

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Šárka Veselá

Interakce vybraných flavonoidů s *N*-acetyltransferasami

Interaction of selected flavonoids with *N*-acetyltransferases

Bakalářská práce

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

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele 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

Touto cestou bych ráda poděkovala prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení této bakalářské práce, za trpělivost a cenné rady při jejím vypracování. Rovněž bych ráda poděkovala mým kolegům za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Flavonoidy jsou přírodní látky syntetizované v rostlinách jako sekundární metabolity. Vzhledem k široké škále jejich biologických účinků, z nichž můžeme zmínit například účinky antioxidační, hepatoprotektivní či antibakteriální, jsou v současné době stále více používány jako složka potravních doplňků. Kromě pozitivních účinků byly ovšem pozorovány i účinky nežádoucí, zejména mutagenní a pro-oxidační vliv. Velmi podstatným dějem, který je ovlivňován flavonoidními sloučeninami, je biotransformace. Interakce flavonoidů s biotransformačními enzymy, a to jak v I. fázi biotransformace, tak i ve fázi druhé, jsou zcela zásadní pro metabolismus léčiv a v této souvislosti také pro procesy karcinogenese.

V této bakalářské práci byl studován vliv vybraných flavonoidů myricetinu a dihydromyricetinu na aktivitu *N*-acetyltransferasy 1 a 2, enzymů II. fáze biotransformace. Především byl zkoumán mechanismus tohoto působení.

Experimentálně byla ověřena inhibice lidské rekombinantní *N*-acetyltransferasy 1 i 2 působením jak myricetinu, tak dihydromyricetinu. Hlubším studiem interakcí *N*-acetyltransferasy 1 a 2 s těmito vybranými flavonoidy bylo prokázáno, že zvýšení koncentrace druhého substrátu (*p*-aminobenzoová kyselina, sulfamethazin) nevede k potlačení inhibičního efektu. Je tedy velmi pravděpodobné, že oba flavonoidy inhibují již první krok reakce, tedy acetylaci enzymu acetylkoenzymem A.

Klíčová slova: dihydromyricetin, myricetin, inhibice, acetylace

Abstract

Flavonoids are natural compounds synthesized in plants as secondary metabolites. Due to broad range of their biological effects, for example we can mention antioxidant, hepatoprotective or antibacterial effects, flavonoids are increasingly used as a component in dietary supplements. Besides positive effects, some negative effects were observed, especially mutagenic and pro-oxidative properties. The biotransformation is an important process which is affected by flavonoids. Interactions between flavonoids and biotransformation enzymes in both phases of biotransformation are essential for the metabolism of drugs and carcinogenesis processes.

In this bachelor thesis the influence of selected flavonoid compounds, myricetin and dihydromyricetin, on the activity of *N*-acetyltransferase 1 and 2, enzymes of second phase of biotransformation, was studied. Mainly the mechanism of this influence was tested.

The inhibition of human recombinant and of *N*-acetyltransferase 1 and 2 by myricetin and dihydromyricetin was proved. The more in-depth study of interactions of *N*-acetyltransferase 1 and 2 with selected flavonoids shows that raising concentration of second substrate (*p*-aminobenzoic acid, sulfamethazine) does not lead to reduction of inhibition effect. Thus, it is highly probable that both flavonoids already inhibit the first step of the reaction, the acetylation of enzyme by acetylcoenzyme A.

Key words: dihydromyricetin, myricetin, inhibition, acetylation

(In Czech)

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	7
1 Úvod.....	9
1.1 Flavonoidy.....	9
1.1.1 Účinky flavonoidů.....	11
1.1.2 Myricetin.....	12
1.1.3 Dihydromyricetin.....	13
1.2 Biotransformace xenobiotik.....	14
1.2.1 I. fáze biotransformace.....	15
1.2.2 II. fáze biotransformace.....	15
1.3 <i>N</i> -acetyltransferasy.....	17
1.3.1 Lidská <i>N</i> -acetyltransferasa 1 a 2.....	19
1.3.2 Inhibitory NAT.....	19
2 Cíl práce.....	22
3 Materiál a metody.....	23
3.1 Použité chemikálie.....	23
3.2 Použité přístroje.....	23
3.3 Metody.....	24
3.3.1 Měření katalytické aktivity NAT.....	24
3.3.2 Inhibice aktivity NAT působením MYR a DHM.....	25
3.3.3 Určení typu inhibice aktivity NAT působením MYR a DHM.....	26
4 Výsledky.....	27
4.1.1 Ověření linearity reakcí katalyzovaných NAT.....	27
4.1.2 Inhibice aktivity NAT působením MYR a DHM.....	28
4.1.3 Mechanismus inhibice aktivity NAT působením MYR a DHM.....	30
5 Diskuze.....	34
6 Závěr.....	36
Seznam použité literatury.....	37

Seznam použitých zkratek

AcCoA	acetylkoenzym A
ADH	alkoholdehydrogenasa
ALDH	acetaldehyddehydrogenasa
AUD	poruchy způsobené nadměrným příjmem alkoholu, („alcohol use disorders“)
CoA	koenzym A
DHM	dihydromyricetin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina, Ellmanovo činidlo
GST	glutathion- <i>S</i> -transferasa
Gua-HCl	guanidin hydrochlorid
IC ₅₀	koncentrace sloučeniny, při které je dosaženo 50% maxima inhibičního efektu („half maximal inhibition concentration“)
K _i	inhibiční konstanta
MetOH	methanol
MYR	myricetin
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaná forma)
NAT	<i>N</i> -acetyltransferasa
PABA	<i>p</i> -aminobenzoová kyselina
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPM	otáčky za minutu

SMZ	sulfamethazin
SULT	sulfotransferasa
TNB	5'-thionitrobenzoová kyselina
TPMT	thiopurinmethyltransferasa
Tris/HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid
UDP	uridindifosfát
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa

1 Úvod

V průběhu minulého století došlo k obrovskému rozvoji chemie léčiv. Nové poznatky v této oblasti a rozmach farmaceutického průmyslu velmi přispěly ke změnám ve zdravotní péči ve většině vyspělých států po celém světě. Největší změnou bylo především soustředění veškeré léčebné péče do nemocnic a zvýšené používání synteticky vyráběných léčiv [1]. Ovšem v některých, zejména rozvojových zemích jako je Indie, Čína či státy Afriky, se tradiční medicína zachovala, a dokonce je stále součástí základní zdravotní péče [2, 3].

V posledních 25 letech se díky důrazu na zdravý životní styl opět začal zvyšovat zájem o přírodní medicínu a alternativní způsoby léčby i v zemích s moderní léčebnou péčí [4]. Například v USA vzrostl počet lidí využívající alternativní léčbu, zahrnující i tzv. bylinkářství, během 90. let o téměř 10 %, a to zejména při léčbě chronických stavů, bolestí zad a hlavy nebo při depresích [5]. V roce 1994 byla ve Spojených státech amerických přijata legislativa, která vymezuje termín „doplňky stravy“ či „potravní doplňky“ jako novou třídu produktů s pozitivními účinky na lidské zdraví. Jsou to produkty obsahující vitamíny, minerály, aminokyseliny nebo léčivé látky z rostlin [6].

Rostoucí obliba potravních doplňků v poslední době způsobila i zvýšený zájem vědců a lékařů o tyto přípravky [7]. Ukazuje se, že kromě pozitivních účinků na lidské zdraví mohou mít některé látky obsažené v těchto doplňcích při nadměrném užívání i negativní vliv. Z nežádoucích účinků těchto preparátů lze jmenovat alergické a toxické reakce, lékové interakce či možné mutagenní účinky [6].

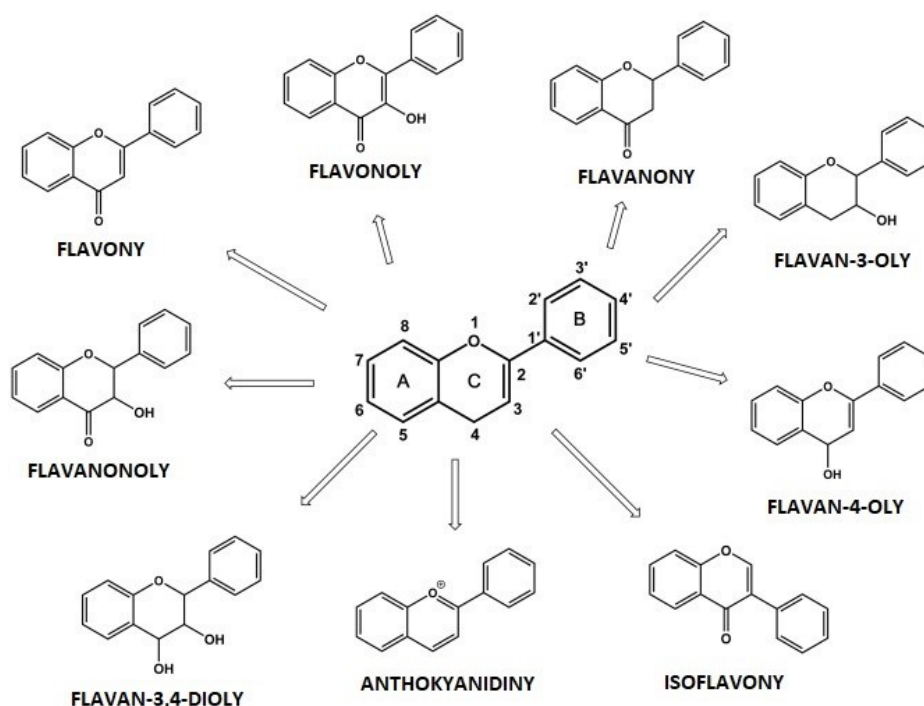
1.1 Flavonoidy

Rostliny jsou k léčebným účelům využívány po staletí. Existuje řada forem, ve kterých mohou být léčivé látky z rostlin přijímány. Dříve byly používány jak celé rostliny, buď čerstvé anebo sušené například ve formě čajů, tak i různé extrakty z rostlin používané jako sirupy, masti nebo třeba oleje. Nyní jsou látky z rostlin různými způsoby izolovány a dále zpracovávány, nejčastěji jako tablety a kapsle s vysokým obsahem těchto extrahovaných účinných látek.

Z chemického hlediska jsou sloučeniny v rostlinách velmi rozmanité [2]. Rozdělit je lze na dvě velké skupiny. První skupinou jsou primární metabolity, které jsou esenciální pro

život a růst rostlin samotných. Druhou skupinou jsou pak sekundární metabolity, které nejsou pro život rostlin nezbytné, ale slouží jim například jako pigmenty lákající hmyz, jako signální molekuly nebo mají ochrannou funkci. Právě tyto sekundární metabolity jsou dnes zpracovávány do formy potravních doplňků [8]. Pojmem sekundární metabolity je označováno více než 100 tisíc chemických struktur izolovaných z rostlin. Nejvíce zastoupenými skupinami jsou pak alkaloidy, terpeny, glykosidy a flavonoidy [9].

Flavonoidy jsou fenolické sloučeniny, které jsou v rostlinách syntetizovány z aromatických aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu a z kyseliny malonové [10]. Základní struktura je tvořena 15 uhlíkovými atomy uspořádanými do dvou benzenových kruhů, které jsou propojeny pomocí pyranového heterocyklu. Tato struktura se také označuje jako flavanové jádro [11]. Základní kostra může být dále substituována různými atomy nebo skupinami atomů, velmi často jsou to hydroxylové nebo methoxylové skupiny. Podle těchto substituentů a jejich polohy lze flavonoidy dělit do několika skupin. Nejpočetnějšími skupinami jsou flavonoly, flavony, isoflavony, flavanoly, flavanonoly a anthokyanidiny. Existují i další podskupiny, které ovšem nemají tak široké zastoupení (Obrázek č. 1, str. 10) [12].



Obrázek č. 1: Rozdělení flavonoidů do základních skupin. Uprostřed je základní kostra flavonoidů, tzv. flavanové jádro, která je dále substituována za vzniku mnoha flavonoidních sloučenin. Převzato z [13], upraveno.

V rostlinách se flavonoidy vyskytují především v glykosylované formě, a to zejména v pokožce listů, květů a ve slupkách plodů. Plní zde mnoho důležitých funkcí. Některé z flavonoidů pomáhají při opylení jako atraktanty, jiné naopak mají ochrannou funkci proti hmyzím škůdcům, mají také důležitou roli při transportu elektronů v průběhu fotosyntézy a v poslední řadě chrání rostliny před UV zářením a oxidačním stresem [14].

1.1.1 Účinky flavonoidů

Flavonoidy jsou syntetizovány pouze v rostlinách, živočichové si je vytvořit neumí. Přesto jsou flavonoidy nedílnou součástí stravy člověka [11]. Přijímáme je v zelenině, ovoci, semenech, oříškách, ale i v čajích nebo červeném víně [14]. Již dříve byly flavonoidy používány ve větším množství v koncentrovanějších formách (např. včelí propolis) k léčbě různých zdravotních problémů. Sloužily k léčbě zánětů, alergií, nachlazení, žaludečních vředů nebo včelích bodnutí [15]. Pozdějším studiem těchto sloučenin bylo prokázáno mnoho pozitivních účinků na lidský organismus.

Zatím nejlépe popsanou vlastností je schopnost flavonoidů působit jako antioxidanty. Zejména flavony a katechiny plní důležitou funkci při ochraně buněk a tkání proti volným radikálům a reaktivním formám kyslíku (ROS) [16]. Mechanismy antioxidačního působení jsou různé. Flavonoidy mohou fungovat jako inhibitory enzymů zodpovědných za tvorbu volných radikálů, například NADH oxidasa, či mohou přímo vychytávat ROS ve tkáních nebo regulují a chrání systémy přirozené antioxidační obrany. Jednotlivé mechanismy mohou být vzájemně kombinovány. Velmi častým důsledkem oxidačního stresu je lipidová peroxidace a flavonoidy se i zde významně podílejí na ochraně lipidů [11].

Mezi další pozitivní účinky řadíme hepatoprotektivní efekt, který byl popsán u některých flavonoidních sloučenin, například u katechinu nebo apigeninu [16]. Některé chronické nemoci mohou vést k trvalému poškození jater opět kvůli působení ROS, i zde se proto uplatňuje antioxidační aktivita flavonoidů [11]. Navíc bylo prokázáno, že silymarin stimuluje enzymovou aktivitu DNA-dependentní RNA polymerasy I. V důsledku toho dochází ke zvýšené biosyntéze DNA a buněčné proliferaci, což vede k lepší regeneraci jaterní tkáně [17]. Silymarin má tedy poměrně široké uplatnění v medicíně. Používá se při léčbě jaterní cirhózy, při ischemických poškozeních a při toxické hepatitidě [18].

Dále jsou to antibakteriální účinky. V rostlinách jsou flavonoidy syntetizovány zejména za účelem ochrany před mikrobiální infekcí, není tedy překvapivým zjištěním, že

jejich extrakty vykazují stejné vlastnosti [11]. Bylo prokázáno, že quercetin zcela inhibuje růst bakterie *Staphylococcus aureus* [16]. Antibakteriální flavonoidy v buňce působí na širší spektrum cílů. Tvoří komplexy s proteiny pomocí vodíkových či kovalentních vazeb, tím může docházet k inaktivaci adhezinů, enzymů, buněčných transportních bílkovin atp. Lipofilní flavonoidy pak například narušují mikrobiální membrány [19, 20].

Neméně podstatnou a zkoumanou vlastností jsou protirakovinné účinky. Flavonoidy obsažené v zelenině a ovoci působí chemopreventivně. Uvádí se, že míra spotřeby cibule a jablek, dvou důležitých zdrojů flavonoidů v potravě, negativně koreluje s výskytem rakoviny prostaty, plic, žaludku a prsu [21]. Mezi další pozitivní vlastnosti těchto sloučenin patří protizánětlivé účinky, pozitivní vliv na kardiovaskulární systém nebo ovlivňování regenerace Langerhansových ostrůvků při onemocnění *diabetes mellitus* [16].

Běžné denní dávky flavonoidů přijímaných v potravě jsou zhruba 50 – 1000 mg/den, z čehož největší procento tvoří quercetin. Při překračování těchto denních dávek byly ovšem již pozorovány i negativní účinky na lidský organismus. Dávky používané v některých flavonoidních léčivech jsou pro organismus toxické a vedou k selhání ledvin, kožním reakcím, rozpadu červených krvinek nebo k trombocytopenii [15, 22].

1.1.2 Myricetin

Myricetin (MYR), 3,3',4',5,5',7-hexahydroxyflavon, je chemická sloučenina řadící se mezi přirozeně se vyskytující flavonoidy. Běžně je přijímán v zelenině a ovoci. Vyskytuje se jak ve volné, tak v glykosidicky vázané formě. MYR je velmi špatně rozpustný ve vodě, ale velmi dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech. Patří do skupiny flavonolů, například spolu s luteolinem a quercetinem, a vykazuje vlastnosti typické pro tyto sloučeniny, zejména vlastnosti antioxidační. Právě díky svým účinkům má široké využití ve farmacii, kde se využívá jeho protizánětlivý, analgetický, protinádorový a hepatoprotektivní efekt [23, 24].

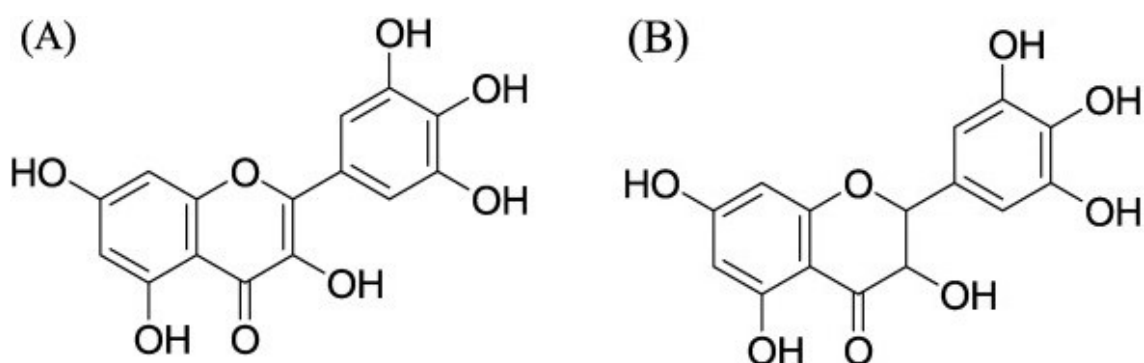
Je prokázáno, že MYR je vstřebáván v žaludku i ve střevě. Hlavním metabolickým orgánem jsou pak játra, v menší míře je metabolizován v renálních tubulech, plicích a kůži. Vylučován je nejčastěji jako kyselina 3,5-dihydroxyfenolactová močí [25].

MYR je častou složkou doplňků stravy a kosmetických produktů, kdy se využívá jeho antioxidačních účinků a schopnosti chránit lipidy před oxidačním poškozením. Ačkoli

tyto kladné vlastnosti jsou nezpochybnitelné, v poslední době se ukazuje, obdobně jako u dalších flavonoidů, že myricetin může působit i toxicky a pro-oxidačně. Zůstává tak nadále velmi zkoumanou sloučeninou [24].

1.1.3 Dihydromyricetin

Dihydromyricetin (DHM), 3,3',4',5,5',7-hexahydroxy-2,3-dihydroflavonol, se rovněž řadí mezi flavonoidy [23]. Tato sloučenina byla identifikována v sušených listech *Ampelopsis grossedentata* společně s myricetinem a myricitrinem. Přestože jsou zde flavonoidy MYR i DHM obsaženy ve značně vysokém množství, je jejich purifikace z listů rostliny poměrně obtížná [26]. Bylo prokázáno, že díky velmi podobné struktuře DHM a MYR (liší se pouze jednou dvojnou vazbou, viz Obrázek č. 2, str. 13), lze izolovaný DHM v extraktech *Ampelopsis grossedentata* dehydrogenací přeměňovat na MYR [27].



Obrázek č. 2: Struktura myricetinu (A) a dihydromyricetinu (B). Převzato z [23], upraveno.

DHM je také jednou z flavonoidních složek rostlin rodu *Hovenia*, které řadíme do čeledi řešetlákovitých. Tyto rostliny s jedlými plody chutí připomínající rozinky jsou pěstovány především ve východní Asii. Přirozeně se vyskytují v pásmu vedoucím od Japonska, přes Koreu a Čínu až po Himaláje, kde přežívají i v nadmořských výškách kolem 2 000 m [28]. V tradiční medicíně, zejména čínské, byly rostliny *Hovenia dulcis* používány jako byliny pozitivně působící při intoxikaci alkoholem.

Právě díky tomuto využití se DHM stal předmětem zájmu vědců i v západním světě. Poruchy způsobené nadměrným příjmem alkoholu, z angl. „alcohol use disorders“ (AUD), jsou dnes celosvětovým problémem a jejich léčba je intenzivně zkoumanou oblastí. V nedávných studiích prováděných na potkanech bylo zjištěno, že DHM silně potlačuje

akutní intoxikaci ethanolem a částečně pomáhá při odbourávání ethanolu, jelikož posiluje aktivitu enzymů alkoholdehydrogenasy (ADH) a acetaldehyddehydrogenasy (ALDH). Na základě těchto výsledků je DHM navrhován jako vhodná kandidátní sloučenina pro léčbu AUD [28, 29].

1.2 Biotransformace xenobiotik

Xenobiotika (z řeckého *xenos* – cizí, *bios* – život) jsou látky, které se v lidském organismu přirozeně nevyskytují. Mohou to být látky přírodní i látky uměle vyrobené člověkem. Z uměle produkovaných látek jsou to především polutanty životního prostředí vznikající průmyslovou činností, hojně používané pesticidy a velkou skupinou řadící se do této kategorie jsou rovněž léčiva [30].

Lidský organismus je působení xenobiotik vystaven denně, jejich vliv na člověka je neustálý a nevyhnutelný. Vstup xenobiotik do organismu probíhá v několika fázích. Nejprve se dostávají do krevního řečiště, a to prostřednictvím trávicího ústrojí, respiračním systémem a pokožkou, a následně dochází k jejich vstupu do jednotlivých tělních buněk. Buňky, ve kterých dochází k přímé interakci xenobiotika s jednotlivými buněčnými kompartmenty, označujeme jako buňky cílové. Mezi mechanismy transportu cizorodých látek do cílových buněk patří volná difúze, zprostředkovaná difúze za pomoci přenašečů, aktivní transport a endocytóza. Způsob, jakým cizorodá látka do organismu vstupuje, záleží především na fyzikálně-chemických vlastnostech dané látky (polarita, rozpustnost, těkavost či reaktivita) [31, 32].

Zřídka jsou xenobiotika z organismu vylučována v nezměněné podobě. Procesy zodpovědné za jejich chemické přeměny označujeme jako procesy biotransformace. Hlavním cílem biotransformačních reakcí je usnadnění vyloučení xenobiotika nebo alespoň potlačení jeho účinku v organismu. Při biotransformaci dochází nejen ke změnám chemické povahy xenobiotik, ale i ke změnám v jejich biologickém účinku. Tohoto jevu se hojně využívá ve farmakologii, jelikož u řady léčiv jsou farmakologicky aktivní až metabolity podávaných látek. Naopak z hlediska toxikologie je tento princip velmi nebezpečný, protože může vést ke vzniku daleko škodlivějších sloučenin, které mohou mít i tumorogenní účinky [30, 33]. Zásadní roli v metabolismu xenobiotik hrají biotransformační enzymy. U eukaryotických organismů rozlišujeme dvě hlavní fáze biotransformace – derivatizační a konjugační.

1.2.1 I. fáze biotransformace

V první fázi biotransformace, která je často označovaná jako derivatizační, probíhají zejména oxidační, hydrolytické a redukční reakce. V průběhu těchto reakcí jsou modifikovány molekuly xenobiotik zavedením různých polárních skupin (-OH, -NH₂, -SH nebo -COOH). Pokud molekula xenobiotika polární skupinu již nese, dochází v této fázi k jejímu odkrytí. Výsledkem I. fáze biotransformace je zvýšení polaritity a hydrofilicity metabolizovaných sloučenin [30].

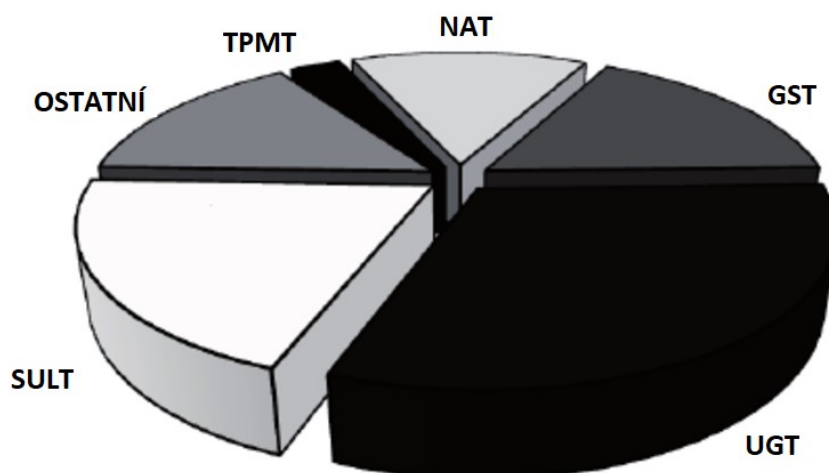
Enzymy participující v I. fázi biotransformace jsou především monooxygenasy (zejména cytochromy P450) a dioxygenasy, dále peroxidasy, fosfatasy a skupina hydrolas. Většina těchto enzymů se ve velkém množství vyskytuje v játrech, které jsou také hlavním orgánem biotransformace cizorodých látek.

Upravené molekuly jsou následně schopny ve druhé fázi biotransformace interagovat s endogenními látkami jako jsou aminy, kyseliny a alkoholy za vzniku látek dobře rozpustných ve vodě oproti původním molekulám xenobiotik [31, 34].

1.2.2 II. fáze biotransformace

Konjugací fáze obvykle navazuje na I. fázi biotransformace, ovšem jsou známy případy, kdy je derivatizační fáze vynechána. Můžeme zmínit například morfin, který je přeměňován přímo konjugací s kyselinou glukuronovou na morfin-3-glukuronid [30]. Obecně lze říci, že ve II. fázi dochází k syntetickým reakcím endogenních substrátů s metabolity I. fáze. Díky zvýšené rozpustnosti konjugátů ve vodě nedochází k jejich akumulaci v buňkách a jsou snadněji vylučovány z organismu [31].

Enzymy typickými pro tuto fázi jsou transferasy. Nejvýznamnějšími skupinami konjugáčnických enzymů jsou UDP-glukuronosyltransferasy (UGT), sulfotransferasy (SULT), *N*-acetyltransferasy (NAT), glutathion-*S*-transferasy (GST) a methyltransferasy [35]. Podíl těchto enzymů na metabolismu klinicky užívaných léčiv zobrazuje Obrázek č. 3, str. 16.



Obrázek č. 3: Podíl enzymů II. fáze biotransformace podílejících se na metabolismu klinicky užívaných léčiv. UGT – UDP-glukuronosyltransferasy; SULT – sulfotransferasy; NAT – *N*-acetyltransferasy; GST – glutathion-*S*-transferasy; TPMT – enzymy řadící se mezi methyltransferasy. Převzato z [35], upraveno.

Jednou z nejdůležitějších konjugačních reakcí je konjugace metabolizovaných xenobiotik s kyselinou glukuronovou. Klíčovým enzymem této reakce je UDP-glukuronosyltransferasa zastupující skupinu isoenzymů vyskytujících se především v membránách endoplazmatického retikula. Tato reakce má nemalý význam v metabolismu, více než 40 % používaných léčiv je odbouráváno touto cestou, což lze vidět na Obrázku č. 3, str. 16 [31, 35].

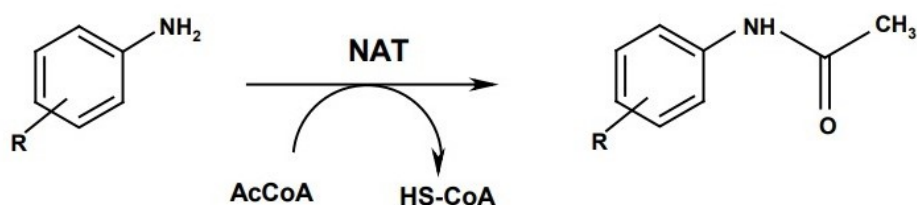
Druhou podstatnou skupinou enzymů II. fáze jsou sulfotransferasy. Jejich přirozeným kofaktorem je 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS). Sulfonační reakce jsou důležitou cestou pro metabolismus endogenních nízkomolekulárních látek, například steroidů, katecholaminů, retinolu nebo serotoninu [36]. Nicméně je známo i mnoho reaktivních metabolitů vznikajících sulfonací, které se kovalentně váží na DNA a mohou tak působit jako chemické karcinogeny a mutageny [37].

Dalšími významnými enzymy jsou glutathion-*S*-transferasy, jejichž nejdůležitější rolí je ochrana buněk před oxidačním stresem. Jsou to katalyzátory mnoha reakcí, jejichž podstatou je tvorba thioetherů konjugací endogenního tripeptidu glutathionu s elektrofilními xenobiotiky. Hlavní význam v organismu má membránově vázaná GST, která je

následována systémem cytochromu P450, a spolupráce těchto dvou enzymů umožňuje vysokou rychlost detoxikace xenobiotik v organismu [31, 38, 39].

1.3 *N*-acetyltransferasy

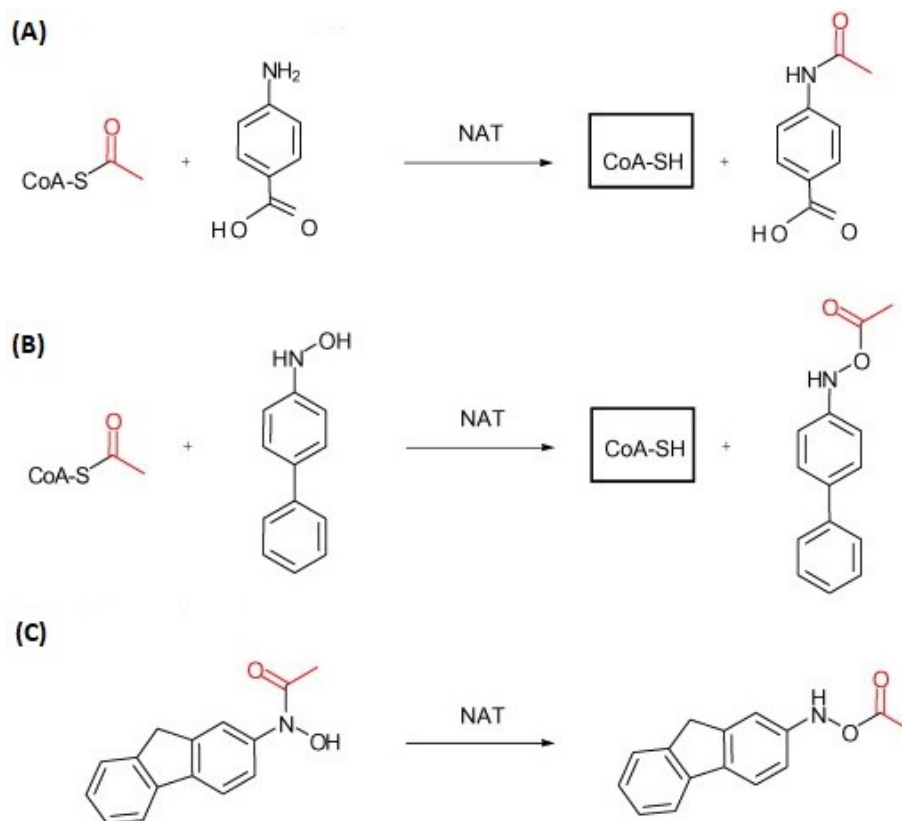
Skupinou enzymů zodpovědných ve II. fázi biotransformace za přeměnu aromatických aminů a hydrazinů jsou arylamin *N*-acetyltransferasy neboli také acetylkoenzym A-dependentní *N*-acetyltransferasy [35]. *N*-acetylace, reakce katalyzovaná těmito enzymy, je prvním krokem metabolismu arylaminů (Obrázek č. 4, str. 17) [40].



Obrázek č. 4: Obecné schéma reakce katalyzované NAT. Přenos acetylu z donoru (AcCoA) na molekulu akceptoru. Převzato z [35].

Předpokládá se, že enzymová kinetika těchto reakcí spočívá v tzv. „ping-pong bi-bi“ mechanismu, kdy po navázání prvního substrátu dochází k modifikaci enzymu, který je poté schopen reagovat s druhým substrátem za vzniku finálního produktu. Tento mechanismus má tedy dva kroky. V prvním kroku je enzym acetylován acetylovou skupinou donoru reakce, kterým je nejčastěji acetylkoenzym A (AcCoA), za tvorby stabilního intermediátu. Ve druhém kroku následuje deacetylace enzymu a acetyl je přenesen na akceptor. Tento mechanismus byl prokázán izolací meziproductu acetyl-NAT z lidských, králíčích a holubích jater za použití radiochemicky značeného (^3H)AcCoA [41].

Obecně rozlišujeme tři typy reakcí katalyzovaných NAT: *N*-acetylaci, *O*-acetylaci a *N,O*-acetylový intramolekulární přenos. NAT jsou důležitými enzymy při metabolismu léčiv a odbourávání karcinogenních látek. V některých případech ovšem může namísto k eliminaci xenobiotika docházet k jeho aktivaci za vzniku *N*-acetoxysterů, které se značně podílejí na procesu karcinogeneze – viz Obrázek č. 5, reakce (B) a (C), str. 18 [42].



Obrázek č. 5: Reakce katalyzované NAT. A – *N*-acetylace, přenos acetylu z donoru (AcCoA) na dusíkový atom aminové skupiny akceptoru; B – *O*-acetylace, přenos acetylu z donoru (AcCoA) na kyslíkový atom hydroxylové skupiny akceptoru; C – *N,O*-acetylace, přenos acetylu v rámci jedné molekuly. Převzato z [42], upraveno.

NAT byly izolovány jak z prokaryotních, tak z eukaryotních organismů. Ze savčích druhů, u kterých byla aktivita NAT stanovena, lze zmínit králíky, potkany, myši či kočky. V lidském organismu se vyskytují dvě známé isoformy tohoto enzymu – *N*-acetyltransferasa 1 (NAT1) a *N*-acetyltransferasa 2 (NAT2). Jejich genové lokusy byly lokalizovány na krátkém raménku chromozomu 8. Přestože jsou nukleotidové sekvence genů *NAT1* a *NAT2* z 85 % homologní, enzymy se liší nejen svou distribucí v organismu, ale také substrátovou specifitou [35, 43].

Bodové mutace genů těchto isoenzymů jsou příčinou rozdílů ve sbalování proteinů do terciární struktury, změně stability a rovněž rozdílů v katalytické účinnosti. Výsledkem je výskyt dvou fenotypů – tzv. rychlé acetylátory a pomalé acetylátory. Právě katalytická účinnost NAT je velmi studovanou oblastí, jelikož se ukazuje, že typ fenotypu úzce souvisí se schopností metabolizovat léčiva, taktéž s predispozicemi ke vzniku nádorových onemocnění a určuje citlivost jedince na toxicitu arylaminů [44]. Další genetické studie

dokazují, že výskyt NAT1 a NAT2 v populaci se značně liší i v závislosti na etnickém původu [42].

1.3.1 Lidská *N*-acetyltransferasa 1 a 2

Substráty typickými pro lidský isoenzym NAT1 jsou kyselina *p*-aminobenzoová (PABA), kyselina *p*-aminosalicylová a kyselina *p*-aminobenzylglutamová [45]. Jelikož v populaci nebyly pozorovány rozdíly v *N*-acetylaci těchto substrátů, byly považovány za monomorfní. Stejně tak i NAT1 byla označována jako monomorfní enzym [44]. Dnes již víme, že se v populaci vyskytuje více forem tohoto enzymu, mezi nejčastěji vyskytující se alely patří *NATI*3*, *NATI*4* a *NATI*10* [46].

Isoenzym NAT2 se nachází hlavně v játrech a střevech, a především tato forma je zodpovědná za metabolismus léčiv. Pro lidskou NAT2 je nejběžnějším substrátem sulfamethazin (SMZ), dále pak isoniazid, hydralazin a sulfonamidy [35]. Isoniazid se používá jako lék proti tuberkulóze, a právě díky studiu pacientů léčených na tuto chorobu, byly poprvé zaznamenány rozdíly v rychlosti acetylace a později tak došlo k objevu různých alel *NAT2* [47]. Ukazuje se, že alely *NAT2* vyskytující se u pomalých acetylátorů jsou v přímé spojitosti s několika onemocněními. Bývají spojovány s výskytem rakoviny močového měchýře u kuřáků a jsou brány jako faktor přispívající k vyvolání autoimunitního onemocnění *lupus erythematoses*. V bělošské populaci je téměř 50% zastoupení těchto pomalých acetylátorů, což vede ke zvýšené náchylnosti k uvedeným chorobám [44].

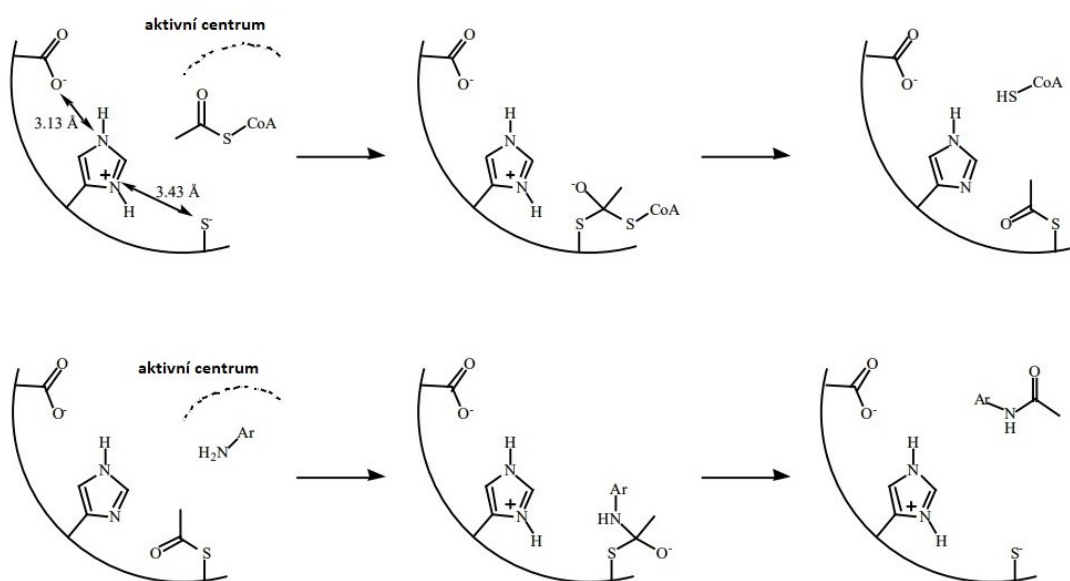
1.3.2 Inhibitory NAT

Aktivita enzymů II. fáze biotransformace je velmi často ovlivňována různými druhy sloučenin. Některé látky mohou mít stimulační vliv a zvyšují jejich aktivitu, jiné látky naopak působí jako inhibitory [48]. Z hlediska mechanismu dělíme inhibice na ireversibilní a reversibilní, u kterých dále rozlišujeme kompetitivní, akompetitivní, nekompetitivní a smíšené inhibice. Mezi ireversibilní inhibitory, které se kovalentně vážou na enzym a trvale ho inaktivují, řadíme například ionty těžkých kovů nebo organofosfáty. Reversibilní inhibitory tvoří s enzymem volnější komplexy, které mohou za určitých podmínek disociovat a katalytická aktivita enzymu může být obnovena. Při kompetitivní inhibici soupeří inhibitor se substrátem o vazebné místo na molekule enzymu. Molekuly inhibitoru a substrátu si jsou v tomto případě podobné. Akompetitivní inhibice podobnost inhibitoru a substrátu nevyžaduje. Inhibitor se totiž váže až na komplex enzym-substrát, způsobí

strukturní změnu v aktivním místě enzymu a sníží tak jeho katalytickou funkci. Nejedná se tedy o ovlivnění vazby substrátu na enzym. Tento typ inhibice je významný především u vícesubstrátových reakcí. U nekompetitivní a smíšené inhibice se inhibitor váže na jiné místo na enzymu než substrát. Vazba inhibitoru ovlivňuje jak katalytickou aktivitu enzymu, tak jeho interakci se substrátem [49].

Inhibice aktivity NAT byla popsána i v případě některých fenolických sloučenin. Pro NAT1 je to konkrétně kyselina kávová řadící se mezi hydroxykyseliny, kyselina gallová vyskytující se vázaná v taninech nebo epigalokatechin galát, což je látka ze skupiny katechinů, která je běžně obsažena v zeleném čaji. NAT2 specificky inhibují kumarinový derivát skopoletin či kurkumin, který je velmi často používán jako barvivo [50]. Studie prováděné na tumorech tlustého střeva pak poukazují na inhibici NAT v nádorových buňkách vlivem diallyl sulfidu a diallyl disulfidu, které se přirozeně vyskytují v cibuli a česneku [35].

Aktivní centrum NAT je tvořeno katalytickou triádou tří aminokyselin – cysteinem, histidinem a kyselinou asparagovou (Obrázek č. 6, str. 20) [41].



Obrázek č. 6: Aktivní centrum NAT s katalytickou triádou. Schéma zobrazuje přenos acetylové skupiny z AcCoA (donor) na aminovou skupinu molekuly akceptoru. Převzato z [41], upraveno.

Bylo dokázáno, že záměna kyseliny asparagové za alanin nebo asparagin vede k úplné ztrátě aktivity těchto enzymů. Z toho vyplývá, že funkčnost NAT závisí na

přítomnosti thiolát-imidazolového iontového páru v aktivním centru [51]. V této souvislosti byla studována například inaktivace těchto enzymů působením peroxynitritu, který se váže do aktivního centra, kde oxidativně modifikuje cystein [52]. U křeččích NAT bylo zkoumáno i působení bromacetanilidu, který se ireverzibilně váže rovněž na cystein v aktivním centru, čímž enzym inaktivuje. Zde bylo zjištěno, že preinkubace s AcCoA výrazně potlačuje interakci enzymu NAT2 s bromacetanilidem a napomáhá tak k zachování katalytické funkce [53].

Výzkum reakčních mechanismů NAT a sloučenin, které by mohly být potencionálními modulátory jejich aktivity, je důležitý zejména vzhledem ke spojitosti jednotlivých alel *NAT* s řadou onemocnění. Polymorfismus NAT může mít v některých případech za následek například nežádoucí účinky léků, a dokonce navodit vznik nádorového bujení. Uvádí se například, že fenotyp rychlého acetylátora může být spojen s myelotoxicitou vyvolanou amonafidem a fenotyp pomalého acetylátora je naopak spojován s periferní neuropatií způsobenou užíváním isoniazidu [54, 55].

Právě vzhledem k těmto zdravotním rizikům jsou testovány vybrané flavonoidní sloučeniny, které by mohly fungovat jako inhibitory NAT. Studie interakcí NAT se sloučeninami obsaženými v potravních doplňcích ukazují, že některé flavonoidy jako inhibitory opravdu fungují. Předpokládá se, že vhodné dávky některých flavonoidů by mohly působit chemopreventivně tak, že inhibicí biotransformačních enzymů zamezí tvorbě karcinogenních metabolitů vznikajících katalytickou aktivitou NAT. V případě sloučenin s antioxidačními vlastnostmi by mohlo docházet i k ovlivňování intracelulárního redoxního stavu buňky, a tím dokonce až k apoptóze.

Z prostudovaných flavonoidů lze zmínit quercetin, který vykazuje silný inhibiční efekt na aktivitu NAT. Výsledky ukazují na nekompetitivní způsob inhibice, kdy není ovlivněno aktivní centrum NAT [54]. Působení MYR a DHM na NAT1 i NAT2 bylo také již experimentálně zkoumáno a tyto sloučeniny rovněž způsobovaly inhibici obou enzymů. U NAT2 byl inhibiční efekt obou flavonoidů téměř totožný, ovšem pro NAT1 byla koncentrace potřebná k dosažení 50% maxima inhibičního efektu u MYR přibližně třikrát nižší než u DHM. Otázkou tedy zůstává, jakým mechanismem inhibice probíhá [56].

2 Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo ověřit schopnost flavonoidů myricetinu a dihydromyricetinu inhibovat aktivitu *N*-acetyltransferas a objasnit mechanismus této inhibice. Inhibiční efekt vybraných flavonoidů byl studován na lidských rekombinantních enzymech NAT1 a NAT2. Pro dosažení tohoto cíle bylo nutné provést následující dílčí úkoly:

1. Proměřit IC_{50} myricetinu a dihydromyricetinu pro NAT1 a NAT2.
2. Určit typ inhibice NAT1 a NAT2 působené myricetinem a dihydromyricetinem.

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

APIChem (Čína)

dihydromyricetin

Fluka (Švýcarsko)

sulfamethazin (SMZ)

Gentest – BD Biosciences (USA)

lidské cytosolární *N*-acetyltransferasy (NAT1*4; NAT2*4)

Lach-Ner (Česká republika)

methanol

Sigma-Aldrich (USA)

5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB), acetyl-koenzym A, *p*-aminobenzoová kyselina (PABA), TRIZMA hydrochlorid

Thermo Fischer Scientific (USA)

guanidin hydrochlorid

Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Japonsko)

myricetin

3.2 Použité přístroje

Analytické váhy

Discovery, Ohaus Corp. (USA)

Automatické mikropipety

Eppendorf (Německo)

Inkubátor

Thermomixer Compact, Eppendorf (Německo)

Laboratorní třepačka

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

Magnetická míchačka

KMO 2 basic, IKA-Werke GmbH & Co. KG (Německo)

pH metr

HI 2211, HANNA Instruments (USA)

Předvážky

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

Sonikátor

Elmasonic E 30H, ELMA (Německo)

Spektrofotometr

Sunrise Absorbance Reader, TECAN (Švýcarsko)

3.3 Metody

3.3.1 Měření katalytické aktivity NAT

Reakční pufr	2,0 mM Tris/HCl pH 8,0 (upraveno: 2 M NaOH)
Substráty	2,0 mM acetylkoenzym A (AcCoA) v reakčním pufru 10 mM <i>p</i> -aminobenzoová kyselina (PABA) v H ₂ O 10 mM sulfamethazin (SMZ) v MetOH
Zastavovací roztok	6,4 M guanidin hydrochlorid (Gua-HCl) 0,1 M Tris/HCl pH 7,3 (upraveno: 2 M NaOH)
Detekční činidlo	10 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB) v zastavovacím roztoku

Pro stanovení acetylační aktivity NAT byly používány rekombinantní lidské enzymy NAT1 a NAT2. Použitým substrátem pro NAT1 byla PABA a pro NAT2 jím byl SMZ [35]. Působením NAT dochází k acylaci uvedených substrátů acetylovou skupinou přenesenou z AcCoA. V roztoku tak vzniká koenzym A (CoA) s volnou thiolovou (-SH) skupinou. Ten

lze spektrofotometricky detekovat pomocí Ellmanova činidla (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina, DTNB). Toto činidlo reaguje s volnou thiolovou skupinou za vzniku kyseliny 5'-thionitrobenzoové (TNB), která má absorpční maximum při 412 nm [57].

Pro stanovení aktivity NAT1 bylo na jednu reakční směs smícháno 380 μ l 2,0 mM AcCoA, 190 μ l rekombinantního proteinu NAT1 o koncentraci 0,015 mg/ml, 1282,5 μ l reakčního pufru a 95 μ l methanolu. V případě NAT2 to bylo 380 μ l 2,0 mM AcCoA, 190 μ l rekombinantního proteinu NAT2 o koncentraci 0,030 mg/ml, 1282,5 μ l reakčního pufru a 95 μ l methanolu. Takto připravené směsi byly 5 minut preinkubovány v inkubátoru (Thermomixer compact, Eppendorf) při 37 °C (450 otáček za minutu – RPM) v uzavřených mikrozkušavkách. Následně byla reakce iniciována přidáním druhého substrátu – pro NAT1 45 μ l 10 mM PABA, pro NAT2 45 μ l 10 mM SMZ. Vzorky byly inkubovány 25 minut při 37 °C, 450 RPM opět v uzavřených mikrozkušavkách v inkubátoru.

Reakce byla ukončena přenesením 105 μ l reakční směsi do jamky v 96-jamkové mikrotitrační destičce, ve které již bylo nanášeno 25 μ l zastavovacího roztoku s DTNB. Množství CoA bylo stanoveno spektrofotometricky při 412 nm na přístroji Sunrise Absorbance Reader. Pro ověření linearity reakce byly odebírány 3 vzorky z reakční směsi obsahující NAT1 o objemu 105 μ l a 3 vzorky z reakční směsi obsahující NAT2 o objemu 105 μ l každých 5 minut.

Absolutní hodnoty absorbance, které odpovídaly množství vytvořeného produktu CoA, byly určeny jako rozdíl absorbance vzorku po 5 – 25 minutách inkubace a absorbance vzorku v čase 0, tedy ihned po přidání druhého substrátu do reakční směsi.

3.3.2 Inhibice aktivity NAT působením MYR a DHM

Princip této metody byl totožný jako postup popsáný v předchozí kapitole (3.3.1). Stejně byly i použité reagensy. Inhibiční aktivita byla stanovována pro flavonoidy MYR a DHM. Využity byly rekombinantní lidské enzymy NAT1 a NAT2 se substráty PABA, respektive SMZ. V reakční směsi bylo vždy 5 μ l methanolového roztoku flavonoidu nebo samotného rozpouštědla.

Pro NAT1 byly výsledné použité koncentrace MYR a DHM 12,5 – 100 μ M. Pro NAT2 byly výsledné koncentrace MYR a DHM rovněž 12,5 – 100 μ M.

3.3.3 Určení typu inhibice aktivity NAT působením MYR a DHM

Mechanismus inhibice enzymů NAT1 a NAT2 byl studován technikou popsanou v kapitole 3.3.1. Do reakční směsi obsahující 20 μ l 2,0 mM AcCoA, 10 μ l rekombinantního proteinu NAT1 o koncentraci 0,015 mg/ml, respektive NAT2 o koncentraci 0,030 mg/ml a 67,5 μ l reakčního pufru bylo přidáno 5 μ l methanolu s rozpuštěným flavonoidem. Koncentrace flavonoidů byly zvoleny na základě předchozích inhibičních experimentů, a to v rozsahu 12,5 – 50 μ M pro MYR i DHM. Kontrolní vzorek obsahoval 5 μ l čistého methanolu. Tyto připravené směsi byly 5 minut preinkubovány v inkubátoru (Thermomixer compact, Eppendorf) při 37 °C (450 RPM) v uzavřených mikrokumávkách. Následně byla reakce iniciována přidáním 2,5 μ l PABA, respektive 2,5 μ l SMZ (druhý substrát) v rozsahu koncentrací 62,5 – 500 μ M. Vzorky byly inkubovány 20 minut při 37 °C, 450 RPM opět v uzavřených mikrokumávkách v inkubátoru.

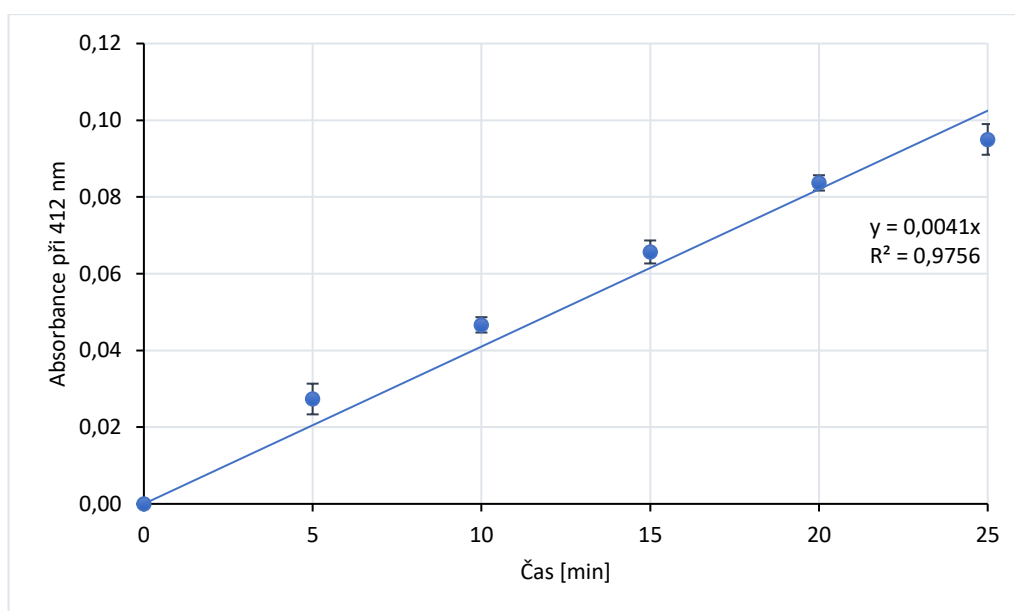
Reakce byla zastavena přenesením 105 μ l reakčních směsí do jamek v 96-jamkové mikrotitrační destičce, které obsahovaly 25 μ l zastavovacího roztoku s DTNB. Vzorky byly opět odebírány ve 3 opakováních. Uvedená množství jednotlivých složek reakční směsi odpovídají objemu jedné jamky v mikrotitrační destičce.

Celkem bylo připraveno 16 kombinací koncentrací MYR, respektive DHM a PABA, respektive SMZ.

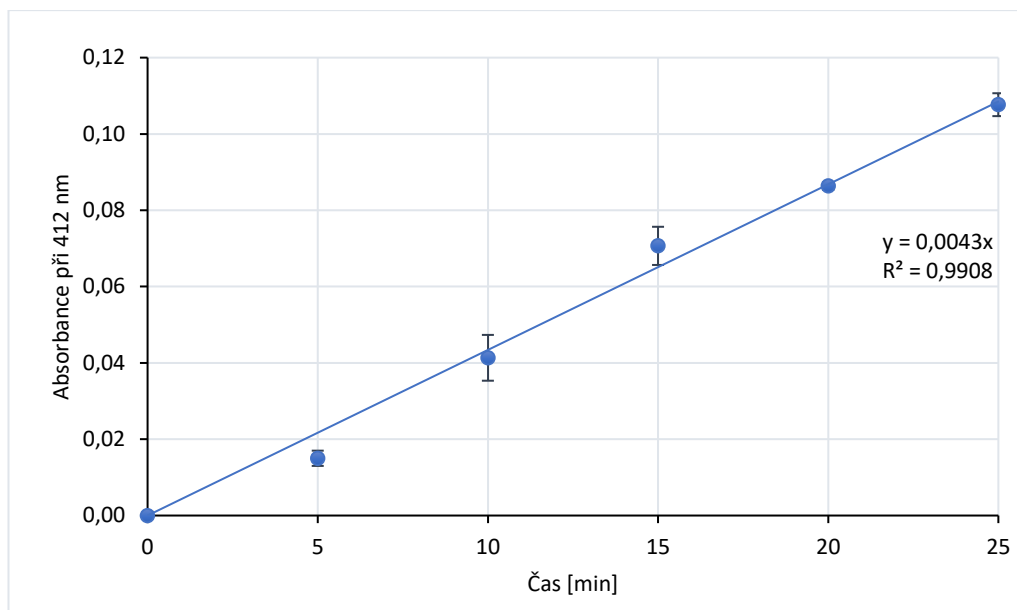
4 Výsledky

4.1.1 Ověření linearity reakcí katalyzovaných NAT

Aktivita NAT byla stanovována nepřímo na základě měření množství vznikajícího produktu koenzymu A z acetylkoenzymu A metodou popsanou v kapitole 3.3.1. Rozdílné koncentrace rekombinantních enzymů byly použity vzhledem k rozdílné specifické aktivitě enzymů deklarované výrobcem. Množství vznikajícího CoA tak bylo u obou reakčních směsí přibližně srovnatelné. Druhým substrátem byla *p*-aminobenzoová kyselina pro NAT1 a sulfamethazin pro NAT2. Linearita průběhu reakcí byla ověřena pro oba rekombinantní enzymy. Průběh reakce při daném složení reakční směsi byl pro NAT1 i NAT2 lineární zhruba 20 – 25 minut od iniciace reakce (Obrázek č. 7 a 8, str. 27, 28).



Obrázek č. 7: *Produkce CoA rekombinantní NAT1*. Reakční směs obsahovala 381 μM AcCoA, 238 μM PABA, rekombinantní NAT1 (0,015 mg/ml), reakční pufr, celkový objem 105 μl . Detekčním činidlem bylo 25 μl 10 mM DTNB v zastavovacím roztoku. Absorbance byla měřena při 412 nm. Měření bylo prováděno v triplikátech.

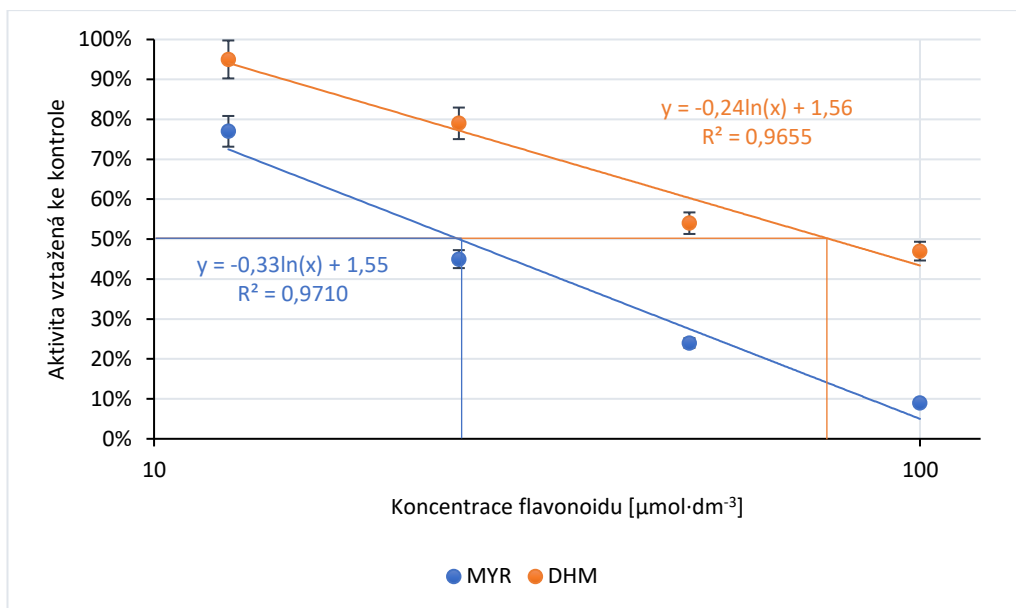


Obrázek č. 8: Produkce CoA rekombinantní NAT2. Reakční směs obsahovala 381 μM AcCoA, 238 μM SMZ, rekombinantní NAT2 (0,030 mg/ml), reakční pufr, celkový objem 105 μl . Detekčním činidlem bylo 25 μl 10 mM DTNB v zastavovacím roztoku. Absorbance byla měřena při 412 nm. Měření bylo prováděno v triplicátech.

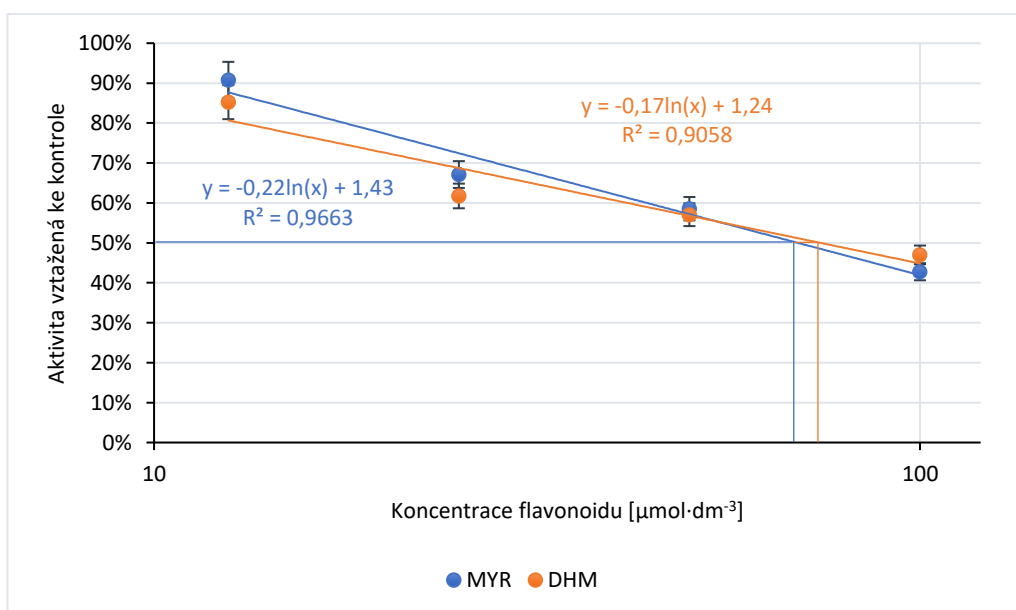
4.1.2 Inhibice aktivity NAT působením MYR a DHM

Optimalizované složení reakční směsi (vykazující lineární průběh reakce v čase, viz kapitola 3.3.1) bylo použito pro inhibiční reakce. Navíc bylo do reakční směsi přidáno 5 μl methanolu, který obsahoval rozpuštěný flavonoid. Jako kontrola 100% aktivity byla použita reakční směs s přídatkem 5 μl čistého methanolu (nulová koncentrace flavonoidu). Naměřené hodnoty absorbance vzorků obsahující inhibitor byly porovnány s hodnotou absorbance kontrolního vzorku. Výsledné procentuální hodnoty byly vyneseny do semilogaritmických grafů a logaritmickou regresí byly stanoveny hodnoty IC_{50} pro oba flavonoidy. Tato hodnota odráží citlivost molekuly enzymu k danému inhibitoru [58].

Z naměřených hodnot je zřejmé, že MYR i DHM vykazují inhibiční aktivitu vůči NAT1 i NAT2. U NAT1 byly určeny hodnoty IC_{50} přibližně jako 33,1 μM pro MYR a pro 82,8 μM DHM, v případě NAT2 jsou hodnoty IC_{50} pro MYR 68,5 μM a 77,7 μM pro DHM (Obrázek č. 9 a 10, str. 29).



Obrázek č. 9: Inhibice aktivity NAT1 myricetinem a dihydromyricetinem. Do reakční směsi bylo přidáno 5 μl methanolového roztoku flavonoidu v rozsahu koncentrací 12,5 – 100 μM . Inhibice aktivity NAT1 je vyjádřena v procentech kontrolní aktivity. Množství produktu CoA bylo stanoveno spektrofotometricky při 412 nm za použití 25 μl detekčního činidla.

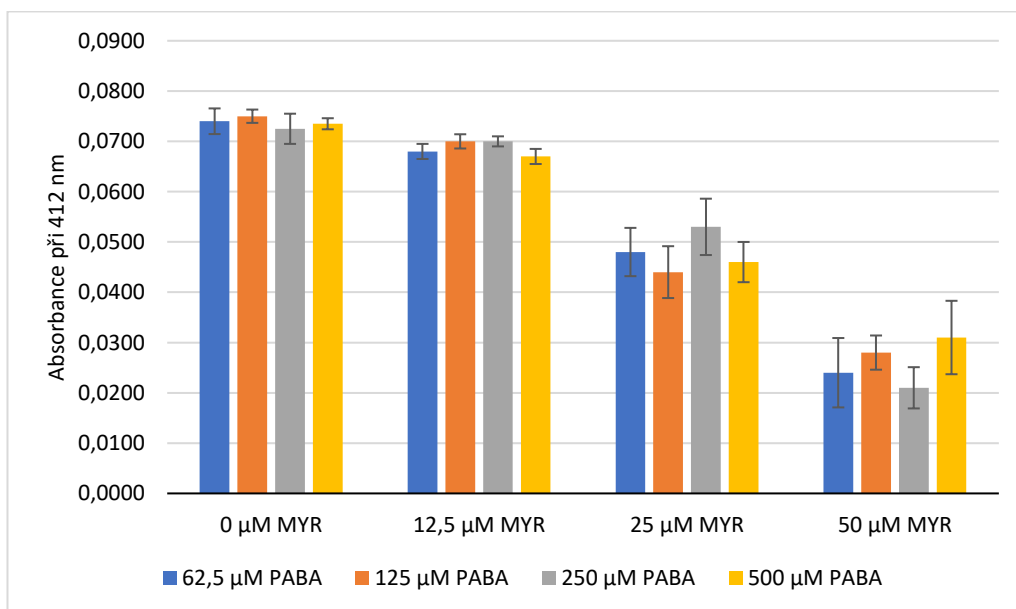


Obrázek č. 10: Inhibice aktivity NAT2 myricetinem a dihydromyricetinem. Do reakční směsi bylo přidáno 5 μl methanolového roztoku flavonoidu v rozsahu koncentrací 12,5 – 100 μM . Inhibice aktivity NAT2 je vyjádřena v procentech kontrolní aktivity. Množství produktu CoA bylo stanoveno spektrofotometricky při 412 nm za použití 25 μl detekčního činidla.

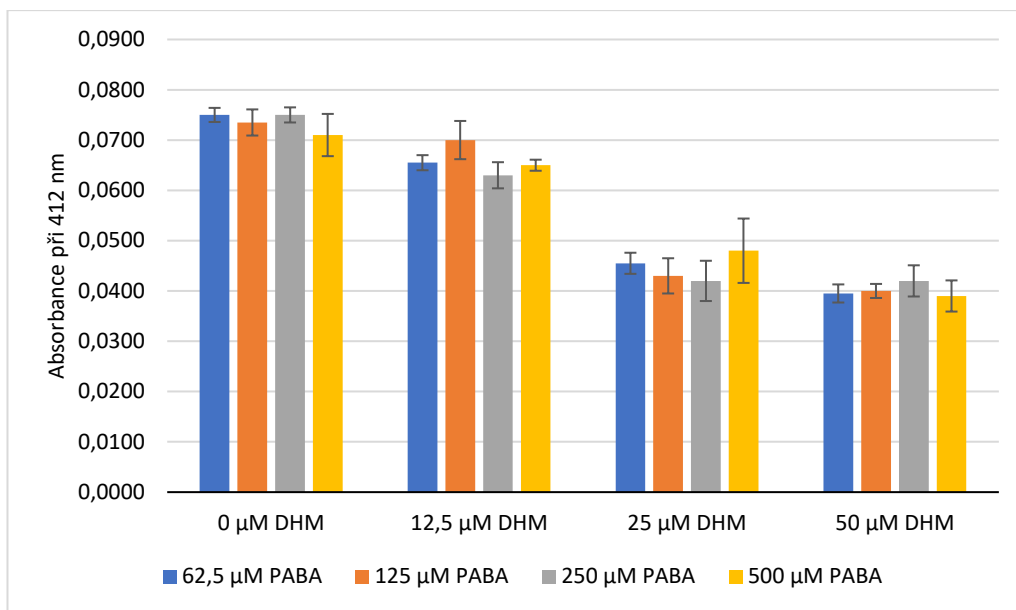
4.1.3 Mechanismus inhibice aktivity NAT působením MYR a DHM

Mechanismus inhibice působením myricetinu a dihydromyricetinu byl studován jak pro isoformu NAT1, tak i pro NAT2. Bylo použito 16 kombinací koncentrací substrátu a inhibitoru pro každý enzym. Po 20 minutách inkubace byla měřena absorbance vzorků lišících se právě koncentrací substrátu a inhibitoru. Množství vytvořeného CoA odpovídá absolutním hodnotám naměřené absorbance. Získané hodnoty byly vyneseny do sloupcových grafů (Obrázek č. 11 – 14, str. 30 – 32), ze kterých je dobře patrné, že v případě NAT1 zvýšení koncentrace inhibitoru vede k vyššímu inhibičnímu efektu a změna koncentrace substrátu PABA na tento efekt nemá téměř žádný vliv. U NAT2 rovněž dochází s rostoucí koncentrací inhibitoru ke zvýšení inhibice a navyšování koncentrace substrátu SMZ v tomto případě efekt umocňuje.

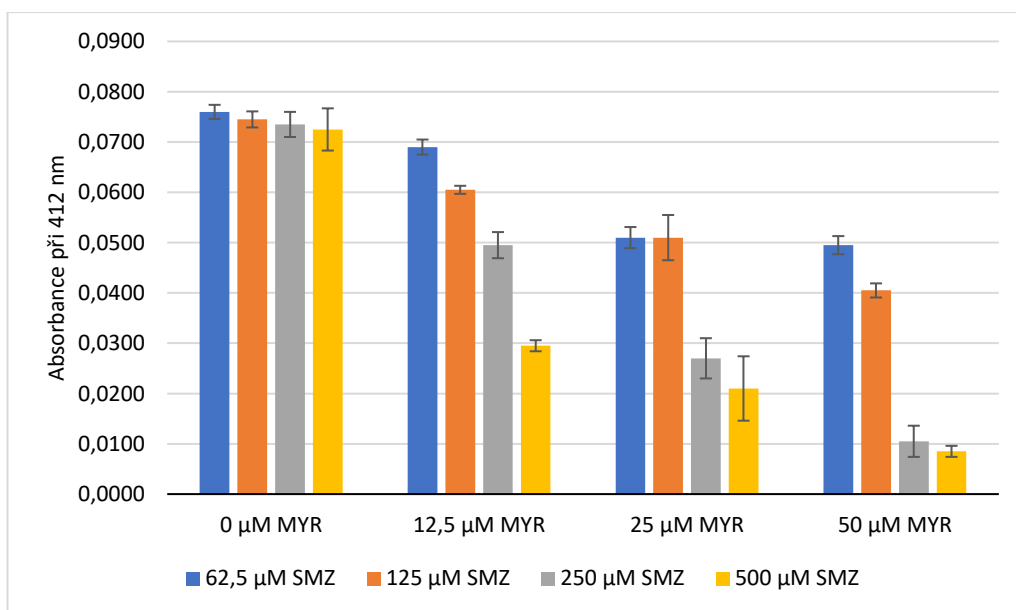
Vynesením hodnot absorbance do dvojnásobně reciprokého výnosu a proložením vnesených bodů byly pro NAT1 získány vzájemně rovnoběžné přímky, jejichž průběh byl rovnoběžný s osou x (Obrázek č. 15, str. 32). Pro NAT2 byl průběh přímek obdobný, s výjimkou přímky pro nejvyšší koncentraci flavonoidu (50 μM), která již s osou x ani s přímkami ostatních koncentrací rovnoběžná nebyla (Obrázek č. 16, str. 33).



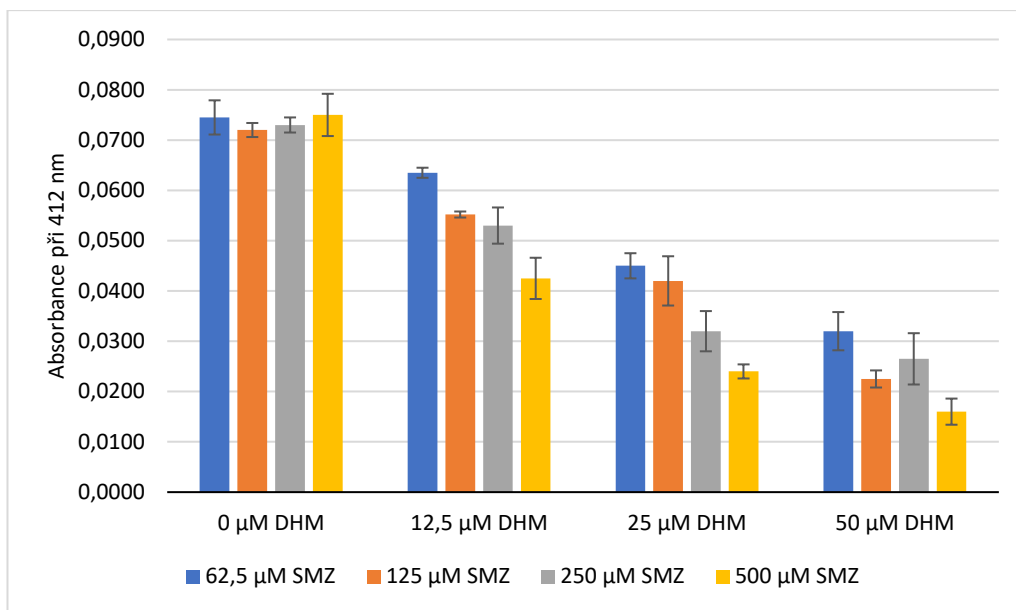
Obrázek č. 11: Inhibice NAT1 myricetinem při různých koncentracích substrátu a inhibitoru. Substrát PABA byl použit v rozmezí koncentrací 62,5 – 500 μM ; koncentrace MYR byla 12,5 – 50 μM .



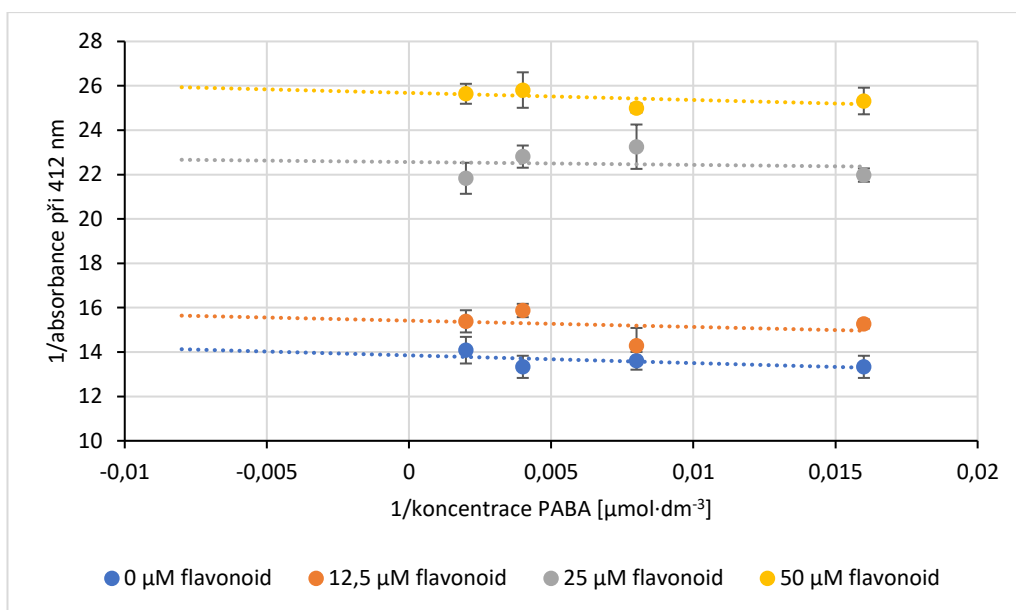
Obrázek č. 12: Inhibice NAT1 dihydromyricetinem při různých koncentracích substrátu a inhibitoru. Substrát PABA byl použit v rozmezí koncentrací 62,5 – 500 μM; koncentrace DHM byla 12,5 – 50 μM.



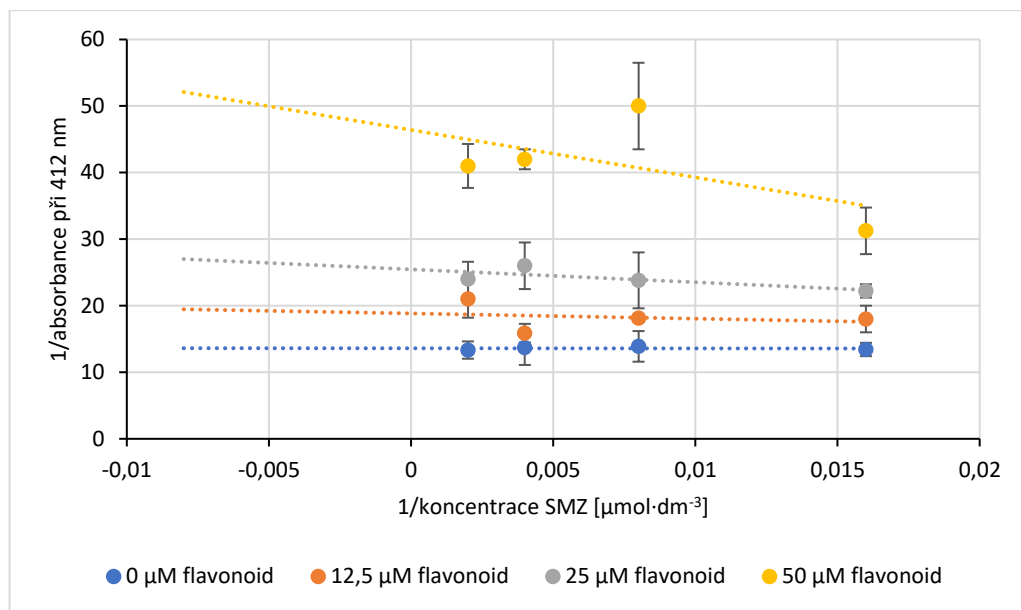
Obrázek č. 13: Inhibice NAT2 myricetinem při různých koncentracích substrátu a inhibitoru. Substrát SMZ byl použit v rozmezí koncentrací 62,5 – 500 μM; koncentrace MYR byla 12,5 – 50 μM.



Obrázek č. 14: Inhibice NAT2 dihydromyricetinem při různých koncentracích substrátu a inhibitoru. Substrát SMZ byl použit v rozmezí koncentrací 62,5 – 500 μM; koncentrace DHM byla 12,5 – 50 μM.



Obrázek č. 15: Reprezentativní dvojnásobně reciproký výnos inhibice NAT1 flavonoidy. Substrát PABA byl použit v rozmezí koncentrací 62,5 – 500 μM; koncentrace flavonoidu byla 12,5 – 50 μM.



Obrázek č. 16: Reprezentativní dvojnásobně reciproký výnos inhibice NAT2 flavonoidy. Substrát SMZ byl použit v rozmezí koncentrací 62,5 – 500 μM ; koncentrace flavonoidu byla 12,5 – 50 μM .

5 Diskuze

N-acetyltransferasy jsou klíčovými enzymy metabolismu běžně klinicky užívaných léčiv. Při biotransformaci zodpovídají především za přeměnu aromatických aminů a hydrazinů na acetylované deriváty [35]. Vzdávající obliba potravních doplňků zapříčinila zvýšený příjem flavonoidů, a proto se flavonoidy staly velmi intenzivně zkoumanými sloučeninami, zejména z pohledu jejich interakcí s xenobiotiky.

V této souvislosti byl proto studován vliv myricetinu a dihydromyricetinu na aktivitu *N*-acetyltransferas. Záměrem experimentů je přiblížit se situaci v lidském organismu, z tohoto důvodu byly používány lidské rekombinantní NAT. Konkrétně byla používána isoforma NAT1*4, která je považována za nejvíce rozšířený fenotyp NAT1. Pro studium NAT2 byla vybrána isoforma NAT2*4, která je rovněž označována jako běžný typ. NAT1*4 je charakterizována normální rychlostí acetylace. Nosič této isoformy je označován jako středně rychlý acetylátor, zatímco nosič NAT2*4 je rychlým acetylátorem [59].

Myricetin a dihydromyricetin jsou fenolické sloučeniny lišící se pouze jedinou dvojnou vazbou. Účinky těchto sloučenin v lidském těle nejsou dosud zcela objasněny, ale vzhledem k jejich možnému využití v lékařství jsou intenzivně zkoumány. Nejprve byly experimentálně stanoveny hodnoty IC_{50} pro oba enzymy a oba flavonoidy. Tyto hodnoty byly v souladu s předchozími studii [56]. U NAT1 byly určeny hodnoty IC_{50} přibližně jako 33,1 μ M pro MYR a pro 82,8 μ M DHM, v případě NAT2 jsou hodnoty IC_{50} pro MYR 68,5 μ M a 77,7 μ M pro DHM. Právě rozdíl v hodnotách IC_{50} , kdy je hodnota IC_{50} u NAT1 pro MYR přibližně 2,5x nižší než pro DHM, by mohl mít významný vliv pro terapeutické použití těchto flavonoidů.

Při určování typu inhibice působením MYR a DHM na NAT je nutné uvažovat bi-bi ping-pongový mechanismus reakce [41]. Inhibitorem (flavonoidem) může být ovlivňována jak vazba prvního substrátu (v tomto případě AcCoA) do aktivního centra NAT, tak i následná druhá reakce, kdy je acetylová skupina přenášena na druhý substrát (PABA, respektive SMZ). Provedené experimenty vycházely z předpokladu, že vazba AcCoA na thiolovou skupinu cysteinu v aktivním centru není zasažena působením flavonoidů. Tímto způsobem se chovaly i další flavonoidní sloučeniny strukturně podobné MYR a DHM. Například quercetin byl prokázán jako silný inhibitor NAT, který se váže mimo katalytickou

triádu enzymu, a proto byla tato inhibice označena jako nekompetitivní [50]. Ovšem tyto experimenty neuvažovaly dvousubstrátový mechanismus reakce NAT.

Provedené experimenty byly zaměřeny na ovlivnění druhého kroku této dvousubstrátové reakce flavonoidy. Jak je patrné z Obrázků č. 11 – 14, str. 30 – 32, zvýšení koncentrace inhibitoru (MYR, respektive DHM) vedlo ke snížení rychlosti reakce. V případě NAT1 zvýšení koncentrace druhého substrátu (PABA) nemělo na reakci ve smyslu potlačení inhibice žádný vliv. U NAT2 byl dokonce s rostoucí koncentrací druhého substrátu (SMZ) inhibiční efekt ještě silnější.

Rovnoběžné přímky získané dvojnásobně reciprokým výnosem hodnot absorbance (s výjimkou 50 μ M koncentrace flavonoidu u NAT2) poukazují na očekávaný ping-pong bi-bi mechanismus reakce [60]. Rovnoběžnost přímek by dále mohla naznačovat akompetitivní typ inhibice. To je ovšem v rozporu s tím, že dané přímky jsou rovnoběžné i s osou x, jelikož rozsah inhibice na koncentraci substrátu nezávisí. Poloha přímek je patrná na Obrázku č. 15 a 16, str. 32 a 33. Ze získaných výsledků je zřejmé, že k ovlivnění aktivity NAT musí docházet v jiném reakčním kroku než při reakci s druhým substrátem (PABA, respektive SMZ). K inhibici enzymu bude tedy velmi pravděpodobně docházet již v prvním kroku dvousubstrátové reakce – při navázání AcCoA do aktivního centra enzymu. Vzhledem k již zmíněným studiím jiných flavonoidů se bude v tomto prvním kroku zřejmě jednat o inhibici nekompetitivní, ovšem tyto hypotézy je nutné experimentálně potvrdit.

6 Závěr

Předkládaná bakalářská práce se věnovala studiu vlivu flavonoidů myricetinu a dihydromyricetinu na *N*-acetyltransferasy. Experimentálně byl zkoumán inhibiční efekt těchto flavonoidů na aktivitu lidských isoenzymů NAT1 a NAT2 a na studium mechanismu těchto inhibic. Provedené experimenty poskytly tyto výsledky:

- Byly stanoveny hodnoty IC_{50} pro myricetin: $IC_{50} = 33,1 \mu\text{M}$ (pro NAT1) a $IC_{50} = 68,5 \mu\text{M}$ (pro NAT2).
- Byly stanoveny hodnoty IC_{50} pro dihydromyricetin: $IC_{50} = 82,8 \mu\text{M}$ (pro NAT1) a $IC_{50} = 77,7 \mu\text{M}$ (pro NAT2).
- Zvýšení koncentrace substrátu PABA pro NAT1 nevede k potlačení inhibičního efektu MYR ani DHM.
- Zvýšení koncentrace substrátu SMZ pro NAT2 vede k posílení inhibičního efektu MYR i DHM.
- Inhibitory MYR a DHM zřejmě ovlivňují první krok ping-pongového mechanismu reakce, kterým je interakce enzymu s AcCoA.

Seznam použité literatury

- [1] I. Raskin. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol.* 20(12), 522–531, 2002.
- [2] A. L. Zhang, C. Changli Xue, a H. H. S. Fong. Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects. I. F. F. Benzie a S. Wachtel-Galor (ed.). 2. vydání. Los Angeles: Taylor and Francis group, 2011.
- [3] R. H. Bannerman. Traditional Medicine in Modern Health Care Services. *World Health Forum.* 3(1), 8–13, 1982.
- [4] M. A. Kuhn a D. Winston. Winston & Kuhn's Herbal Therapy and Supplements: A Scientific and Traditional Approach. M Zuccarini a H. Kogut (ed.). 2. vydání. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2008.
- [5] D. M. Eisenberg. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *JAMA.* 280(18), 1569–1575, 1998.
- [6] P. Talalay a P. Talalay. The importance of using scientific principles in the development of medicinal agents from plants. *Acad. Med. J. Assoc. Am. Med. Coll.* 76(3), 238–247, 2001.
- [7] F. W. Fraunfelder. Ocular side effects from herbal medicines and nutritional supplements. *Am. J. Ophthalmol.* 138(4), 639–647, 2004.
- [8] A. E. Osbourn a V. Lanzotti. Introduction to the Different Classes of Natural Products, v knize *Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application.* K. Springob (ed.). 1. vydání. New York: Springer-Verlag, 3–50, 2009.
- [9] T. Acamovic a J. D. Brooker. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proc. Nutr. Soc.* 64(3), 403–412, 2005.
- [10] V. Cody, E. Middleton, a J. B. Harborne. Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships. *Prog. Clin. Biol. Res.* 231, 1–592, 1986.
- [11] S. Kumar a A. K. Pandey. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* 2013, 1–16, 2013.
- [12] A. Crozier. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview, v knize *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.* M. N. Clifford a H. Ashihara (ed.). 1. vydání. New Jersey: Wiley Blackwell, 1–24, 2008.

- [13] D. Raffa, B. Maggio, M. V. Raimondi, F. Plescia, a G. Daidone. Recent discoveries of anticancer flavonoids. *Curr. Adv. Cancer Res. Ther. Targets Chem. Biol.* 142, 213–228, 2017.
- [14] P.-G. Pietta. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63(7), 1035–1042, 2000.
- [15] N. C. Cook a S. Samman. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 7(2), 66–76, 1996.
- [16] D. A. Tapas, D. M. Sakarkar, a R. Kakde. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop. J. Pharm. Res.* 7(3), 1089–1099, 2008.
- [17] J. Sonnenbichler a I. Zetl. Biochemical effects of the flavonolignane silibinin on RNA, protein and DNA synthesis in rat livers. *Prog. Clin. Biol. Res.* 213, 319–331, 1986.
- [18] R. Saller, R. Meier, a R. Brignoli. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs.* 61(14), 2035–2063, 2001.
- [19] T. P. T. Cushnie a A. J. Lamb. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 26(5), 343–356, 2005.
- [20] M. M. Cowan. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4), 564–582, 1999.
- [21] K. Brusselmans, R. Vrolix, G. Verhoeven, a J. V. Swinnen. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J. Biol. Chem.* 280(7), 5636–5645, 2005.
- [22] K. C. Ong a H. E. Khoo. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci.* 67(14), 1695–1705, 2000.
- [23] G. Nan, J. Sun, M. Ding, X. Yang, a G. Yang. Interaction behavior between myricetin and dihydromyricetin with pepsin by spectroscopic and docking methods. *J. Mol. Liq.* 223, 128–135, 2016.
- [24] D. K. Semwal, R. B. Semwal, S. Combrinck, a A. Viljoen. Myricetin: A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities. *Nutrients.* 8(2), 90, 2016.
- [25] N. P. Das a S. P. Sothy. Studies on flavonoid metabolism. Biliary and urinary excretion of metabolites of (+)-(U- 14 C)catechin. *Biochem. J.* 125(2), 417–423, 1971.
- [26] H. Zhang, G. Xie, M. Tian, Q. Pu, a M. Qin. Optimization of the Ultrasonic-Assisted Extraction of Bioactive Flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* and Subsequent Separation and Purification of Two Flavonoid Aglycones by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Molecules.* 21(8), 1096, 2016.

- [27] Z. Shian, Y. Kong, L. Zhou, C. Zhou, X. Zhang, a Y. Wang. Efficient conversion of myricetin from *Ampelopsis grossedentata* extracts and its purification by MIP-SPE. *J. Chromatogr. B.* 945-946, 39–40, 2013.
- [28] T. K. Hyun, S. H. Eom, C. Y. Yu, a T. Roitsch. *Hovenia dulcis*--an Asian traditional herb. *Planta Med.* 76(10), 943–949, 2010.
- [29] Y. Shen. Dihydromyricetin as a novel anti-alcohol intoxication medication. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32(1), 390–401, 2012.
- [30] C. D. Klaasen a L. J. Casarett. *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons.* C. D. Klaasen (ed.). 8. vydání. New York: McGraw-Hill, 2013.
- [31] Z. Knejzlík, J. Káš, a T. Ruml. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem Listy.* 2000(94), 913–918, 2000.
- [32] M. Stiborová, J. Hudeček, J. Páca Jr., V. Martínek, a J. Páca. Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem Listy.* 2004(98), 876–890, 2004.
- [33] C. Ioannides. Xenobiotic Metabolism: An Overview, v knize *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics.* C. Ioannides (ed.). 1. vydání. Chichester: John Wiley and Sons, 1–32, 2001.
- [34] C. Beedham. The role of non—P450 enzymes in drug oxidation. *Pharm. World Sci.* 19(6), 255–263, 1997.
- [35] P. Jancova, P. Anzenbacher, a E. Anzenbacherova. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czechoslov.* 154(2), 103–116, 2010.
- [36] H. Glatt a W. Meinel. Pharmacogenetics of soluble sulfotransferases (SULTs). *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 369(1), 55–68, 2004.
- [37] Y. J. Surh. Bioactivation of benzylic and allylic alcohols via sulfo-conjugation. *Chem. Biol. Interact.* 109(1–3), 221–235, 1998.
- [38] P. J. van Bladeren. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem. Biol. Interact.* 129(1–2), 61–76, 2000.
- [39] D. Sheehan, G. Meade, V. M. Foley, a C. A. Dowd. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360(1), 1–16, 2001.
- [40] Y. Li, C. Hung, F. Yeh, J. Lin, a J. Chung. Luteolin-inhibited arylamine N-acetyltransferase activity and DNA–2-aminofluorene adduct in human and mouse leukemia cells. *Food Chem. Toxicol.* 39(7), 641–647, 2001.

- [41] I. M. Westwood, A. Kawamura, E. Fullam, A. J. Russell, S. G. Davies, a E. Sim. Structure and mechanism of arylamine N-acetyltransferases. *Curr. Top. Med. Chem.* 6(15), 1641–1654, 2006.
- [42] E. Sim. Arylamine N-acetyltransferases: Structural and functional implications of polymorphisms. *Highlights 2008 Annu. Congr. Br. Toxicol. Soc.* 254(3), 170–183, 2008.
- [43] E. Sim, K. Walters, a S. Boukouvala. Arylamine N-acetyltransferases: from structure to function. *Drug Metab. Rev.* 40(3), 479–510, 2008.
- [44] D. W. Hein. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 9(1), 29–42, 2000.
- [45] A. Kawamura. Eukaryotic arylamine N-acetyltransferase. Investigation of substrate specificity by high-throughput screening. *Biochem. Pharmacol.* 69(2), 347–359, 2005.
- [46] S. Boukouvala a G. Fakis. Arylamine N-acetyltransferases: what we learn from genes and genomes. *Drug Metab. Rev.* 37(3), 511–564, 2005.
- [47] A. Toure. Prevention of isoniazid toxicity by NAT2 genotyping in Senegalese tuberculosis patients. *Toxicol. Rep.* 3, 826–831, 2016.
- [48] Y. J. Moon, X. Wang, a M. E. Morris. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol. In Vitro.* 20(2), 187–210, 2006.
- [49] N. V. Bhagavan a C.-E. Ha. *Enzymes and Enzyme Regulation, v knize Essentials of Medical Biochemistry. 2. vydání.* San Diego: Academic Press, 47–58, 2015.
- [50] V. Kukongviriyapan. Inhibitory effects of polyphenolic compounds on human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 36(1), 15–28, 2006.
- [51] H. Wang, G. M. Vath, K. J. Gleason, P. E. Hanna, a C. R. Wagner. Probing the mechanism of hamster arylamine N-acetyltransferase 2 acetylation by active site modification, site-directed mutagenesis, and pre-steady state and steady state kinetic studies. *Biochemistry (Mosc.)*. 43(25), 8234–8246, 2004.
- [52] J. Dairou, N. Atmane, F. Rodrigues-Lima, a J.-M. Dupret. Peroxynitrite Irreversibly Inactivates the Human Xenobioticmetabolizing Enzyme Arylamine N -Acetyltransferase 1 (NAT1) in Human Breast Cancer Cells: A CELLULAR AND MECHANISTIC STUDY. *J. Biol. Chem.* 279(9), 7708–7714, 2004.

- [53] H. G. Cheon, L. W. Boteju, a P. E. Hanna. Affinity alkylation of hamster hepatic arylamine N-acetyltransferases: isolation of a modified cysteine residue. *Mol. Pharmacol.* 42(1), 82–93, 1992.
- [54] V. Kukongviriyapan. Inhibitory effects of polyphenolic compounds on human arylamine N -acetyltransferase 1 and 2. *Xenobiotica.* 36(1), 15–28, 2006.
- [55] N. Ragunathan. Identification of the xenobiotic-metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase 1 as a new target of cisplatin in breast cancer cells: molecular and cellular mechanisms of inhibition. *Mol. Pharmacol.* 73(6), 1761–1768, 2008.
- [56] M. Bebová. Modulation of xenobiotic conjugation enzymes by dihydromyricetin in rats. *Monatshefte Für Chem. - Chem. Mon.* 148(11), 2003–2009, 2017.
- [57] E. W. Brooke, S. G. Davies, A. W. Mulvaney, F. Pompeo, E. Sim, a R. J. Vickers. An approach to identifying novel substrates of bacterial arylamine N-acetyltransferases. *Bioorg. Med. Chem.* 11(7), 1227–1234, 2003.
- [58] S. R. Mortensen, S. Brimijoin, M. J. Hooper, a S. Padilla. Comparison of their VitroSensitivity of Rat Acetylcholinesterase to Chlorpyrifos-oxon: What Do Tissue IC50 Values Represent. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 148(1), 46–49, 1998.
- [59] S. Arslan, N. Degerli, a F. Bardakci. Distribution of N-acetyltransferase Type 1 (NAT1) genotypes and alleles in a Turkish population. *Genet. Mol. Biol.* 27(2), 162–164, 2004.
- [60] A. L. Sikora, B. A. Frankel, a J. S. Blanchard. Kinetic and chemical mechanism of arylamine N-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry (Mosc.)*. 47(40), 10781–10789, 2008.

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

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