (w/v) SDS; 20% (v/v) 2-merkptoethanol; 40% (v/v) glycerol; 0,004% (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8

Elektrodový pufr: 0,192 M glycin; 0,025 M Tris/HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3

Barvicí lázeň: 0,25% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250; 46% (v/v) EtOH; 9,2% (v/v) kyselina octová

Odbarvovací lázeň: 25% (v/v) ethanol; 10% (v/v) kyselina octová

Nejprve byly dle návodu uvedeného výrobcem (TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit 10%) připraveny polymerační roztoky pro gely o síle 1 mm. Hustota rozdělovacího gelu byla 10%, hustota zesíťování zaostřovacího gelu není výrobcem uvedena.

Do jamek byly nanášeny vzorky mikrosomů a standardu molekulových hmotností. Vzorky mikrosomů byly ředěny vodou a vzorkovým pufrům na výslednou koncentraci proteinu 1 mg/ml v případě jater a 2 mg/ml v případě střev a byly 5 minut vařeny při 100 °C. Po 45 minutách, kdy gely zpolymerovaly, bylo do každé jamky pomocí injekční mikrostříkačky nanášeno 20 µl vzorku, tedy 20 µg proteinu, respektive 40 µg. Jako standard byl použit *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*, kterého se do jamky nanášelo 5 µl. Gely byly vloženy do elektroforetické vany (Mini-PROTEAN® Tetra Cel), která byla naplněna elektrodoým pufrům, a byly připojeny ke konstantnímu zdroji napětí 200 V (PowerPac Basic) přibližně po dobu jedné hodiny (dokud čelo udávané bromfenolovou modří nebylo cca 1 cm od spodního okraje gelu).

Po ukončení elektroforezy byly zaostřovací gely odstraněny a separační byly ponořeny na 60 minut do barvicí lázně a následné odbarvování v odbarvovací lázni probíhalo přes noc. Gel, který nebyl barven, byl použit pro Western blot.

3.3.2 Western blot

Metoda otisků (z anglického "blotting") je metodou umožňující přenos molekul z mobilní fáze (např. protein v polyakrylamidovém gelu) do pevné fáze (PVDF nebo nitrocelulosová membrána). Přenos lze uskutečnit pomocí stejnosměrného proudu či běžnou difúzí. Zviditelnění přenesených molekul poté probíhá pomocí různých barviv či reakcemi s protilátkami ("imunoblotting").

Western blot umožňuje elektropřenos proteinů z gelu na membránu. Proteiny jsou detekovány imunochemicky - po inkubaci se specifickou primární protilátkou jsou rozeznány pomocí sekundární protilátky, která je značená identifikovatelnou sondou (např.

fluoresceinem) nebo enzymovou aktivitou (např. alkalickou fosfatase nebo křenuvou peroxidase).

Přenosový pufr: 144,0 g glycin; 30,0 g Tris; pH 8,3

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

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

Vyvolávací roztok

vyvolávací pufr (V = 5 ml): 100 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; pH 9,0

33 µl **NBT**

16,5 µl **BCIP**

Po elektroforese byl separační gel 20 minut za pokojové teploty inkubován v přenosovém pufru, který obsahoval 10% methanol. Během této doby byla připravena nitrocelulosaová membrána (Nitrocellulose membranes 0,2 µm), jejíž velikost odpovídala separačnímu gelu. Membrána byla aktivována ponořením do elektrodového pufru (1 minuta), následně do destilované vody (1 minuta) a nakonec do transferového pufru, kde byla ponechána zhruba 5 minut. Na spodní kazetu blotovacího přístroje (anoda; Trans-Blot® Turbo™ Blotting System) byl složen tzv. "sendvič" - tři filtrační papíry Whatman č. 3 namočené v transferovém pufru, nitrocelulosaová membrána, polyakrylamidový gel a opět tři filtrační papíry Whatman č. 3 namočené v transferovém pufru. Vše bylo uzavřeno vrchní kazetou (katoda) a elektropřenos probíhal po dobu 7 minut, konstantní proud byl 1,3 A.

Po ukončení byla membrána blokována v blokovacím roztoku při 4 °C po dobu jedné hodiny za stálého míchání na třepačce (SHO-2D), aby nedošlo k nespecifickým interakcím mezi membránou a primární protilátkou. Poté byla membrána při 4 °C přes noc inkubována v 6 ml roztoku primární protilátky v blokovacím roztoku opět za stálého míchání na třepačce. Primární protilátka proti CYP3A4 produkovaná v králíkovi byla ředěna podle doporučení výrobce 1:600.

Druhý den byla membrána třikrát promyta 15 ml PBS Triton-X100 a následně inkubována 10 minut v roztoku sekundární protilátky, který byl připraven zředěním PBS Triton-X100 pufrům v poměru 1:1428. Jako sekundární protilátka byla použita kozí IgG protilátka proti IgG králíka s konjugovanou alkalickou fosfatase. Následně byla

membrána opět třikrát promyta PBS Triton-X100. Zviditelnění proběhlo pomocí 5 ml vyvolávacího pufru, ke kterému bylo nejprve přidáno 33 µl NBT a následně 16,5 µl BCIP. Nakonec byla membrána ponořena do destilované vody a vysušena pomocí filtračního papíru.

3.3.3 Inhibice aktivity CYP3A4 působením flavonoidů

Specifickou aktivitou CYP3A4 je 6β-hydroxylace testosteronu, která se využívá pro stanovení jeho aktivity. Detekce produktu probíhala pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) je běžně používanou separační metodou. Samotná chromatografie je metoda rozdělovací látky mezi dvě fáze - mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). U HPLC je stacionární fází pevná látka či kapalina, zatímco mobilní fází je vždy kapalina. Chromatografický systém se skládá ze zásobníku mobilní fáze, vysokotlakého čerpadla, dávkovacího ventilu, kolony a detektoru. V HPLC je dosahováno vysoké účinnosti separace a velkou výhodou je také její rychlost.

Inkubační směs (V = 0,5 ml)

fosfátový pufr: 0,1 M KH₂PO₄; pH 7,4 (upraveno: hydroxidem draselným)

mikrosomální frakce: 0,5 mg/ml proteinu

testosteron: 50 µM v methanolu

NADPH-generující systém (GS): 1 mM NADP⁺; 10 mM MgCl₂; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

flavonoid: dihydromyricetin (0,1 µM - 1 mM) nebo myricetin (1 µM - 100 µM);
přídavek v 10 µl methanolu

Zastavovací roztok: 1 M Na₂CO₃; 2 M NaCl

Vnitřní standard: 1 mM phenacetin v methanolu

Extrakční činidlo: CH₂Cl₂

Jednotlivé inkubační směsi byly připraveny v tripletech. Všechny složky byly do inkubační směsi přidány v takovém množství, které odpovídalo uvedeným koncentracím,

a směs byla doplněna do 500 μ l fosfátovým pufrem. Jako poslední bylo přidáno 50 μ l NADPH-GS, čímž byla reakce nastartována. Všechny vzorky byly promíchány na vortexu (Vortex Genius 3) a poté za stálého třepání 15 minut inkubovány při 37 °C (450 otáček za minutu - RPM; Thermomixer compact) v otevřených mikrozkušnicích. Reakce byla zastavena přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku a intenzivním zamícháním. Mikrostríkačkou typu Hamilton bylo do každého roztoku přidáno 5 μ l 1 mM roztoku phenacetinu jako vnitřního standardu pro HPLC.

Poté byl přidán 1 ml dichlormethanu a tato směs byla 2 minuty intenzivně třepána při 1 400 RPM za pokojové teploty (Thermomixer compact). Pro oddělení fází byla směs centrifugována 5 minut při 13 000 RPM (Centrifuge 5418). Spodní organická fáze byly odebrány do nových mikrozkušnic a byla provedena druhá extrakce vodní fáze přidáním 1 ml dichlormethanu.

Spojené extrakty byly odpařovány do sucha na rotačním zahušťovacím zařízení při 37 °C cca 30 minut.

Jako vnitřní standard byl použit phenacetin. Pro analýzu HPLC byl vzorek rozpuštěn v 25 μ l methanolu a na kolonu (Macherey-Nagel, Nucleosil 100-5 C18 HD) bylo aplikováno 20 μ l. Rozdělení směsi probíhalo při 37 °C a průtoku mobilní fáze 0,6 ml/min. Byla použita gradientová eluce, kdy se složení mobilní fáze mění lineárně s časem (vzrůstající koncentrace - 50% methanol až 75% methanol). Celkový čas analýzy jednoho vzorku byl 35 minut.

4 Výsledky

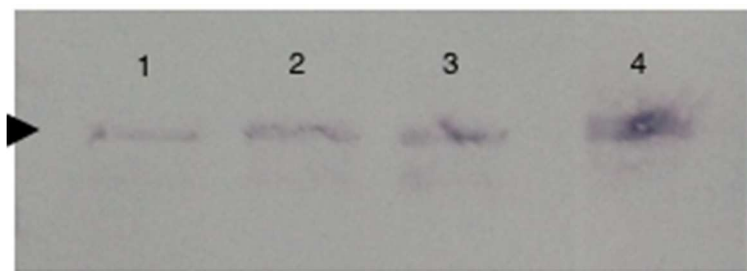
4.1 Western blot

Množství enzymu CYP3A4 v jednotlivých vzorcích (játra, tenké střevo - proximální, střední a distální část, tlusté střevo) potkanů v závislosti na vlivu flavonoidů bylo sledováno metodou Western blot (viz kapitoly 3.3.1 a 3.3.2).

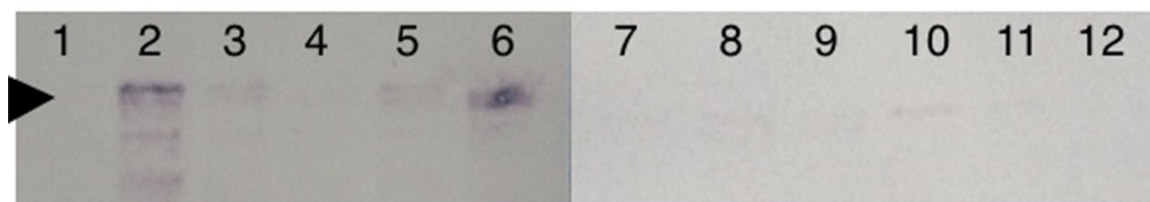
Paralelní elektroforesou, při které nebyl gel dále použit pro metodu Western blot, bylo kontrolováno množství naneseného proteinu ve všech jamkách (do každé dráhy nanášeno 20 μg , respektive 40 μg proteinu). Po obarvení gelu, který byl použit pro metodu Western blot, byla vizuálně hodnocena úspěšnost elektropřenosu.

Na nitrocelulosové membráně byly zóny CYP3A4 detekovány pomocí primární králičí protilátky proti cytochromu P450 3A4 a následně vizualizovány pomocí alkalické fosfatasy, která byla konjugována na anti-králičí IgG. Pozitivní kontrolou při imunodetekci CYP3A4 byly supersomy (TM) obsahující homologní CYP3A2, NADPH:cytochrom P450 reduktasu a cytochrom b_5 .

Ze zobrazených membrán (Obrázek 4, str. 30; Obrázek 5, str. 31) lze usoudit, že podané flavonoidy, dihydromyricetin ani myricetin, nevyvolávají v játrech ani v žádné části střev potkanů výrazné změny v expresi cytochromů P450 3A4. Jako kontrolní vzorky sloužily játra a střeva potkanů premedikovaných slunečnicovým olejem.



Obrázek 4: Vliv dihydromyricetinu a myricetinu na indukci CYP3A4. Pro elektroforesu byl použit 10% polyakrylamidový gel, do každé dráhy bylo aplikováno 20 μg proteinu. Šipkou je vyznačena pozice CYP3A4. Do jamek byly nanášeny vzorky v redukujícím pufru v následujícím pořadí: potkaní jaterní mikrosomy po premedikaci slunečnicovým olejem - kontrolní vzorek (1); potkaní jaterní mikrosomy po premedikaci dihydromyricetinem (2) a myricetinem (3); pozitivní kontrola pro imunodetekci CYP3A4 (4).

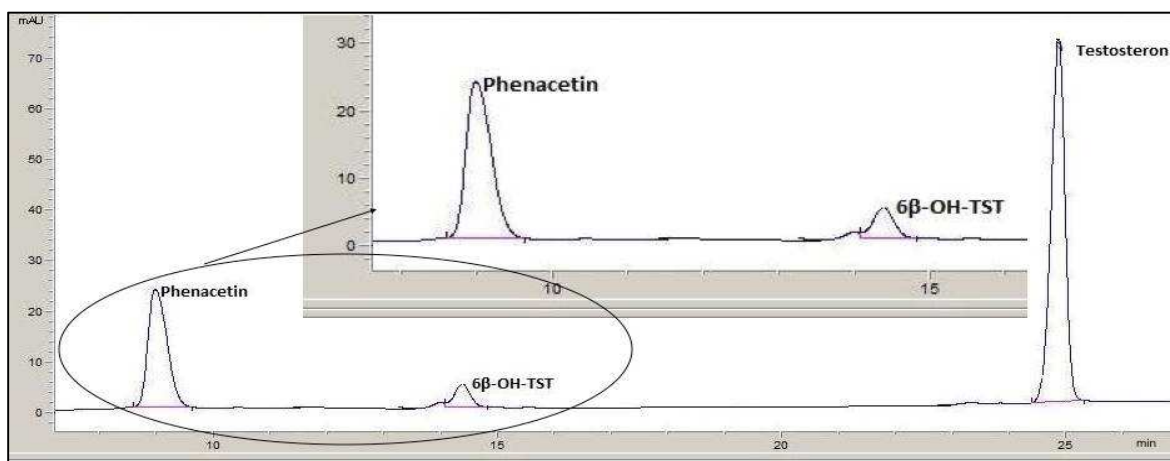


Obrázek 5: Vliv dihydromyricetinu a myricetinu na indukci CYP3A4. Pro elektroforesu byl použit 10% polyakrylamidový gel, do každé dráhy bylo aplikováno 40 μg proteinu. Šipkou je vyznačena pozice CYP3A4. Do jamek byly nanášeny vzorky v redukcujícím pufru v následujícím pořadí: potkaní mikrosomy tenkého střeva proximální části po premedikaci slunečnicovým olejem - kontrolní vzorek (1); dihydromyricetinem (2); potkaní mikrosomy tenkého střeva střední části po premedikaci slunečnicovým olejem - kontrolní vzorek (3); dihydromyricetinem (4); myricetinem (5); pozitivní kontrola pro imunodetekci CYP3A4 (6); potkaní mikrosomy tenkého střeva distální části po premedikaci slunečnicovým olejem - kontrolní vzorek (7); dihydromyricetinem (8); myricetinem (9); potkaní mikrosomy tlustého střeva po premedikaci slunečnicovým olejem - kontrolní vzorek (10); dihydromyricetinem (11); myricetinem (12).

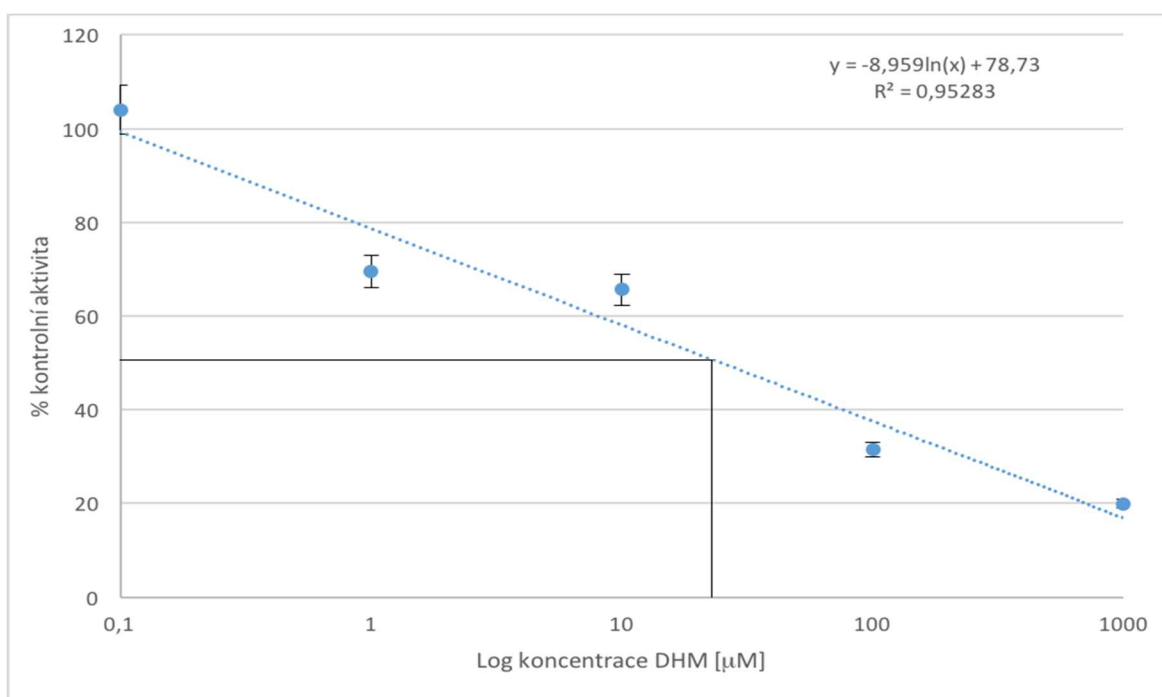
4.2 Inhibice aktivity CYP3A4 působením flavonoidů

Aktivita CYP3A4 byla určována pomocí specifické reakce, kterou je 6β -hydroxylace testosteronu. Inhibice aktivity CYP3A4 byla sledována na základě tvorby produktu 6β -OH-TST v závislosti na přídávku flavonoidu. Dihydromyricetin byl přidáván do reakční směsi ve výsledné koncentraci 0,1 μM - 1000 μM , myricetin pak ve výsledné koncentraci 1 μM - 100 μM . Jako kontrola sloužil vzorek s přídávkem 10 μl methanolu (100% kontrolní aktivita) a vzorek bez přídávku NADPH-GS (0% kontrolní aktivita). Reakční směsi byly připravovány v celkovém objemu 0,5 ml (viz kapitola 3.3.3). Phenacetin, substrát i jeho hydroxylovaný metabolit byly detekovány při 254 nm v časech přibližně 8, 14 a 25 minut (viz Obrázek 6, str. 32).

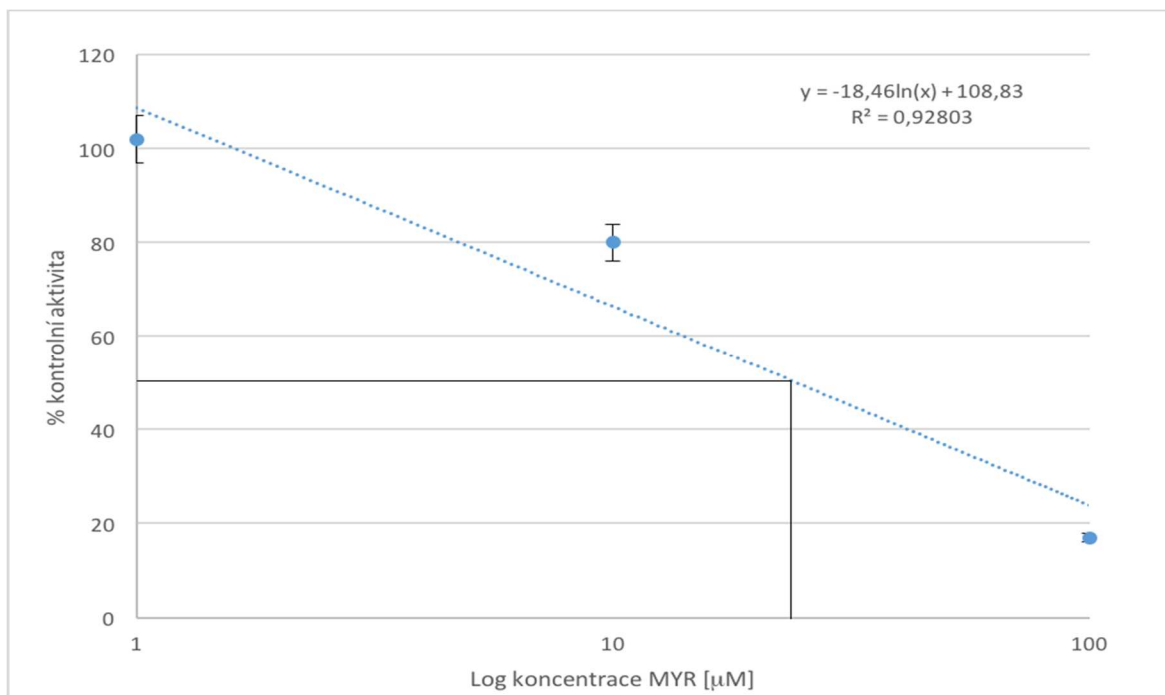
Z naměřených hodnot (Obrázek 7, str. 32; Obrázek 8, str. 33) lze usoudit, že dihydromyricetin i myricetin vykazují inhibiční aktivitu vůči cytochromu P450 3A4. Hodnota IC_{50} pro dihydromyricetin byla stanovena jako 25 μM . Přibližná hodnota IC_{50} pro MYR byla stanovena jako 24 μM . Myricetin jako prokázaný inhibitor CYP3A4 byl použit pro komparaci a průkaz validity experimentálního systému.



Obrázek 6: *Representativní chromatogram separace reakční směsi na HPLC.* Jako vnitřní standard byl použit phenacetin. Pro analýzu HPLC bylo na kolonu (Macherey-Nagel, Nucleosil 100-5 C18 HD) aplikováno 20 μ l vzorku rozpuštěného v methanolu. Rozdělení směsi probíhalo při 37 °C a průtoku mobilní fáze 0,6 ml/min. Byla použita gradientová eluce, kdy se složení mobilní fáze mění lineárně s časem (koncentrace methanolu mezi 50% - 75%). Celkový čas analýzy vzorku byl 35 minut. Phenacetin, substrát (testosteron) i jeho hydroxylovaný metabolit (6 β -OH-TST) byly detekovány při 254 nm v časech přibližně 8, 14 a 25 minut.



Obrázek 7: *Inhibice aktivity CYP3A4 dihydromyricetinem.* Dihydromyricetin byl přidáván do reakční směsi o celkovém objemu 0,5 ml v 10 μ l methanolu. Inhibice aktivity CYP3A4 je vyjádřena v procentech kontrolní aktivity. Množství 6 β -OH-TST bylo stanoveno pomocí HPLC a standardizováno na phenacetin.



Obrázek 8: Inhibice aktivity CYP3A4 myricetinem. Myricetin byl přidáván do reakční směsi o celkovém objemu 0,5 ml v 10 µl methanolu. Inhibice aktivity CYP3A4 je vyjádřena v procentech kontrolní aktivity. Množství 6β-OH-TST bylo stanoveno pomocí HPLC a standardizováno na phenacetin.

5 Diskuze

Cytochromy P450 jsou jedny z nejdůležitějších enzymů účastnících se biotransformace xenobiotik. Při těchto reakcích však často vznikají meziprodukty, které mohou být i toxické. V dnešní době dochází k výraznému rozvoji průmyslu - především pak farmaceutického, chemického či potravinářského, a množství cizorodých látek v prostředí tak výrazně stoupá. Mezi velmi propagované a populární patří především potravní doplňky, jejichž hlavní složkou jsou přírodní látky, např. flavonoidy. Flavonoidy jsou fytochemikálie, které vykazují širokou škálu komplexních biologických aktivit vyplývajících především z jejich antioxidačních vlastností. Mechanismus působení flavonoidů v lidském těle není ještě zcela znám a studie týkající se vlivu flavonoidů na CYP jsou proto velmi důležité.

V této bakalářské práci byl zkoumán vliv dihydromyricetinu a myricetinu na expresi cytochromů P450 3A4. Dihydromyricetin, jinak též ampelopsin, je přírodní flavonoid známý pro řadu svých pozitivních účinků na lidské zdraví, které ale ještě nejsou zcela objasněny a potvrzeny. Myricetin lišící se od dihydromyricetinu pouze dvojnou vazbou (mezi uhlíky C2 a C3) byl již intenzivně studován zejména pro své antioxidační vlastnosti a interakce se systémem cytochromů P450. V této práci sloužil především jako komparativní sloučenina, protože je prokázaným inhibitorem CYP3A4 [70, 71].

Pro sledování indukce CYP3A4 byla zvolena metoda Western blot, kdy je cílový protein na membráně detekován pomocí kombinace primární a sekundární protilátky. Z těchto experimentů (Obrázek 4, str. 30; Obrázek 5, str. 31) lze usuzovat, že nedochází k žádnému významnému zvýšení exprese CYP3A4 v játrech ani střevech vůči kontrolnímu vzorku (potkani premedikovaní slunečnicovým olejem) vlivem DHM či MYR, což je v rozporu s výsledky studie, kdy byla zjištěna možná indukce CYP3A4 dihydromyricetinem [72]. Na rozdíl od našich experimentů byl dihydromyricetin potkanům podáván v opakovaných dávkách, mohlo tedy docházet k jeho nahromadění a důsledkem zvýšené koncentrace poté k určitému indukčnímu efektu. V jiných studiích byl zjištěn slabý indukční efekt DHM na CYP2B1 a CYP1A2 ve střední části tenkého střeva a jater. U druhého flavonoidu, myricetinu, byla zjištěna slabá indukce CYP1A2; ostatní studie neprokazují výraznější indukční vlastnosti této sloučeniny na cytochromy P450, což potvrzují i výsledky této práce. Celkově lze konstatovat, že indukční efekt těchto flavonoidů na CYP je nevýznamný [73]. Mezi známé sloučeniny, které indukují expresi CYP3A4, patří například dexametazon, fenobarbital či rifampicin [36].

Relativní molekulová hmotnost CYP3A4 je přibližně 57 000. Přítomnost jiných zón na membránách (viditelná zóna proteinů kolem relativní molekulové hmotnosti 75 000 u mikrosomů izolovaných z jater, proximální a střední části střev) byla pravděpodobně způsobena nespecifitou primární protilátky.

Mikrosomální vzorky proximální části tenkého střeva po premedikaci myricetinem nebyly k dispozici, a proto nemohla být porovnána indukce mezi flavonoidy a kontrolním vzorkem. Lze ale odhadnout, že ani zde by pravděpodobně nedošlo k výrazné změně exprese CYP3A4.

V další části této práce byla pozorována inhibiční schopnost dihydromyricetinu a myricetinu na CYP3A4 metodou HPLC, kdy bylo sledováno ovlivnění tvorby produktu 6 β -OH-TST v závislosti na vzrůstající koncentraci flavonoidů. U obou flavonoidů byla zjištěna inhibiční aktivita. Dále byla stanovena hodnota koncentrace sloučeniny, při které je dosaženo 50% maxima inhibičního efektu (pro dihydromyricetin IC_{50} (CYP3A4) = 25 μ M a pro myricetin IC_{50} (CYP3A4) = 24 μ M. Tyto výsledky jsou v souladu s dosavadními provedenými studiemi, myricetin je považován za účinný inhibitor CYP3A4. Hodnota IC_{50} se v závislosti na typu studie poněkud liší - obvykle se pohybuje v rozmezí 8 μ M - 15 μ M, což jsou hodnoty, které naznačují, že se jedná o poměrně silný inhibitor CYP3A4 [70, 71]. Dále byla také například zjištěna jeho inhibice exprese CYP2C9 či CYP2D6 [74]. Inhibiční vlastnosti dihydromyricetinu na CYP3A4 dosud nebyly zkoumány. V ostatních studiích se ukazuje, že je například mnohem slabším inhibitorem CYP2B1/2 než myricetin, a to pravděpodobně v důsledku absence dvojně vazby, kterou se od sebe liší. Co se týče hodnot IC_{50} byla inhibice aktivity CYP3A4 srovnatelná u obou testovaných flavonoidů a lze předpokládat, že také DHM bude účinným inhibitorem této podrodiny CYP.

Studie zaměřené na odhalení vztahu mezi strukturou a biologickou funkcí flavonoidních sloučenin zejména z hlediska ovlivnění cytochromů P450 jsou velmi cenné pro cílené navrhování léčiv.

6 Závěr

Tato bakalářská práce se věnovala studiu vlivu flavonoidů dihydromyricetinu a myricetinu na cytochromy P450 3A4. V teoretické části byly z odborné literatury shrnuty dosavadní poznatky týkající se vlastností a reakčních schopností CYP, vliv již prostudovaných flavonoidů na tyto biotransformační enzymy a nakonec byly charakterizovány flavonoidy DHM a MYR. Experimentální část je zaměřena na inhibiční a indukční efekt těchto flavonoidů na aktivitu enzymů CYP3A4. Provedené experimenty poskytly tyto výsledky:

- Ve střevech a játrech potkanů nedošlo k indukci exprese CYP3A4 po premedikaci dihydromyricetin a myricetinem.
- Dihydromyricetin i myricetin vykazují srovnatelné inhibiční vlastnosti vůči aktivitě cytochromů P450 3A4.
- Byla stanovena koncentrace těchto flavonoidů pro dosažení 50% maxima inhibičního efektu: pro dihydromyricetin byla IC_{50} (CYP3A4) = 25 μ M a pro myricetin IC_{50} (CYP3A4) = 24 μ M.

Seznam použité literatury

- [1] Zhang AL, Changli Xue C, Fong HHS. Herbal Medicine: Biomolecular and clinical aspects, In: Benzie II, Wachtel-Galor S (Eds.), 2. vyd. Los Angeles: Taylor and Francis group, 2011.
- [2] Springob K, Kutchan TM. Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application, In: Osbourn A, Lanzotti V (Eds.), 1. vyd, New York: Springer, 2009.
- [3] Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* 2002, 22(1), 19-34.
- [4] Hodek P, Trefil P, Stiborová M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem Biol Interact.* 2002, 139(1), 1-21.
- [5] Yokohira M, Yamakawa K, Saoo K, Matsuda Y, Hosokawa K, Hashimoto N, Kuno T, Imaida K. Antioxidant effects of flavonoids used as food additives (purple corn color, enzymatically modified isoquercitrin, and isoquercitrin) on liver carcinogenesis in a rat medium-term bioassay. *J Food Sci.* 2008, 73(7), 561-568.
- [6] Hodek P, Teplá M, Křížková J, Šulc M, Stiborová M. Modulation of cytochrome P450 enzyme system by selected flavonoids. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009, 30(1), 67-71.
- [7] Knejzlík Z, Káš J, Ruml T. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem Listy.* 2000, 94, 913-918.
- [8] Stiborová M, Hudeček J, Páca J ml, Martínek V, Páca J. Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem Listy.* 2004, 98, 876-890.
- [9] Lüllmann H, Mohr K, Ziegler L, Bieger D. Color atlas of pharmacology. 2., upr. vyd. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2000.
- [10] Stiborová M. Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace. Sborník z multioborového semináře "Otevřená věda" z 22.- 29. 10. 2005, Praha.
- [11] Ioannides C. Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics, In: Anderson D, Waters MD, Marrs TC (Eds.), 1. vyd. Chichester: John Wiley, 2002.

- [12] Hodek P, Křížková J, Burdová K, Šulc M, Kizek R, Hudeček J, Stiborová M. Chemopreventive compounds--view from the other side. *Chem Biol Interact.* 2009, 180(1), 1-9.
- [13] Spatzenegger M, Jaeger W. Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Metab Rev.* 1995, 27(3), 397-417.
- [14] Stiborová M, Hudeček J, Hodek P, Frei E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem Listy.* 1999, 93, 229-237.
- [15] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem.* 1964, 239(7), 2370-2378.
- [16] Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet.* 2002, 360(9340), 1155-1162.
- [17] Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, a kol. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA.* 1987, 6(1), 1-11.
- [18] Omiecinski CJ, Rimmel RP, Hosagrahara VP. Concise review of the cytochrome P450s and their roles in toxicology. *Toxicol Sci.* 1999, 48(2), 151-156.
- [19] Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol.* 2008, 82(10), 667-715.
- [20] Lin JH, Lu AY. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 1998, 35(5), 361-390.
- [21] Paine AJ. The cytochrome P450 gene superfamily. *Int J Exp Pathol.* 1991, 72(3), 349-363.
- [22] Gelboin HV. Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev.* 1980, 60(4), 1107-1166.
- [23] Stark K, Guengerich FP. Characterization of orphan human cytochromes P450. *Drug Metab Rev.* 2007, 39(2-3), 627-637.
- [24] Finta C, Zaphiropoulos PG. The human cytochrome P450 3A locus. Gene evolution by capture of downstream exons. *Gene.* 2000, 260(1-2), 13-23.

- [25] Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev.* 1997, 29(1-2), 413-580.
- [26] Brian WR, Sari MA, Iwasaki M, Shimada T, Kaminsky LS, Guengerich FP. Catalytic activities of human liver cytochrome P-450 IIIA4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry.* 1990, 29(51), 11280-11292.
- [27] Waxman DJ, Lapenson DP, Aoyama T, Gelboin HV, Gonzalez FJ, Korzekwa K. Steroid hormone hydroxylase specificities of eleven cDNA-expressed human cytochrome P450s. *Arch Biochem Biophys.* 1991, 290(1), 160-166.
- [28] Yamazaki H, Shimada T. Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 1997, 346(1), 161-169.
- [29] Bren U, Fuchs JE, Oostenbrink C. Cooperative binding of aflatoxin B1 by cytochrome P450 3A4: a computational study. *Chem Res Toxicol.* 2014, 27(12), 2136-2147.
- [30] Thummel KE, O'Shea D, Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD, Wilkinson GR. Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 1996, 59(5), 491-502.
- [31] Berthou F, Dreano Y, Belloc C, Kangas L, Gautier JC, Beaune P. Involvement of cytochrome P450 3A enzyme family in the major metabolic pathways of toremifene in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 1999, 47(10), 1883-1895.
- [32] Pichard L, Fabre I, Fabre G, Domergue J, Saint Aubert B, Mourad G, Maurel P. Cyclosporin A drug interactions. Screening for inducers and inhibitors of cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) in primary cultures of human hepatocytes and in liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 1990, 18(5), 595-606.
- [33] Ameer B, Weintraub RA. Drug interactions with grapefruit juice. *Clin Pharmacokinet.* 1997, 33(2), 103-121.
- [34] Dürr D, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Rentsch KM, Steinert HC, Meier PJ, Fattinger K. St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther.* 2000, 68(6), 598-604.

- [35] Greenblatt DJ, von Moltke LL, Harmatz JS, Durol AL, Daily JP, Graf JA, Mertzanis P, Hoffman JL, Shader RI. Differential impairment of triazolam and zolpidem clearance by ritonavir. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000, 24(2), 129-136.
- [36] Corcos L. Phenobarbital and dexamethasone induce expression of cytochrome P-450 genes from subfamilies IIB, IIC, and IIIA in mouse liver. *Drug Metab Dispos*. 1992, 20(6), 797-801.
- [37] Nims RW, Beebe LE, Utermahlen WE, Thomas PE ml, Lubet RA. Induction of Hepatic Cytochromes P450 by Dietary 1,4-Bis[2-(3,5 dichloropyridyloxy)] benzene (TCPOBOP) in the B6C3F1 Mouse: Dose-Dependence and Pharmacodynamics. *Int J Toxicol*. 2016, 18(2), 123-130.
- [38] Wolbold R, Klein K, Burk O, Nüssler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology*. 2003, 38(4), 978-988.
- [39] Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002, 54(10), 1271-1294.
- [40] Eiselt R, Domanski TL, Zibat A, Mueller R, Presecan-Siedel E, Hustert E, Zanger UM, Brockmoller J, Klenk HP, Meyer UA, Khan KK, He YA, Halpert JR, Wojnowski L. Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants. *Pharmacogenetics*. 2001, 11(5), 47-58.
- [41] Dai D, Tang J, Rose R, Hodgson E, Bienstock RJ, Mohrenweiser HW, Goldstein JA. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001, 299(3), 825-831.
- [42] Keshava Ch, McCanlies EC, Weston A. CYP3A4 Polymorphisms - Potential Risk Factors for Breast and Prostate Cancer: A HuGE Review. *Am J Epidemiol*. 2004, 160(9), 825-841.
- [43] Zeigler-Johnson CM, Walker AH, Mancke B, Spangler E, Jalloh M, McBride S, Deitz A, Malkowicz SB, Ofori-Adjei D, Gueye SM, Rebbeck TR. Ethnic differences in the frequency of prostate cancer susceptibility alleles at SRD5A2 and CYP3A4. *Hum Hered*. 2002, 54(1), 13-21.
- [44] Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. 2000, 63(7), 1035-1042.

- [45] Dixon RA, Harrison MJ. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Adv Genet.* 1990, 28(3), 165-234.
- [46] Ferguson LR. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res.* 2001, 475(1-2), 89-111.
- [47] Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012, 24(5), 981-990.
- [48] Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci World J.* 2013, 29(3), 202-218.
- [49] Xu HX, Wan M, Dong H, But PP, Foo LY. Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-1 protease. *Biol Pharm Bull.* 2000, 23(9), 1072-1076.
- [50] Batra P, Sharma AK. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *Biotech.* 2013, 3(6), 439-459.
- [51] Hollman PC, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother.* 1997, 51(8), 305-310.
- [52] Hollman PC, Arts IC. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 2000, 80(7), 1081-1093.
- [53] Shih H, Pickwell GV, Quattrochi LC, Differential effects of flavonoid compounds on tumor-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. *Arch Biochem Biophys.* 2000, 373(1), 287-294.
- [54] Ueng YF, Kuwabara T, Chun YJ, Guengerich FP. Cooperativity in oxidations catalyzed by cytochrome P450 3A4. *Biochemistry.* 1997, 36(2), 370-381.
- [55] Jančová P, Anzenbacherová E, Papoušková B, Lemr K, Luzná P, Veinlichová A, Anzenbacher P, Šimánek V. Silybin is metabolized by cytochrome P450 2C8 in vitro. *Drug Metab Dispos.* 2007, 35(11), 2035-2039.
- [56] Kale A, Gawande S, Kotwal S. Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. *Phytother Res.* 2008, 22(5), 567-577.
- [57] Ong KC, Khoo HE. Biological effects of myricetin. *Gen Pharmacol.* 1997, 29(2), 121-126.

- [58] Yong Li, Ye Ding, Minireview: Therapeutic potential of myricetin in diabetes mellitus. *Food Sci Hum Wellness*. 2012, 1(1), 19-25.
- [59] Lin RD, Chin YP, Lee MH. Antimicrobial activity of antibiotics in combination with natural flavonoids against clinical extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Phytother Res*. 2005, 19(7), 612-617.
- [60] Semwal DK, Semwal RB, Combrinck S, Viljoen A. Myricetin: A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities. *Nutrients*. 2016, 8(2), 90-102.
- [61] Yao Y, Lin G, Xie Y, Ma P, Li G, Meng Q, Wu T. Preformulation studies of myricetin: a natural antioxidant flavonoid. *Pharmazie*. 2014, 69(1), 19-26.
- [62] Choi DH, Li C, Choi JS. Effects of myricetin, an antioxidant, on the pharmacokinetics of losartan and its active metabolite, EXP-3174, in rats: possible role of cytochrome P450 3A4, cytochrome P450 2C9 and P-glycoprotein inhibition by myricetin. *J Pharm Pharmacol*. 2010, 62(7), 908-914.
- [63] Shen Y, Lindemeyer AK, Gonzalez C, Shao XM, Spigelman I, Olsen RW, Liang J. Dihydromyricetin as a novel anti-alcohol intoxication medication. *J Neurosci*. 2012, 32(1), 390-401.
- [64] Hyun TK, Eom SH, Yu CY, Roitsch T. *Hovenia dulcis*--an Asian traditional herb. *Planta Med*. 2010, 76(10), 943-949.
- [65] Kou X, Chen N. Pharmacological potential of ampelopsin in Rattan tea, *Food Sci Hum Wellness*, 2012, 1(1), 14-18.
- [66] Wu S, Liu B, Zhang Q, Liu J, Zhou W, Wang C, Li M, Bao S, Zhu R. Dihydromyricetin reduced Bcl-2 expression via p53 in human hepatoma HepG2 cells. *PLoS One*. 2013, 8(11):e76886.
- [67] Liang J, Olsen RW. Alcohol use disorders and current pharmacological therapies: the role of GABA(A) receptors. *Acta Pharmacol Sin*. 2014, 35(8), 981-993.
- [68] Zhu H, Luo P, Fu Y, Wang J, Dai J, Shao J, Yang X, Chang L, Weng Q, Yang B, He Q. Dihydromyricetin prevents cardiotoxicity and enhances anticancer activity induced by adriamycin. *Oncotarget*. 2015, 6(5), 3254-3267.
- [69] Wu B, Lin J, Luo J, a kol. Dihydromyricetin Protects against Diabetic Cardiomyopathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *BioMed Res Int*. 2017.

- [70] Li C, Lim SC, Kim J, Choi JS. Effects of myricetin, an anticancer compound, on the bioavailability and pharmacokinetics of tamoxifen and its main metabolite, 4-hydroxytamoxifen, in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2011, 36(3), 175-182.
- [71] Lee W, Woo ER, Choi JS. Effects of myricetin on the bioavailability of carvedilol in rats. *Pharm Biol.* 2012, 50(4), 516-522.
- [72] Huang Y, Xu Z, Ye Q. Effect of Dihydromyricetin on Cytochrome P450 Isoforms CYP1A2, CYP2C9 and CYP3A4 in Rats. *Lat Am J Pharm.* 2013, 32(10), 1570-1574.
- [73] Boštíková Z, Moserová M, Pavek P, Stiborová M, Hodek P. Role of dihydromyricetin in cytochrome P450-mediated metabolism and carcinogen activation. *Neuro Endocrinol Lett.* 2015, 36(1), 46-52.
- [74] Guo YJ, Zheng SL. Effect of myricetin on cytochrome P450 isoforms CYP1A2, CYP2C9 and CYP3A4 in rats. *Pharmazie.* 2014, 69(4), 306-310.

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

Jméno a příjmení (s adresou)	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka