

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

**Vplyv vybraných izoflavonoidov na aktivitu enzýmov
podieľajúcich sa na biotransformácii cytostatík**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Hana Bártíková, Ph.D.

Hradec Králové 2015

Erika Verešová

Týmto by som veľmi rada poďakovala svojej školiteľke PharmDr. Hane Bártíkovej, Ph.D. za jej vedenie, ochotu, trpezlivosť a cenné rady, vďaka ktorým táto práca mohla byť napísaná. Ďalej Mgr. Miloslavovi Macháčkovi za neustálu pomoc a rady.

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného, alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové, 11.5.2015

Erika Verešová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Erika Verešová

Školitel: PharmDr. Hana Bártíková, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Vplyv vybraných izoflavonoidov na aktivitu enzýmov podieľajúcich sa na biotransformácii cytostatík

Počet ľudí trpiacich rakovinou narastá. Stále viac sa vedci snažia obracať na prírodu a hľadať v nej pomoc. Jednými z možných odpovedí na ich otázky by bolo použitie prírodných látok buď v liečbe, alebo i v prevencii rakoviny. Takýmito látkami môžu byť napríklad izoflavonoidy, polyfenolické látky vyskytujúce sa napr. v sóji. V mnohých výskumoch už bol testovaný ich vplyv na telo. Táto práca sa zameriava na ich účinok na aktivitu enzýmov podieľajúcich sa na biotransformácii cytostatík.

Experimenty boli vykonané na bunčných líniiach MCF-7 a MDA-MB-231 po ovplyvnení izoflavonoidmi po dobu 24, 48 a 72 hodín. Bunečná línia MCF-7 vykazovala viac zmien v aktivite ako línia MDA-MB-231. Z testovaných štyroch enzýmov, AKR1A1, AKR1C, CBR a GST, sa u dvoch enzýmov nepotvrdila žiadna zmena aktivity po ovplyvnení izoflavonoidmi. Ide o enzýmy CBR a AKR1C. Len prípade GST sa dosiahlo žiadaného výsledku zníženia aktivity pre všetky izoflavonoidy, genistein, daidzein a formononetin, a to na bunečnej línii MCF-7 po 24 hodinovej inkubácii. Izoflavonoid formononetin sa zaslúžil o úspešnú zmenu aktivity v štyroch prípadoch, u bunkách MCF-7 okrem už spomenutého zníženia u enzýmu GST, sa zaslúžil o zvýšenie

aktivity enzýmu AKR1A1 po použití 4-pyridínkarboxaldehydu po 72 hodinovej inkubácii a taktiež po 72 hodinovej inkubácii u enzýmu GST, kde išlo tiež o zvýšenie aktivity. U bunečnej línii MDA-MB-231 sa podieľal len na zvýšení aktivity u enzýmu AKR1A1 po použití glycerinaldehydu po 24 hodinovej inkubácii. U bunečnej línii MCF-7 sa dvakrát preukázal vplyv daidzeinu: raz spomenutý inhibičný u GST a aktivačný účinok na enzým AKR1A1 po 72 hodinovej inkubácii po použití 4-pyridínkarboxaldehydu. Len jeden krát sa preukázal vplyv genisteinu na aktivitu enzýmov, išlo o zníženie aktivity enzýmu GST u MCF7 po 24 hodinovej inkubácii.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Erika Verešová

Supervisor: PharmDr. Hana Bártíková, Ph.D.

Title of diploma thesis: The impact of selected isoflavonoids on the activity of enzymes participating in cytostatic drugs biotransformation

More and more people are suffering from cancer. Scientists are striving to turn to nature and find the help there. One of the possible answers to their questions would be usage of natural substances in either prevention or even treatment of cancer. Isoflavonoids, polyphenolic compounds occurring e.g. in soybeans, are one of them. Many scientists have already tested their influence on the human body. This thesis focuses on the possible effect of isoflavonoids on the activity of enzymes participating in biotransformation of cytostatic drugs.

Experiments were performed on human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 exposed to isoflavonoids for 24, 48 and 72 hours. Cell line MCF-7 showed greater changes in the enzymatic activity than MDA-MB-231. Of the four enzymes tested (AKR1A1, AKR1C, CBR and GST), two enzymes showed no change in activity after exposure to isoflavonoids – enzymes CBR and AKR1C. Only one experiment brought the desired result for all isoflavones, genistein, daidzein and formononetin. Activity of GST enzyme on the MCF-7 cell line, after 24 hours of incubation with isoflavonoids was reduced. Isoflavonoid formononetin was responsible for the significant change of activity in four cases, in the MCF-7 cells, aside the above mentioned reduction in the GST enzyme, it was responsible for the increase in the activity of the enzyme AKR1A1 where

4-pyridinecarboxaldehyde was used and of the enzyme GST after 72 hours of incubation. The influence of formononetin on the cell line MDA-MB-231 resulted in the increased activity of the enzyme AKR1A1 using glyceraldehyde as a substrate after 24 hour incubation. Daidzein demonstrated twice the impact on the cell line MCF-7: once the inhibitory effect on GST (mentioned above) and once activating effect on the enzyme AKR1A1 after 72 hours incubation after using 4-pyridinecarboxaldehyde. The effect of genistein on the activity of the enzymes was shown only once. Genistein only reduced activity of GST in the MCF-7 cell line after 24 hours of incubation.

OBSAH

1	ZOZNAM SKRATIEK	9
2	ÚVOD.....	10
3	TEORETICKÁ ČASŤ.....	12
3.1	FENOLOVÉ ZLÚČENINY A ICH PROTIRAKOVINOVÉ ÚČINKY	12
3.1.1	FENOLOVÉ KYSELINY A ANALÓGY	13
3.1.2	FLAVONOIDY	14
3.1.3	IZOFLAVONOIDY	16
3.2	VYBRANÉ ENZÝMY A ICH SUBSTRÁTY	30
3.2.1	ALDEHYDREDUKTÁZA AKR1A1.....	30
3.2.2	ALDOKETOREDUKTÁZY AKR1C.....	31
3.2.3	KARBONYLREDUKTÁZA CBR	33
3.2.4	GLUTATION-S-TRANSFERÁZY (GST).....	34
4	CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE.....	35
5	METODICKÁ ČASŤ	36
5.1	PRÍSTROJOVÉ A MANIPULAČNÉ VYBAVENIE	36
5.2	REAGENCIE A CHEMIKÁLIE	36
5.3	PASÁŽOVANIE BUNIEK.....	38
5.4	OVPLYVNENIE BUNIEK IZOFLAVONOIDMI.....	38
5.5	SPRACOVANIE BUNIEK NA SUBCELULÁRNE FRAKCIE	38
5.6	BCA STANOVENIE BIELKOVINY.....	40
5.7	STANOVENIE AKTIVITY ALDEHYDREDUKTÁZY (AKR1A1) POMOCOU 4-PYRIDINKARBOXALDEHYDU	42
5.8	STANOVENIE AKTIVITY ALDEHYDREDUKTÁZY (AKR1A1) POMOCOU GLYCERALDEHYDU	44
5.9	STANOVENIE AKTIVITY ALDOKETOREDUKTÁZ (AKR1C) POMOCOU ACENAFTENOLU.....	46
5.10	STANOVENIE AKTIVITY KARBONYLREDUKTÁZY (CBR) POMOCOU MENADIONU	48
5.11	MERANIE AKTIVITY GLUTATION-S-TRANSFERÁZY NA DOŠTIČKE.....	50

5.12	ŠTATISTICKÁ ANALÝZA	51
6	VÝSLEDKY.....	52
6.1	BCA STANOVENIE BIELKOVINY.....	52
6.2	STANOVENIE AKTIVITY ALDEHYDREDUKTÁZY (AKR1A1) POMOCO 4-PYRIDINKARBOXALDEHYDU	54
6.3	STANOVENIE AKTIVITY ALDEHYDREDUKTÁZY (AKR1A1) POMOCO GLYCERALDEHYDU	57
6.4	STANOVENIE AKTIVITY ALDOKETOREDUKTÁZ (AKR1C) POMOCO ACENAFTENOLU.....	60
6.5	STANOVENIE AKTIVITY KARBONYLREDUKTÁZY (CBR) POMOCO MENADIONU	63
6.6	MERANIE AKTIVITY GLUTATION-S-TRANSFERÁZY NA DOŠTIČKE.....	66
7	DISKUSIA	69
8	ZÁVER.....	72
9	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	73

1 ZOZNAM SKRATIEK

17 β -HSD	17 β -hydroxysteroid dehydrogenáza
AKR	Aldo-ketoreduktáza
BCA	Bicinchonická kyselina
BSA	Hovädzí sérový albumín
CBR	Karbonylreduktáza
COX-2	Cyklooxygenáza 2
DAUN	Daunorubicín
DMSO	Dimetylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOX	Doxorubicín
FBAL	2-fluór- β -alanín
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-transferáza
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NADP ⁺	Nikotinamidadenín dinucleotidfosfát
NADPH	Redukovaná forma nikotinamidadenín dinucleotidfosfátu
O-DMA	O-desmetylangolenzin
PBS	Fosfátový pufr
PGF2 α syntáza	Prostaglandínsyntáza
SDR	Dehydrogenázy/reduktázy s krátkym reťazcom
SERM	Selektívny modulátor estrogénových receptorov

2 ÚVOD

Rakovina je rastúci zdravotný problém po celom svete a je druhou najčastejšou príčinou úmrtí po ochorení srdca. V súčasnej dobe existuje viac ako 10 miliónov prípadov rakoviny ročne na celom svete, ako napr. rakovina pečene, pľúc, žalúdka, hrubého čreva, prsníka a veľa ďalších.

Bohužiaľ neexistuje žiaden extrémne efektívny liek na liečbu väčšiny typov nádorov, ktorý by bol súčasne čo najmenej toxický na telu vlastné bunky. Nové prírodné produkty ponúkajú príležitosti pre inovácie v oblasti liečiv, ako v prevencii, tak v liečbe. Značná časť protinádorových látok v súčasnosti používaných v klinickej praxi sú prírodného pôvodu. Napríklad viac než polovica všetkých protirakovinových liekov na predpis schválených medzinárodne medzi 1940 a 2006, boli prírodné látky, alebo ich deriváty.

Už dávnejší výskum preukázal, že v priemere 35% prípadov rakoviny bolo spôsobených stravou. Aj laboratórne výsledky poukázali na fakt, že zvýšený príjem ovocia a zeleniny a celých zŕn v strave, je významne spájané so znížením rizika niektorých druhov rakoviny (Huang, a ďalší, 2010).

Veľa klinických štúdií je zameraných na užívanie doplnkov stravy a na to, ako upravenie stravy pomáha v rámci prevencii rakoviny. Protektívne účinky stravy sú založené na vyvolaní indukcie bunecných obranných systémov, vrátane aktivácii detoxikačných a antioxidačných enzýmov.

Fytochemikálie sú definované ako bioaktívne neesenciálne výživné látky z rastlín (odvodené z gréckeho slova *phyto*, čo znamená rastlina). Majú rôzne účinky na ľudské zdravie ako sú napríklad predpokladané chemoprotektívne vlastnosti (antikancerogénne a antimutagénne), a môžu zasahovať do nádorového postupu a progresie. Odhaduje sa, že existuje viac ako 5000 rôznych fytochemikálií, ktoré boli zistené v ovocí, zelenine, obilí a iných rastlinách, hlavne klasifikovaných ako fenolické látky, karotenoidy, vitamíny, alkaloidy, dusíkové zlúčeniny a organosírové zlúčeniny.

Napriec veľkú štruktúralnu rozmanitosť fytochemikálií, fenolické látky upútavajú najväčší záujem pre svoju značnú bioaktivitu. Fenoly poskytujú základné funkcie v rozmnožovaní a rastu rastlín, pôsobia ako obranné mechanizmy proti patogénom, parazitom a predátorom a prispievajú tiež na sfarbení rastlín. Okrem toho, zelenina a ovocie bohatá na fenolické látky, hrá dôležitú úlohu ako chemopreventívne činidlá;

napríklad fenolové látky v jablkách boli spájané s inhibíciou rakoviny hrubého čreva *in vitro*. Mnoho fenolových zlúčenín už bolo popísaných, ktoré majú silnú antioxidačnú aktivitu a taktiež aj protirakovinové alebo antikarcinogénne / antimutagénne, antiaterosklerotické, antibakteriálne, antivírusové a protizápalové účinky v rôznych mierach (Huang, a ďalší, 2010) (Heim, a ďalší, 2002) (Ding, a ďalší, 2015).

V rámci tejto diplomovej práce nás zaujímali prírodné látky odvodené od fenolických zlúčenín, izoflavonoidy. Konkrétne sa jedná o izoflavonoid genistein, daidzein a formononetin a ich účinky v tele súvisiace s rakovinou. Diplomová práca sa zaoberá ich vplyvom na aktivity enzýmov podieľajúcich sa na biotransformácii cytostatík. Z enzýmov boli skúmané aktivity: aldehydreduktázy (AKR1A1) pomocou 4-pyridinkarboxaldehydu, aldehydreduktázy (AKR1A1) pomocou glycerinaldehydu, aldoketoreduktázy (AKR1C) pomocou acenaftenolu, karbonylreduktázy (CBR) pomocou menadionu a glutation-S-transferázy. Pokusy boli vykonané na bunčných líniách MCF-7 a MDA-MB-231, ktoré boli ovplyvnené izoflavonoidmi po dobu 24, 48 a 72 hodín. Všetky experimenty boli stanovované spektrofotometricky (zmenou absorbancie v prístroji TECAN) na mikrotitračných doštičkách.

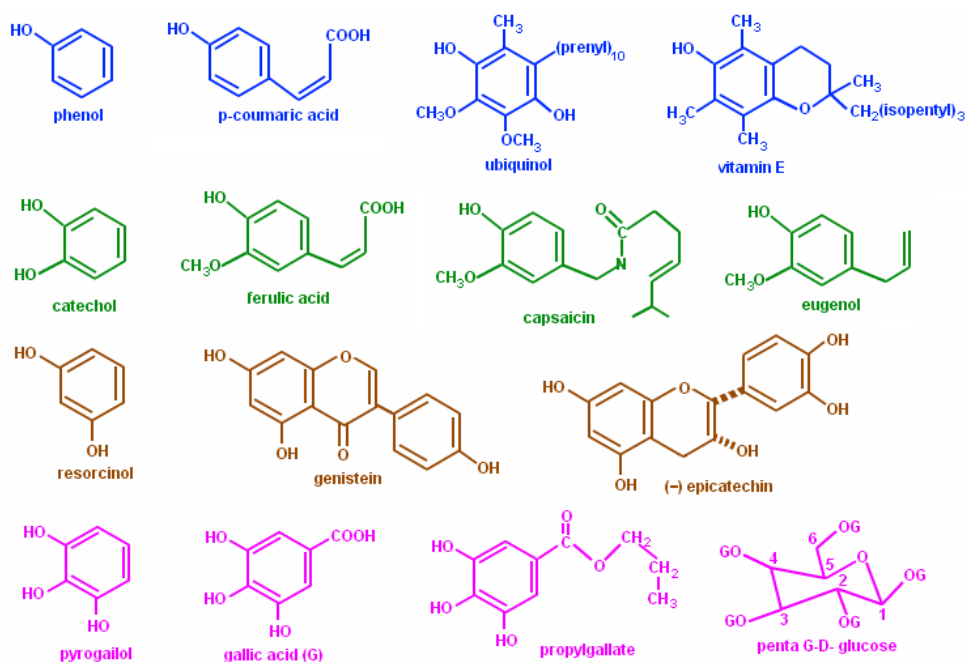
3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 FENOLOVÉ ZLÚČENINY A ICH PROTIRAKOVINOVÉ ÚČINKY

Fenolové zlúčeniny sú zlúčeniny, ktoré majú jeden, alebo viac aromatických kruhov, nesúce jednu, alebo viac hydroxylových skupín a všeobecne sú rozdelené do kategórií ako fenolické kyseliny a ich analógy, flavonoidy, triesloviny, taníny, stilbény, kurkuminoidy, kumaríny, lignany, chinóny a ďalšie na základe počtu fenolových kruhov a ďalších konštrukčných prvkov, ktoré spájajú tieto kruhy. Vyskytujú sa vo veľmi často používaných rastlinách v kuchyni, ako napr. v kukurici, kurkume, hrozne, zázvoru, káve, víne a v čaji. Všetky majú antioxidačné účinky (Huang, a ďalší, 2010) (Heim, a ďalší, 2002).

3.1.1 FENOLOVÉ KYSELINY A ANALÓGY

Fenolové kyseliny sú hlavnou skupinou fenolových látok, široko vyskytujúcich sa v rastlinnej ríši. Prírodné fenolové kyseliny sa buď vyskytujú vo voľnej, alebo konjugovanej forme, zvyčajne ako estery alebo amidy. Vďaka štruktúrálnej podobnosti, niekoľko ďalších polyfenolových zlúčenín sa posudzovalo ako analógy fenolických zlúčenín, napr. kapsaicín, rozmarínová kyselina, gingerol (Huang, a ďalší, 2010).



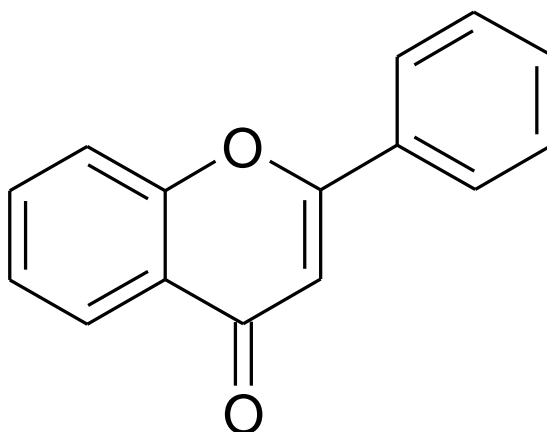
Obr. 1 Fenolické zlúčeniny vyskytujúce sa v prírode. Prevzaté z: (TutorVista)

Fenolové kyseliny a ich analógy majú široké spektrum bioaktivity, niektoré môžu mať významnú úlohu v prevencii rakoviny. Väčšina fenolických kyselín má antioxidačné schopnosti. Schopnosť rušiť voľné radikály závisí na počte a polohe hydroxylovej skupiny a metoxy substituentov v molekulách.

Okrem toho môžu fenolové kyseliny a analógy inhibovať rast nádorových buniek a indukovať apoptózu vďaka zástave bunkového cyklu; regulácii signálnych dráh; indukciu alebo inhibíciu niektorých enzýmov, či vďaka zlepšenej detoxikácii. Niektoré fenolové kyseliny a analógy vykazujú tiež antibakteriálne, antimykotické, antivírusové, antimutagénne a protizápalové účinky (Huang, a ďalší, 2010).

3.1.2 FLAVONOIDY

Flavonoidy sú skupinou obsahujúcou viac ako 4000 fenolových zlúčenín, ktoré sa vyskytujú prirodzene v rastlinách. Tieto zlúčeniny majú základnú kostru fenylobenzopyránu (C₆-C₃-C₆), skladá sa z 2 aromatických kruhov (kruhy A a B) spojené tromi atómami uhlíka, ktoré sú zvyčajne v oksyličenom centrálnom pyránovom kruhu, alebo kruhu C.



Obr. 2 Fenylobenzopyrán.

Rôzne druhy flavonoidov sú prítomné v takmer všetkých rastlinách ako sú ovocie a zelenina. Flavonoidy sú najväčšou skupinou fenolových látok zastúpenou v liečivých bylinách a korení. Hlavné potravinové zdroje rastlín sú petržlen, tymian, čerešne, čaj, olivy, brokolica, a strukoviny. Kvercetín je jedným z hlavných potravinových flavonoidov, nájdený v širokej škále druhov ovocia, zeleniny a nápojov. Flavanoly, napr. katechíny, sú tiež rozšírené v liečivých rastlinách (napr. čaj, jablká, jahody, kakao). Antokyany, vrátane antokyanidínov a ich glykozidy, sú široko distribuované v liečivých rastlinách, ako je napríklad *Rosa chinensis*. Mnoho potravín (napr. ovocie, zelenina, obilie, atď.), obsahujú antokyany, napr. hroznové šupky, čučoriedky, červená kapusta, fazuľa a kukurica. (Huang, a ďalší, 2010).

Flavonoidy sú tepelne stabilné a straty v dôsledku varenia či vyprážania sú relatívne nízke. Považuje sa, že flavonoidy sú absorbované pasívnou difúziou potom ako glykozylované flavonoidy sú prevedené na ich aglykóny. Mikroflóra hrubého čreva hraje dôležitú úlohu v tejto konverzii. Biologická dostupnosť flavonoidov je len čiastočná, s podielom požitého množstva, ktoré sa absorbuje, s rozhraním od 0,2% do 0,9% pre čajové

katechíny, na 20% pre kvercetín a izoflavóny. Tým pádom veľká časť zostáva neabsorbovaná a gastrointestinálna sliznica je vystavená pomerne vysokej koncentrácii týchto zlúčenín. Po absorpcii sú flavonoidy konjugované v pečeni pomocou glukuronidácie, sulfatácie, alebo metylácie, alebo sú metabolizované na menšie fenolové zlúčeniny.

Čaj je tiež dôležitým zdrojom flavonoidov. Veľký počet experimentálnych štúdií naznačuje protinádorové účinky čajových polyfenolov. Riziko rakoviny žalúdka v tejto štúdií klesá s rastúcim počtom dávok zeleného čaju pripravených za deň. V nedávnej štúdií prípadov a kontrol sledovali spotrebu siedmich, alebo viacerých šálok zeleného čaju za deň, čo bolo potom spájané s 31% nižším rizikom rakoviny žalúdka. V súlade s týmito údajmi, vysoká spotreba zeleného čaju, je spájaná so znížením rizika prekancerózneho chronickej atrofickéj gastritídy.

Experimentálne výsledky, získané najmä v posledných troch rokoch, preukázali široké spektrum biologických aktivít pre flavonoidy, ktoré môžu byť prospešné proti rakovine. Nie je však jasné, či sú prítomné tieto účinky vo fyziologických koncentráciách, alebo či sú za tieto účinky zodpovedné metabolity, ktoré sú pravdepodobne najviac relevantné pre ľudí (Marchand, 2002).

Flavonoidy sú spojené so znížením rizika chronických ochorení, vrátane rakoviny, pretože majú silné antioxidačné aktivity *in vitro*, sú schopné upravovať široký rad reaktívnych druhov kyslíku (napr. hydroxylové radikály, peroxidové častice, kyselinu chlórnu a superoxidové radikály). Veľa flavonoidov tvorí chelátové ióny prechodných kovov, ako je železo a meď, čím znižujú ich schopnosť podporovať tvorbu reaktívnych častíc.

Flavonoidy tiež inhibujú biomolekulárne poškodenie peroxydusitanem *in vitro*, zabraňujú karcinogénom ich metabolickú aktiváciu, vyvolávajú apoptózu pomocou zastavenia bunkového cyklu, podporujú diferenciáciu buniek, modulujú rezistenciu na rôzne druhy liekov (multidrug resistance) a inhibujú proliferáciu a angiogénny proces. Tieto činnosti flavonoidov sú umožnené vďaka ich štruktúram. Prípadná glykozylácia hydroxylových skupín a substitúcia iných substituentov (napr. metoxy skupín) má vplyv aj na antioxidačnú aktivitu flavonoidov (Huang, a ďalší, 2010).

Niektoré flavonoidy (napr. čajové katechíny) majú protizápalovú aktivitu vďaka schopnosti inhibovať cyklooxygenázu-2 (COX-2) a indukovať syntézu oxidu dusnatého. Zdá sa, že chronický zápal hrá dôležitú úlohu v etiológii rady rakovín a tým pádom sú inhibítory COX-2 študované ako chemopreventívne činidlá proti karcinómu hrubého

čreva. Schopnosť inhibovať rast buniek bola dokázaná u rôznych flavonoidov na niekoľkých ľudských nádorových bunkových líniiach. V estrogén-dependentných nádorových bunkách alebo zvieracích modeloch boli antiproliferačné účinky chápané v súvislosti s antiestrogénovými vlastnosťami niektorých flavonoidov (napr. izoflavonoidov). V ďalších modeloch *in vitro* bolo u flavonoidov preukázané, že dokážu ovplyvniť bunkovú signalizáciu a progresiu bunkového cyklu. Bohužiaľ všetky tieto účinky boli často preukázané v koncentráciách flavonoidov, ktoré sú vyššie, než aké môžu byť dosiahnuté u človeka prostredníctvom stravy. Okrem toho, tieto experimenty zvyčajne používajú originálne zlúčeniny (nekonjugované flavonoidy). Iba obmedzené množstvo dát je k dispozícii k hodnoteniu biologickej činnosti konjugovaných flavonoidov alebo ich následných metabolitov, ktoré sú hojnejšie v obehu než sú materské zlúčeniny po požití stravy bohatej na flavonoidy (Franke, a ďalší, 2008).

3.1.3 IZOFLAVONOIDY

Medzi izoflavonoidy patrí daidzein, genistein, glycitein, formononetin, a ich glykozidy (napr. genistin, daidzin), väčšinou sú nachádzané v sóji, strukoviniach a červenej ďateline. Sójový izoflavón genistein je inhibítor angiogenézy a preukázal aj protinádorové a antiangiogenetické účinky u myšieho melanómu a karcinómu prsníka. Okrem toho, niektoré izoflavóny (napr. genistein a daidzein) sú fytoestrogény a môžu napodobňovať biologickú aktivitu estrogénov a ovplyvniť metabolizmus steroidných hormónov. Preto by mohli hrať dôležitú úlohu pri prevencii rakoviny prsníka (Huang, a ďalší, 2010).

Orálne podávané izoflavonoidy sú účinne absorbované po odštiepení glykozidov. Tento dej sa vyskytuje najmä pomocou črevných baktérií. V iných výskumoch bolo zistené, že izoflavonoidy nájdené v močových cestách, alebo v plazme, sú spoľahlivé biomarkery pre spotrebu sóje. Bolo skúmané, ako sa miera renálnej exkrécie izoflavonoidov mení v závislosti na zmene črevnej mikroflóry podľa veku, či užitých antibakteriálnych liečiv. Zistilo sa, že zdravé deti absorbujú viac izoflavonoidov zo sóje, než zdraví dospelí, ale vychytávanie izoflavonoidov sa znižuje u detí počas užívania antibiotík. Predpokladalo sa, že táto hypotéza by mohla byť vysvetlená rozdielmi v črevnom prostredí, ktoré je sterilné pri narodení a mikroflóra sa vyvíja postupne v priebehu niekoľkých rokov, než sa ustáli u dospelých.

Z výsledkov štúdie sa zistilo, že deti mali vyššiu mieru renálnej exkrécie izoflavonoidov než dospelí, ktorí boli všetci zdraví. Aj keď deti predtým užívali antibiotiká, alebo nie. Potvrdilo sa, že zmeny miery renálnej exkrécie izoflavonoidov boli závislé od predošlej antibiotickej liečby. Počas použitej antibiotickej liečby v tejto štúdií sa u detí preukázalo zníženie o 20% pre daidzein, 40% pre genistein a 25% pre celkové hladiny izoflavonoidov. Naproti tomu u 12 dospelých hladiny daidzeinu vzrástli o 87%, geinsteinu o 54% a celkové množstvo izoflavonoidov o 74% počas liečby antibiotikami (Franke, a ďalší, 2008).

Sójové výrobky obsahujú izoflavonoidy predovšetkým ako glykozidy, ktoré sú hydrolyzované po požití na biologicky dostupné aglykóny hlavne vďaka črevným baktériám. Deglykosylácia týchto látok je dôležitým krokom v absorpcii, metabolizme, vylučovaní a biologickej aktivite izoflavonoidov (Rafii, 2015). Avšak tieto baktérie môžu ďalej metabolizovať „voľné“, biologicky dostupné izoflavonoidové aglykóny k ďalšiemu rozkladu s výslednými produktami napr. equol, p-etylphenol a iné. Aj keď definitívny dôkaz chýba, ale výsledok tejto štúdie by mohol byť spôsobený účinkom antibiotík u detí na zníženie populácie črevných baktérií podieľajúcich sa na hydrolýze izoflavonoidov, čo následne vedie k nedostatku biodostupných izoflavonoidov. Naopak antibiotiká u dospelých by mohli prednostne znížiť populáciu črevných baktérií podieľajúcich sa na degradácii izoflavonoidových aglykónov, zatiaľ čo môžu mať malý vplyv na baktérie, ktoré hydrolyzujú izoflavonoidové glykozidy; čím sa zvyšuje doba, po ktorú môže byť biologicky dostupné aglykóny izoflavonoidov vstrebávané (Franke, a ďalší, 2008).

Väčšina chemických karcinogénov vyžaduje štruktúrlnu premenu vo fáze I pomocou metabolizujúcich enzýmov do viac reaktívnej formy, ktorá je schopná sa naviazať na DNA. Reaktívne chemické skupiny zavedené enzýmami I. fázy (alebo pôvodné skupiny karcinogénu) môžu byť detoxikované konjugáciou pomocou metabolických enzýmov II. fázy na vo vode rozpustné zlúčeniny, ktoré potom môžu byť odstránené z tela. Štúdie *in vitro* u zvierat ukázali, že čajové katechíny zvyšujú aktivitu niekoľkých detoxikačných a antioxidačných enzýmov, ako je napríklad glutatión reductáza, glutatión peroxidáza, glutatión S-reductáza, kataláza a chinón reductáza.

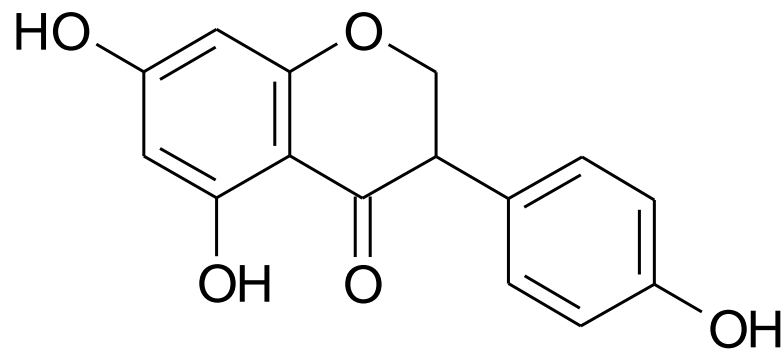
Sójové výrobky sú hlavným zdrojom izoflavonoidov v strave. Mnohé štúdie na zvieratách ukázali ochranný účinok týchto potravín proti nádorom mliečnej žľazy. Podávanie genisteinu na počiatku života zvyšuje predčasné dozrievanie a diferenciáciu prsnej žľazy u potkanov, čo môže byť dôležitým mechanizmom pre inhibujúci účinok sóje na nádor. Vysoká koncentrácia izoflavónov v strave bola tiež spájaná s inhibovaním

tumorgenézy u niekoľkých zvieracích modeloch u rakoviny prostaty. Aj keď ázijské krajiny, ako je Japonsko a Čína, sa líšia v mnohých potenciálne významných ohľadoch od západných krajín, ich vysoká spotreba sóje a nízka incidencia rakoviny prsníka a prostaty sú v súlade s ochranným účinkom sójových potravín proti týmto druhom rakoviny. Niekoľko epidemiologických štúdií sa pokúsilo testovať tieto hypotézy viac do hĺbky. Štúdie prípadov a kontrol (case-control studies) v Singapure a Japonsku ukázali znížené riziko rakoviny prsníka pred menopauzou u spotrebiteľov sójových produktov. Znížené riziko rakoviny prsníka bolo tiež nájdené u ázijsko-amerických žien, ktoré konzumovali veľké množstvo tofu. Avšak, táto asociácia bola obmedzená na tie ženy, ktoré sa narodili v Ázii, čo naznačuje, že expozícia v priebehu skorého života, môže byť dôležitá. Na druhej strane tento účinok pozorovaný u sójových výrobkov by mohol byť v dôsledku inej zložky ázijskej stravy alebo inými faktormi životného štýlu a nemusí teda korelovať s príjmom sóje.

Menej štúdií je k dispozícii na odhalenie vzťahu medzi príjmom sóje a rakovinou prostaty. Avšak, častá konzumácia sójového mlieka a tofu bola spájaná s nižším výskytom rakoviny prostaty v prospektívnych štúdiách (Marchand, 2002).

3.1.3.1 GENISTEIN

Štandardné zloženie izoflavonoidov v sóji obsahuje genistein prevažne vo forme glykozidu genistínu, rovnako ako daidzin a glycitín. Percentuálne podiely rôznych izoflavónov prítomných v sójových bôboch sú: genistin, asi 50%; daidzin, asi 38%; a glycitin, asi 12%. 50 mg dávka sójových izoflavónov, čo predstavuje typickú dennú dávku, poskytuje 25 mg genistínu, 19 mg daidzinu a asi 6 mg glycitínu. Zvyčajne 40% sójového mlieka sú práve sójové izoflavónov. Aby sa naplnila dávka 50 mg sójových izoflavónov, je potreba prijať 125 mg sójového preparátu. Menšie množstvo genisteinu ako aglykónu, je k dispozícii v niektorých prípravkoch z červenej ďateliny (PubChem).



Obr. 3 Štruktúra izoflavonoidu genisteinu

Genistein tlmí aktivitu proteín-tyrozinové kinázy a topoizomerázy II (DNA topoizomerázy, typ II). Je používaný ako antineoplastické a protinádorové činidlo. Experimentálne bolo dokázané, že indukuje zástavu bunčného cyklu v G2 fáze v ľudských a myšacích bunčných línii.

Genistein môže inhibovať rast nádorových buniek tým, že blokuje enzýmy, potrebné pre rast buniek. Genistein môže znížiť riziko kardiovaskulárneho systému u žien po menopauze interakciou s jadrovými estrogenovými receptormi transkripciou bunčných špecifických génov. V randomizovaných klinických štúdiách, genistein zvýšil pomer oxidu dusnatého na endotelíne a zlepšil tok sprostredkovaný endotel-dependentnou vazodilatáciou u zdravých žien po menopauze (DrugBank).

3.1.3.1.1 FARMAKOKINETIKA GENISTEINU

Dôležitým bodom je aj stanovenie jeho farmakokinetiky a farmakodynamiky. Na stanovenie jeho biodostupnosti, bola použitá renálna exkrécia po perorálnom požití. Vzhľadom k tomu, že zistené hladiny genisteinu v moči dosahovali hladiny 3 – 10% podanej dávky, bola jeho bioavailabilita považovaná za dosť nízku. Na druhej strane je treba zmieniť, že táto štúdia nebrala ohľad na jeho vstrebanie priamo z čriev a vylúčenie do žlči v jeho konjugovanej forme, či už ako sulfát, alebo glukuronid, ktoré nemusia byť reabsorbované, ale vylúčené vo výkaloch ako konjugát, alebo čistá látka. Preto sa renálne vylučovanie môže považovať iba za čiastočnú absorpciu genisteinu z gastrointestinálneho traktu.

Farmakokinetika genisteinu u myši pri podávaní orálnou, intramuskulárnou a intravenóznou cestou, odhalila, že genistein je rýchlo eliminovaný z krvného priestoru (Setchell, a ďalší, 2003).

V inej štúdii po podaní genisteinu do žalúdka potkana kanylou, sa objavilo 40 – 50% dávky v žlči po 4 hodinovej perióde, čo potvrdilo, že genistein prechádza enterohepatálnou cirkuláciou. Štúdia zameraná na monitorovanie žlčových ciest pomohla určiť podiel dávky objavenej v žlči, úlohu absorpčných miest a ich vplyv na first-pass metabolizmus genisteinu. Dáta z tejto štúdie ukazujú, aspoň u potkanov, že izoflavón genistein podlieha účinnej enterohepatálnej cirkulácii. Genistein a jeho hlavný metabolit, genistein 7-O- β -glukuronid, sú nielen dobre absorbované z čriev, ale sú účinne extrahované z portálnej krvi do pečene a vylučované do žlči. Zistilo sa, že počiatková absorpcia genisteinu začína už v duodene, kde dochádza ku pasívnej absorpcii. To, že sa vyskytuje veľká časť dávky genisteinu v žlči, môže byť čiastočne kvôli jeho hydrofóbnej povahe. Dôsledky účinného enterohepatálneho obehu genisteinu a jeho metabolitov sú nasledovné: 1) genistein sa môže akumulovať v enterohepatálnom obvode a 2) môže byť vylučovaný s dlhým polčasom. V tomto ohľade sa genistein môže správať ako protinádorové liečivo 5-fluóruracil; po počiatkovom rýchlom renálnom vylučovaní jeho metabolitu 2-fluór- β -alanín (FBAL), táto látka vykazuje dlhší polčas v dôsledku konjugácii FBAL pomocou žlčových kyselín (Sfakianos, a ďalší, 1997).

Biotransformácia hrá kľúčovú úlohu v regulácii biologickej aktivity izoflavonoidov – fytoestrogénov, keďže II fáza biotransformácie, ako je napríklad glukuronidácia a sulfatácia, vytvára mechanizmy pre inaktivovanie a vylučovanie

fytoestrogénov. Glukuronid a sulfát genisteinu boli uvedené ako hlavné metabolity v plazme. Enzýmy, ktoré sprostredkujú prvú biotransformáciu u potkanov sú nasýtené pri vysokých koncentráciách substrátu, presnejšie po dávke 40 mg genisteinu/kg/deň. To znamená, že existuje možnosť, že ako sa príjem izoflavonoidov zvyšuje, napríklad u spotrebiteľov stravy bohatej na sójové produkty či doplnky stravy, podiel systémových nekonjugovaných izoflavonoidov, ktoré sú dostupné pre tkanivá z plazmy sa zvýši neprimerane. Iné prírodné zložky potravín, ako sú flavonoidy, môžu kompetitívne inhibovať enzýmy, ktoré sú zapojené do prvého kroku biotransformácie genisteinu a tým nepriamo zvýšiť systémovú biologickú dostupnosť a tiež biologickú aktivitu nekonjugovaných izoflavonoidov (Coldham, a ďalší, 2002).

3.1.3.1.2 FARMAKODYNAMIKA GENISTEINU

Cytochróm P450 (CYP) 1A1 zohráva kľúčovú úlohu v estrogénovom metabolizme, katalyzujúci premenu 17- β -estradiolu na hydroxylovaný estrogén. Ukázalo sa, že expozícia estrogénom je priamo spojená s rizikom rozvoja rakoviny prsníka. Predĺžená alebo zvýšená expozícia estrogénu je spájaná so zvýšeným rizikom vzniku rakoviny prsníka, keďže zníženie expozície je považované za ochranný krok. Preto zmeny v aktivite CYP 1A1 by mohli vierohodne viesť k zmene hladiny estrogénu a konečnom dôsledku, by mohlo ovplyvniť riziko rakoviny prsníka. Expresia CYP 1A1 bola zistená v rakovinovom prsnom tkanive a môže byť indukovaná v bunčných líniách odvodených od tkanív ľudských prsníkov.

V štúdií zameranej práve na úlohu genisteinu v proliferácii buniek rakoviny prsníka a aktivitu CYP 1A1, bolo zistené, že genistein inhibuje rast estrogén-receptor pozitívnej MCF-7 a estrogén-receptor negatívnej MDA-MB-231 bunky. Genistein vykazoval podobný rastovo inhibičný model u oboch prípadoch, MCF-7 a MDA-MB-231 buniek, čo svedčí o neprítomnosti estrogénového receptora, ktorý môže vyvolať citlivosť na genistein. Zistilo sa tiež, že inhibícia CYP 1A1 je závislá od koncentrácie genisteinu. CYP 1A1 je primárny katalyzátor v hydroxylácii 17- β -estradiolu. Vystavenie estrogénu je známy rizikový faktor pre človeka pre vznik rakoviny prsníka. Estrogén podporuje mitotickú aktivitu v epiteli prsníka, čím sa zvyšuje riziko rakoviny. Okrem toho bolo poukázané na to, že metabolity estrogénu môžu tvoriť adukty na DNA, čo vedie

k DNA mutáciám. Koncentrácia aktívnych estrogénových metabolitov v prsných tkanivách je rozhodujúca pre ich biologickú aktivitu. Vplyv CYP enzýmového systému na biologický účinok estrogénu robí tento enzým prediktorom vývoja rakoviny prsníka a tým pádom aj potenciálnym cieľom pre chemoprevenu (Shon, a ďalší, 2006).

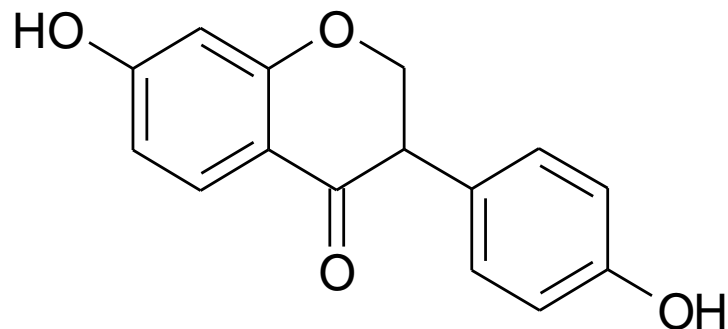
3.1.3.1.3 GENISTEIN A RAKOVINA

Výskyt rakoviny prsníka sa zvyšuje s vekom a ~ 75% pacientiek s karcinómom prsníka je vo veku nad 50 rokov. Väčšina týchto prípadov rakoviny je závislých na estrogéne a je pravdepodobné, že mnohé z týchto žien sú liečené tamoxifénom, antiestrogénom. Počas obdobia perimenopauzy a postmenopauzy, sa u mnoho žien môže vyskytnúť jeden, alebo viac príznakov ako sú návaly tepla, depresie, zmeny nálady, poruchy spánku, suchosť pošvy či bolesť kĺbov a to predovšetkým z dôvodu poklesu estrogénu a hladiny progesterónu. Vie sa, že terapia tamoxifénom môže tieto symptómy ešte zhoršovať. Hormonálna liečba môže zmierniť niektoré z týchto príznakov. Avšak z dôvodu obáv o zvýšené riziko rakoviny prsníka, väčšina onkológov neodporúča hormonálnu liečbu. Ako alternatívu k tejto liečbe, sa môžu niektoré ženy po menopauze sami liečiť doplnkami stravy, ktoré obsahujú fytoestrogény bez toho, aby to ich lekár vedel a môžu pôsobiť ako agonisti estrogénových receptorov α a β . Estrogénový receptor α je prevažne exprimovaný v bunkách MCF-7 a v ľudských nádoroch prsníka (Ju, a ďalší, 2002) (Borrás, a ďalší, 2006). Konzumácia stravy bohatej na sójové produkty bola spájaná so zmenou v reprodukčných funkciách u žien a zníženie hladiny estrogénu v sére. Štúdie na zvieratách ukázali, že dlhodobé a intenzívne požívanie potravinových fytoestrogénov môže vyvolať skorší nástup nepravidelného menštruačného cyklu súvisiaci s vekom u žien, maskulinizáciu, či zníženie vylučovania luteinizačného hormónu (Foster, a ďalší, 2002).

Je dôležité poznamenať, že iba aglykón genisteinu má estrogénne účinky (Chang, a ďalší, 2000). Doplnková liečba genisteinom produkuje dostatočné koncentrácie aglykónu genisteinu v nádorovom tkanive, aby premohla inhibičné účinky tamoxifénu a jeho metabolitov v MCF-7 bunkách na rast nádorových bunkách. Na druhej strane je genistein schopný znižovať hladinu estradiolu v plazme (Ju, a ďalší, 2002) (Borrás, a ďalší, 2006).

3.1.3.2 DAIDZEIN

Daidzein je izoflavónový aglykón a je produkovaný v tele z rastlinných izoflavónov. Hlavným zdrojom daidzeínu z potravy je biologicky aktívny glykozid daidzin. Fermentácia alebo trávenie sójových bôbov, alebo sójových výrobkov vedie k uvoľneniu molekuly cukru z izoflavónového glykozidu, daidzinu, takže vznikne isoflavonový aglykón, daidzein.

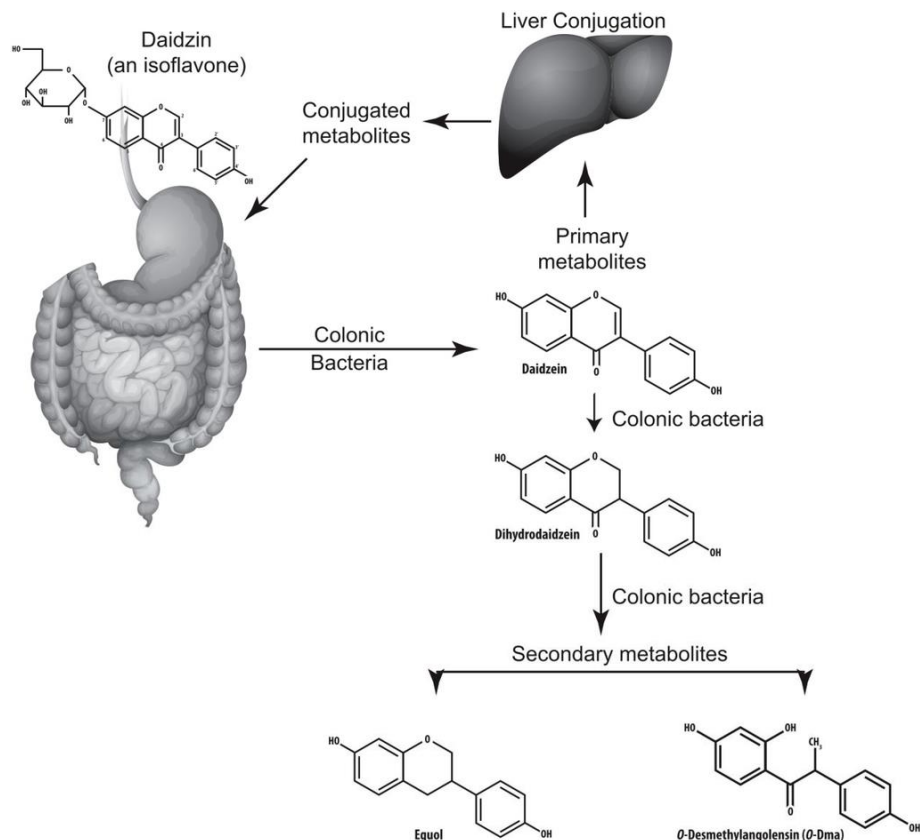


Obr. 4 Štruktúra daidzeinu

3.1.3.2.1 FARMAKOKINETIKA DAIDZEINU

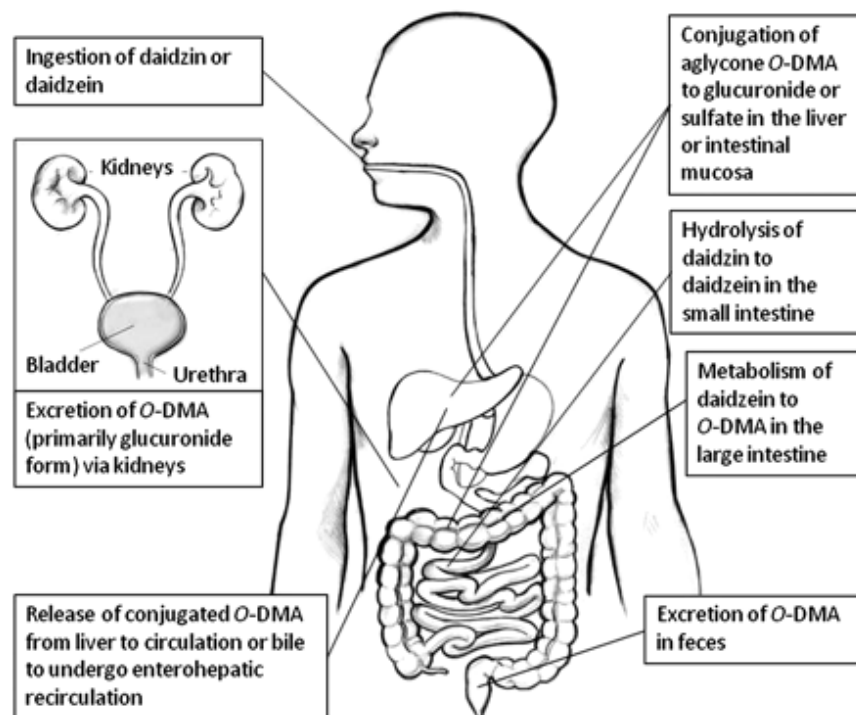
V poslednom desaťročí došlo k značnému záujmu o príjem fytoestrogénov vo vzťahu k ľudskému zdraviu. Daidzein je metabolizovaný na equol a O-desmetylangolensin (O-DMA), črevnými baktériami. Štúdie *in vitro* a na zvieratách ukázali, že equol a O-DMA sú biologicky viac aktívne, než je ich prekursor daidzeinu. Zaujímavé je, že existujú podstatné interindividuálne rozdiely v metabolizme daidzeinu; po konzumácii sóje alebo daidzeinu, približne 30% – 50% ľudskej populácie produkujú equol a asi 80% – 90% O-desmetylangolenzín. Pozorovacie a intervenčné štúdie u ľudí ukázali, že schopnosť produkovať equol a O-DMA môže byť spojená so zníženým rizikom niektorých chorôb, vrátane rakoviny prsníka a prostaty (Atkinson, a ďalší, 2005).

Na rozdiel od genisteínu, daidzein neinhibuje proteín tyrozínkinázu. Vo vysokých koncentráciách daidzeín (> 100 μm) inhibuje rast buniek MCF-7, nižšie dávky (1 μm) stimulujú rast buniek (Lamartiniere, a ďalší, 2002).



Obr. 5 Metabolizmus daidzeinu. Prevzaté z (Rafii, 2015)

K expozícii daidzeinu dochádza predovšetkým prostredníctvom stravy; daidzin z potravy sa nachádza vo veľkom množstve v nefermentovaných sójových potravinách a daidzein sa nachádza vo veľkom množstve vo fermentovaných sójových výrobkoch. Malé percento jedincov môže tiež konzumovať formononetin, predchodcu daidzeinu, z doplnkov stravy, ktoré obsahujú červenú ďateľinu. Daidzin môže byť hydrolyzovaný β -glykosidázami v črevnom trakte a dôkazy podporujú, že sa tento dej môže začať už v tenkom čreve. Črevné baktérie v hrubom čreve môžu metabolizovať daidzein na dihydrodaidzein, ktorý potom môže podstúpiť štiepenie kruhu inými črevnými baktériami za vzniku O-DMA; tvorba O-DMA nebola pozorovaná v ileu a predpokladá sa, že sa potrebné baktérie na jeho vznik vyskytujú len v hrubom čreve (Frankenfeld, 2011).



Obr. 6 Cesta daidzeinu v tele pri premene na O-DMA.
Prevzaté z (Frankenfeld, 2011)

3.1.3.2.2 FARMAKODYNAMIKA DAIDZEINU

METABOLIT O-DMA

O-DMA je menej štruktúrne podobný 17- β -estradiolu ako jeho materská zlúčenina, daidzein; takže môže vykazovať rôzne biologické účinky než daidzein. Dôkazy zo štúdií *in vitro* naznačujú, že O-DMA má niekoľko biologických účinkov na nádorové ochorenia. Na druhej strane výsledky ľudských metabolických štúdií a pozorovacích štúdií rizika ochorenia naznačujú, že tieto účinky nemusia byť fyziologicky relevantné *in vivo*, vzhľadom k objemu a tvaru (predovšetkým glukuronidu) cirkulujúceho O-DMA. Taktiež príslušné baktérie podieľajúce sa na metabolizme týchto látok, môžu mať odlišnú fyziologickú úlohu. Vylučovanie O-DMA močom u ľudí je markerom prítomnosti črevných baktérií schopných rozštiepiť C-kruh.

Dôkazy z *in vitro* štúdií podporujú názory, že za vznik O-DMA sú zodpovedné iné baktérie, než za vznik equolu. Okrem toho sa zistilo, že fenotyp k premene O-DMA je nezávislý od prítomnosti fenotypu k vzniku equolu, takže niektorí ľudia môžu tvoriť iba jednu z týchto látok, alebo žiadnu, či oboje. Prítomnosť oboch fenotypov môže

ovplyvniť množstvo jednotlivých látok cirkulujúcich v obehu. V malej štúdií sa zistilo, že ak je tu schopnosť premieňať daidzein aj na equol a aj na O-DMA, tak preferovaným výsledkom je premena daidzeinu na equol.

Účinky O-DMA na rast a integritu *in vitro* nádorových buniek boli študované na niekoľkých bunkových líniiach, vrátane MCF-7 (ľudský karcinóm prsníka) a MDA-MB-231 (ľudský karcinóm prsníka). Zistilo sa, že glukuronidová forma inhibuje rast MCF-7, ale oveľa slabšie než tomu bolo vo forme aglykónu.

Klasifikácia osoby za producenta O-DMA, je vykonávaná na základe prítomnosti O-DMA v moči, krvi, alebo prítomností príslušných baktérií kultivovaných zo stolice. Zistilo sa, že približne 95% detí vo veku okolo 10 rokov, je schopných produkovať O-DMA.

Celkovo tieto pozorovania naznačujú, že cirkulujúce koncentrácie O-DMA nemusia predstavovať vo fyziologických koncentráciách riziko ochorenia. Aj keď je človek schopný tvorby O-DMA, zistené koncentrácie tejto látky, boli vždy veľmi nízke (Frankenfeld, 2011).

O-DMA A OSTEOPORÓZA

Len málo štúdií bolo vykonaných zabývajúce sa kostným metabolizmom s ohľadom na O-DMA. Keďže je estrogénová aktivita O-DMA menšia než equolu, účinky O-DMA na kosti a metabolizmus lipidov u myši po vybratí vaječníkov, spolu s účinkami na bunky osteoklastov boli slabšie než equolu (Uehara, 2013).

METABOLIT EQUOL

Až okolo 60% populácie z Ázie je schopných produkovať equol v porovnaní s 30% v západných populáciách. Tento fakt je spájaný s nižším výskytom ochorení závislých od hormónov u tejto populácie, ktorá tiež spotrebuje viac izoflavonoidnej stravy prostredníctvom stravy na báze sóje (Rafii, 2015).

Producenti equolu boli definovaný ako tie subjekty, ktoré vylučujú viac ako 10 ng/ml equolu vo vzorke moču 24 hodín po konzumácii dávky 50 mg izoflavonoidov na večeru (Jackson, a ďalší, 2011).

Štúdie ukázali, že equol mal viac estrogénových účinkov na adenokarcinóm ľudských buniek ako daidzein. Bolo preukázané, že equol má vyššiu antioxidantnú aktivitu ako daidzein. Equol, či už produkovaný v mikrobiálnej flóre, alebo priamo podávaný samiciam myši, má tiež anti-estrogénové účinky v reprodukčnom tkanive. Podávanie equolu a aj samotný endogénne produkovaný equol znižoval expresiu receptora progesterónu u myšiach v bunkách vaginálneho epitelu, čo ukazuje, že equol znižuje reakcie estrogén-dependentných tkanív (Rafii, 2015).

Faktory, ako sú stravovacie návyky, môžu modulovať zloženie a aktivitu črevných mikroorganizmov, teda ovplyvňujú tvorbu equolu, ktorý má výraznú biologickú aktivitu v porovnaní s daidzeinom a genisteinom. Viaže sa na estrogénové receptory α a β s väčšou afinitou, než daidzein a má antiandrogénne vlastnosti tým, že sa naviaže na dihydrotestosterón. Črevná mikroflóra je schopná produkovať len S(-)-enantiomér equolu (S-equol), zatiaľ čo komerčne dostupná syntetická forma equolu je racemická R/S-(\pm) zmes (Dewi, a ďalší, 2012).

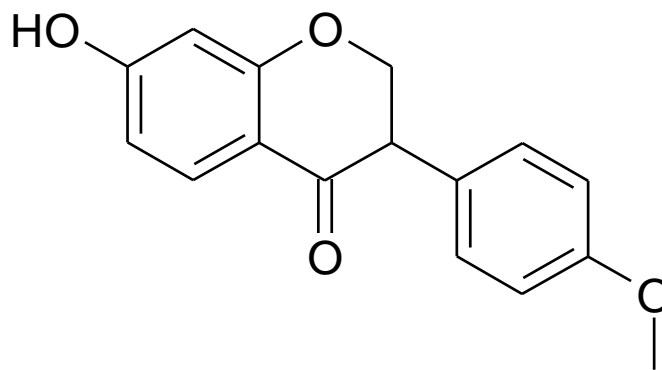
U zdravých ľudí sa racemát equolu líši od jednotlivých enantiomérov v jeho biologickej dostupnosti a farmakokinetike, čo naznačuje, že endogénne produkovaný a exogénny equol môžu mať odlišnú biologickú účinnosť. Štúdie skúmajúce účinky sójových izoflavonoidov a ich metabolitov na reprodukčný systém hlási nejednoznačné, rozporuplné výsledky. Výsledky podporujú myšlienku, že izoflavonoidy nemajú estrogénové účinky na reprodukčné ústrojenstvo samcov alebo zdravých myšíc samíc pri podávaní v potrave, v dávkach odpovedajúcich dávkam pre ľudí. Tieto výsledky podporujú myšlienku, že equol, buď racemický, alebo prirodzený, nevyvoláva estrogénové účinky u myši pri fyziologických koncentráciách (< 3000 nmol/l) (Dewi, a ďalší, 2012).

Podobne ako SERM (selektívne modulátory estrogénových receptorov), equol inhibuje stratu kostnej hmoty zrejme bez estrogénovej aktivity v reprodukčných orgánoch ovariectomovaných myši. Pozorovala sa aj vyššia aktivita (S) -equolu na krehkosť femuru (Uehara, 2013).

3.1.3.3 FORMONONETIN

Fytoestrogénový izoflavonoid formononetin je obsiahnutý, na rozdiel od sójových izoflavonoidov genisteinu a daidzeinu, z veľkej časti hlavne v červenej d'ateline. Jeho metabolity sú hlavne daidzein a následne equol s O-DMA (Tolleson, a ďalší, 2002).

Účinky formononetinu zahŕňajú reguláciu steroidných receptorov, ako androgénových, tak estrogénových, inhibíciu bunkovej proliferácie a DNA topoizomerázy II a propagáciu apoptózy rakovinových buniek (Liu, a ďalší, 2014).



Obr. 7 Štruktúra formononetinu

3.1.3.3.1 FARMAKOKINETIKA FORMONONETINU

Metabolizmus formononetinu zvyčajne zahŕňa O-demetyláciu, kde výsledný produkt je daidzein. Tento dej je sprostredkovaný cytochrómom CYP1A2, ktorý je primárna pečenná izoforma CYP450. Zistilo sa, že niektoré flavonoidy môžu byť inhibítormi CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1. Dohromady tieto pozorovania naznačujú, že konzumácia ovocia a zeleniny, ktoré obsahujú niektoré flavonoidy (napr. diosmetin, naringenin, hesperetin, eriodiktyol, alebo homoeriodiktyol) v rovnakom čase ako doplnky stravy, či potraviny, ktoré obsahujú biochanín A alebo formononetin, môžu inhibovať CYP1A enzýmy v črevách a pečeni a zvýšiť koncentráciu biochanínu A alebo formononetinu v krvi (Roberts, a ďalší, 2004).

Čo sa týka jeho biodostupnosti, tak bola vykonaná štúdia, kde bol na začiatku podávaný formononetin. Detekovaný daidzein spolu s jeho metabolitom equolom a proestrogenovým izoflavonoidom formononetinom v plazme a moči u dojnic kŕmených

normálnou stravou obsahujúcou izoflavonoidy, demonštruje ich biologickú dostupnosť prostredníctvom stravy (Tolleson, a ďalší, 2002). Takto prijaté fytoestrogény sú hydrolyzované črevnými baktériami. Formononetin sa metabolizuje na daidzein a ten potom na equol. Produkty metabolizmu izoflavonoidov môžu byť vylučované z tela či absorbované (Park, a ďalší, 2005). Formononein sa absorbuje dobre vo všetkých častiach čreva. Absorpcia bola sústredená prevažne do *intestinum tenue*, bez špecifických absorpčných miest. To ukazuje, že absorpčný mechanizmus formononetinu v tráviacom traktu u potkana prebieha pasívnou difúziou, bez sprostredkovanej absorpcie (Liu, a ďalší, 2013). Ak sa vstrebáva, podstupuje následnú konjugáciu v pečeni najmä s kyselinou glukurónovou a je vylučovaný močom, alebo žlčou (Park, a ďalší, 2005).

3.1.3.3.2 PROTIRAKOVINOVÉ ÚČINKY FORMONONETINU

V poslednej dobe je kladený značný dôraz na identifikáciu nových protinádorových činidiel z prírodných zdrojov. Formononetin má široké spektrum farmakologických účinkov, ako je napríklad inhibícia proliferácie buniek, progresia bunkového cyklu a indukcia apoptózy v rôznych nádorových bunkových líniiach. Bolo preukázané, že formononetin výrazne inhibuje migračné a invazívne schopnosti buniek rakoviny prsníka *in vitro* v koncentráciách, ktoré sú netoxické na iné telové bunky. Taktiež inhibuje bunkovú metastázu rakoviny prsníka a dlhšiu dobu prežitia zvierat *in vivo*. Toto zistenie naznačuje, že formononetin môže byť potenciálne užitočný ako anti-invazívny prostriedok na rakovinu prsníka (Zhou, a ďalší, 2014).

Apoptóza má dôležitú úlohu v liečbe rakoviny a je aj obľúbeným cieľom mnohých liečebných stratégií. Formononetin významne indukuje pokles životaschopnosti buniek HeLa (nádorové bunky krčka maternice) v závislosti na dávke. Zistilo sa, že formononetin zvýšil množstvo odumretých buniek v bunkách HeLa. Ako formononetin inhiboval životaschopnosť buniek HeLa, produkcia ATP a celková spotreba kyslíka bola tiež významne znížená. Táto mitochondriálna dysfunkcia vyvolaná formononetinom môže byť cieľom pre účinok na apoptózu nádorových buniek (Jin, a ďalší, 2014).

3.2 VYBRANÉ ENZÝMY A ICH SUBSTRÁTY

3.2.1 ALDEHYDREDUKTÁZA AKR1A1

Aldo-keto reduktázy (AKR) sú enzýmy podieľajúce sa na oxidoredukčných reakciách na prírodných a umelých substrátoch (Hyndmana, a ďalší, 2003). Nachádzajú sa v eukaryotických aj prokaryotických organizmoch a sú schopné metabolizovať široký rozsah substrátov, vrátane alifatických aldehydov, monosacharidov, steroidov, prostaglandínov a xenobiotík (Jez, a ďalší, 1997). Celá skupina enzýmov AKR obsahuje až okolo 140 proteínov, ktoré sú distribuované v 15 rodinách (AKR1-AKR15). Najväčšou rodinou je skupina AKR1, ktorá obsahuje aldozoreduktázy, aldehydoreduktázy, hydroxysteroidné dehydrogenázy a steroidné 5 β -reduktázy. Katalyzujú redukciu aldehydov a ketónov, monosacharidov, ketosteroidov a prostaglandínov. Sú tiež katalyzátormi oxidácie hydroxysteroidov a trans-dihydrodiolov polycyklických aromatických uhľovodíkov. Menej je známe o ich liekových substrátoch.

AKR1A1 je cytozolický proteín exprimovaný v obličkách, pečeni, kostnej dreni, srdci, kostrových svaloch, pankrease, prostate a pľúcach (Hyndmana, a ďalší, 2003). AKR sú prevažne monoméne, rozpustné, NADPH závislé oxidoreduktázy podieľajúce sa na redukcii aldehydov a ketónov na primárne, respektíve sekundárne alkoholy. Preto sú AKR enzýmy klasifikované ako metabolizujúce enzýmy vo fáze I, ktoré premieňajú karbonylové skupiny na alkoholy kvôli zvýšeniu ich rozpustnosti vo vode a urýchlení odstránenia z tela cez reakcie konjugácie (Skálová, a ďalší, 2013).

Okrem iných látok, metabolizujú aj antracyklínové antibiotiká, ktoré sa používajú v klinickej praxi ako protinádorové liečivá pri liečbe leukémií, lymfómov, karcinómov a sarkómov. Dva antracyklíny, ktoré sa bežne používajú pri liečbe rakoviny je doxorubicín (DOX) a daunorubicín (DAUN). DOX prispel k zlepšeniu dĺžky života nespočetných pacientov postihnutých rakovinou a to najmä pri liečení agresívneho lymfómu, Hodgkinovej choroby, detských solídnych nádorov, karcinómu mäkkých tkanív a karcinómu prsníka, zatiaľ čo DAUN bol podávaný u pacientov podstupujúcich liečbu akútnej myeloidnej a akútnej lymfoblastickej leukémie.

Ukázalo sa, že DOX je slabým substrátom pre AKR1A1, na rozdiel od DAUN, ktorý sa ľahko metabolizuje v príslušný C-13 metabolit. Toto je zaujímavé zistenie, pretože chemické štruktúry DOX a DAUN sú veľmi podobné. Táto vyššia metabolická

aktivita pre DAUN v porovnaní s DOX je v súlade s tým, čo bolo pozorované *in vitro* na tvorbe alkoholových metabolitov v cytozolových frakciách pripravených z ľudského srdcového tkaniva. Zdá sa, že AKR1A1 má vysokú špecificitu pre DAUN než DOX, aj keď sú tieto antracyklíny štruktúrne podobné.

Redukcia karbonylovej skupiny AKR enzýmom sa predpokladá, že zahŕňa spoluprácu štyroch aminokyselín (tyrozín, lyzín, kyselina asparágová, a histidín), ktoré tvoria katalytickú štvoricu. Tieto štyri aminokyseliny a ich polohy sú zachované v úplnej väčšine jednotlivých reductáz v tejto enzýmovej rodine. V prípade AKR1A1 sa tieto aminokyseliny nachádzajú v pozíciách: kyselina asparágová-45, tyrozín-50, lyzín-85 a histidín-113. Stačí len malá zmena v tomto zložení a už môže jeho úloha klesnúť až o 50%, kvôli zmenám v afinite substrátov. V danom prípade to znamená, že sa DOX a DAUN nedostatočne metabolizujú na ich príslušné alkoholy, tvoria sa reaktívne intermetabolity, a môže dôjsť ku kardiotoxicite. Existuje niekoľko navrhovaných mechanizmov kardiotoxicity vyvolanej antracyklínmi, ktoré zahŕňajú bunkovú toxicitu z metabolitov, selektívnu inhibíciu génovej expície pre proteíny asociované s kontrakciou myokardu a inhibíciu aktivity topoizomerázy II (Bains, a ďalší, 2008).

Medzi inhibítory AKR1A1 patrí napríklad fenobarbital (Kaiserová, a ďalší, 2005). Ďalej bolo preukázané, že atorvastatín znižuje expresiu tohto enzýmu až o 20% (Ruf, a ďalší, 2009) (Pépin, a ďalší, 2013). Z prírodných látok majúce inhibičnú aktivitu sú niektoré flavonoidy (napr. diosmetin, naringenín, hesperetin, eriodiktyol, alebo homoeriodiktyol) (Roberts, a ďalší, 2004).

3.2.2 ALDOKETOREDUKTÁZY AKR1C

Enzýmy AKR1C katalyzujú oxidoredukčnú premenu rôznych substrátov, vykazujú rôznu citlivosť k inhibítorm a rozdielnu tkáňovú distribúciu. Všetky štyri enzýmy sa vyskytujú v pečňovom tkanive, AKR1C4 je iba v pečeni, 1C2 a 1C3 sú aj v prsných tkanivách a prostate. Všetky tieto enzýmy majú zásadnú rolu v metabolizme androgénov a estrogénov a podieľajú sa tak na vzniku a progresii androgen- a estrogen-dependentných onemocnení (napr. karcinóm prostaty, benigná hyperplázia prostaty, karcinóm prsných tkanív) (Skálová, a ďalší, 2013).

AKR1C1 metabolizuje progesterón na jeho inaktívny metabolit 20 α -hydroxyprogesterónu. Udržiavanie dostatočnej cirkulujúcej hladiny progesterónu je

nevyhnutné, aby sa zabránilo predčasnému pôrodu. Salicyláty a ich deriváty sú hlavné inhibítory tohto enzýmu.

AKR1C2 sa podieľa na metabolizme 5α -dihydrotestosterónu za vzniku neaktívneho androgénu 5α -androstán- $3\alpha,17\beta$ -diolu. Inhibítory AKR1C2 sa tak snažia vysporiadať s nedostatočnosťou androgénov. Doteraz neboli žiadne malé molekuly identifikované ako AKR1C aktivátory, ale látky, ktoré by mohli uľahčiť väzbu a uvoľnenie NADP (H), by mohli plniť túto úlohu.

AKR1C3 je známa ako 17β -hydroxysteroid dehydrogenáza (17β -HSD) a prostaglandín (PG) $F2\alpha$ syntáza. 17β -HSD sa podieľa na redukcii Δ^4 -androsten- $3,17$ -diónu na testosterón, redukcii 5α -androstán- $3,17$ -diónu na 5α -dihydrotestosterón a redukcii estrónu na 17β -estradiol. Inhibítory pre 17β -HSD reakcie sú vyhľadávané kvôli pokročilému karcinómu prostaty a karcinómu prsníka, kde znižovanie nadmerných hladín enzýmu môže poskytnúť pomocnú ruku pre iné hormonálne terapie. $PGF2\alpha$ syntáza tiež redukuje PGH₂ na $PGF2\alpha$ a PGD₂ na 11β - $PGF2\alpha$. Inhibítory pre AKR1C3 sú indometacín a 6-medroxyprogesterónacetát, táto látka bola použitá na inhibíciu AKR1C3 na liečbu akútnej myeloidnej leukémie (Penning, 2014).

Nadmerná expresia AKR1C3 v rôznych nádorových ochoreniach môže byť zodpovedná za zlyhanie liečby rakoviny chemoterapeutikami s karbonylovou skupinou v molekule.

AKR1C4 je špecifická reductáza 3-ketosteroidov pečene a podieľa sa na klírens steroidných hormónov z obehu a biosyntéze žlčových kyselín (Novotna, a ďalší, 2008).

Okrem endogénnych steroidných látok sú AKR1C1, 1C2 a 1C4 schopné katalyzovať redukciiu karbonylovej skupiny u nesteroidnej xenobiotickej zlúčeniny oracín, nové potenciálne protinádorové chemoterapeutikum. Najúčinnjší enzým v premene oracínu na jeho redukovanú formu je AKR1C1. Redukcia karbonylovej skupiny oracínu je detoxikačná reakcie, ktorá eliminuje terapeutickú účinnosť tohto lieku. Súčasné podávanie jednotlivých inhibítorov je žiadúce, pretože by sa zabránilo rezistencii voči danému lieku (Wsol, a ďalší, 2007).

Okrem toho AKR1C3 tiež sprostredkováva redukciiu C13 karbonylu doxorubicínu na neaktívny hydroxymetabolit doxorubicinol. Považuje sa, že doxorubicinol je zodpovedný za kardiomyopatiu pozorovanú počas liečby doxorubicínom. Vzhľadom k tomu, že je AKR1C3 nadmerne exprimovaný pri hormonálne závislých malignít, ako sú rakoviny prostaty a prsníka, súčasné podávanie inhibítorov AKR1C3 môže zvýšiť

účinnosť chemoterapeutických látok oracínu a doxorubicínu a zároveň zníži riziko kardiomyopatie po podaní doxorubicínu (Novotna, a ďalší, 2008).

3.2.3 KARBONYLREDUKTÁZA CBR

Karbonylreduktáza (CBR) patrí do triedy oxidoreduktáz, ktoré sú súčasťou rodiny enzýmov s krátkym reťazcom dehydrogenáz/reduktázy (SDR). Sú všadeprítomné v prírode a katalyzujú redukciu veľkého množstva biologicky a farmakologicky aktívnych látok, vrátane rôznych endogénnych a xenobiotických karbonylových zlúčenín. CBR bola popísaná v ľudských tkanivách, vrátane pečene, srdca, pľúc, obličiek, mozgu, semenníkov, vaječníkov a nadobličiek.

Všeobecne platí, že CBR sú enzýmy s nízkou molekulovou hmotnosťou, monoméne, cytozolové a NADPH-dependentné, ktoré redukujú aldehydové a keto skupiny prostaglandínov, steroidov, pterínov, biogénnych amínov a chinónov odvodených od polycyklických aromatických uhlíkov. Mnoho liekov s keto skupinou a alifatickým keto postranným reťazcom, ako napríklad v molekule antracyklínových protinádorových liečiv, DAUN a DOX, sú tiež redukované. Redukcia karbonylu je hlavnou reakciou a v mnohých prípadoch je reakcia nevratná. Avšak v niektorých reakciách sa môže vyskytnúť oxidácia sekundárnych alkoholov a hydrochinónov v prípade NADP^+ ako kofaktoru.

CBR metabolizuje niektoré rovnaké substráty ako iné karbonylové redukčné enzýmy, ako sú napríklad aldehydoreduktázy a alkoholdehydrogenázy. CBR je možno odlíšiť od aldehydových reduktáz a alkoholdehydrogenáz pomocou použitia aromatických ketónov ako substráty a pomocou flavonoidov ako inhibítory, napríklad rutín, kvercetín alebo kvercitrín. Iné inhibítory CBR sú indometacín, furosemid a disulfiram. Práve použitie aromatických ketónov a chinónov je typické pre CBR (Forrest, a ďalší, 2000) (Szotáková, a ďalší, 2013).

3.2.4 GLUTATION-S-TRANSFERÁZY (GST)

GST enzýmy hrajú kľúčovú úlohu vo fáze II detoxikácie mnohých cudzorodých látok. Z tohto dôvodu ich inhibícia môže významne ovplyvňovať metabolizmus a biologické účinky určité liekov, priemyselných produktov a environmentálnych kontaminantov (Szotáková, a ďalší, 2013). Tieto enzýmy katalyzujú konjugáciu elektrofilných xenobiotík (napr. liekov, toxínov a karcinogénov) s endogénnym tripeptidovým glutatiómom (GSH), za účelom ich deaktivácie a zvýšenia ich hydrofility (Boušová, a ďalší, 2013).

Niekoľko alkylačných činidiel a ich metabolity sú substrátmi pre GST. Patrí medzi ne chlorambucil, mechloreтамín, cyklofosfamid, akroleín, 1,3-bis (2-chlóretyl) -1 nitrosomočovina. Spoločné pre tieto substráty GST je ich elektrofilná povaha ich aktívnych cytotoxických skupín. Štúdie zamerané na konjugačné reakcie liečivo-GSH ukázali, že elektrofilná zlúčenina reaguje s tiolovou skupinou redukovaného glutatiómu spontánnym spôsobom rovnako dobre ako v prípade katalyticky konjugovanej reakcie pomocou GST.

Rezistencia na protinádorovú liečbu zvyčajne vzniká po nadmernom exprimovaní enzýmu. Preto vývoj inhibítorov dáva možnosť zvýšenia účinnosti protinádorovej liečby. V prípade alkylačných činidiel, odolnosť liečby bola pripočítaná viacerým faktorom, ako napríklad zníženie bunkovej absorpcii liečiva, zmenené hladiny GSH a zvýšenie hladiny GST. Existuje viacero kompetitívnych aj nekompetitívnych inhibítorov, ale mnohé látky obmedzuje ich toxicita či karcinogenita v ich použití ako humánne liečivo. Medzi inhibítory GST patrí napríklad klofibrát, analógy GSH, indometacín, alebo sulfasalazín (Schultz, a ďalší, 1997), bilirubín, žľčové kyseliny (Skálová, a ďalší, 2013).

Z prírodných látok sa medzi GST inhibítory radia niektoré flavonoidy, ako napríklad genistein, kvercetín, kampferol a kurkumín (Hayeshi, a ďalší, 2007).

Novšia látka, 8-metoxypsoralen, sa preukázala ako dobrý inhibítor aktivity GST, nie len v súvislosti s rakovinovými bunkami, ale jej výhodou je, že má tiež využitie v terapii infekčných ochorení, pretože sa zvýšená aktivita GST prejavila aj u patogénnych baktérii (de Oliveira, a ďalší, 2014).

4 CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE

Cieľmi tejto práce bolo zistiť, či prírodné látky z rady izoflavonoidov ovplyvňujú u prsných nádorových línií aktivitu biotransformačných enzýmov metabolizujúcich cytostatiká a teda či môžu mať potencionálny vplyv na zmenu účinnosti cytostatickej liečby. Stanovené ciele:

1. Zvládnutie práce s bunkami v laminárnom boxe: pasážovanie, sterilná práca s bunkami
2. Ovplyvnenie prsných nádorových línií MCF-7 a MDA-MB-231 izoflavonoidami (genistein, daidzein, formononetin)
3. Príprava subcelulárnych frakcií buniek
4. Stanovenie aktivít vybraných biotransformačných enzýmov u kontrolnej skupiny a tak isto aj u skupín ovplyvnených izoflavonoidami
5. Porovnanie enzýmových aktivít medzi jednotlivými skupinami a zhodnotení vplyvu izoflavonoidov na tieto aktivity

5 METODICKÁ ČASŤ

5.1 PRÍSTROJOVÉ A MANIPULAČNÉ VYBAVENIE

- 8-kanálová pipeta (Eppendorf, Nemecko)
- 8-kanálová elektronická pipeta (Eppendorf, Nemecko)
- analytické váhy Sartorius CP2225D (Sartorius AG, Nemecko)
- automatické pipety rôzneho rozsahu (Eppendorf, Nemecko)
- centrifúga Heraeus, rotor #3335 (ThermoFisher Scientific, USA)
- čítačka mikrotitračných doštičiek Tecan Infinite M 200 PRO (Tecan Group Ltd., Švajčiarsko)
- dosková trepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Nemecko)
- hlboko mraziaci box Jouan (Thermo Scientific, USA)
- homogenizátor Potter-Elvehjem
- laboratórna trepačka vortex IKA MS3 basic (IKA, Nemecko)
- pipetíky SwiftPet+ (HTL, Poľsko) a Eppendorf (Nemecko)
- termomixér Eppendorf (Nemecko)
- ultracentrifúga Beckman Coulter (USA)
- vodná kúpeľ Maemmert (Maemmert, Nemecko)

- laboratórne sklo (Thermo Fisher Scientific, Česká Republika)
- mikroskúmavky 0,5 ml, 1,5 ml a 2 ml (Eppendorf, Nemecko)
- plastové skúmavky rôzneho objemu (TPP, Švajčiarsko)
- plastové sterilné inkubační nádoby T75 a Petriho misky o priemere 15 cm (TPP, Švajčiarsko)
- serologické sterilné plastové pipety rôzneho objemu (TPP, Švajčiarsko)
- špičky pro automatické pipety rôzneho rozsahu (Eppendorf, Nemecko)

5.2 REAGENCIE A CHEMIKÁLIE

- 4-pyridinkarboxaldehyd (Sigma, Nemecko)
- acenaftenol (Sigma, Nemecko)

- boviné fetálne sérum – teplom inaktivované (Lonza, Belgicko)
- BSA (bovine serum albumin) (Fluka, Česká Republika)
- CDNB (Fluka, Česká Republika)
- daidzein (Sigma, Nemecko)
- dimetylsulfoxid $\geq 99,9\%$ (DMSO) (Sigma, Nemecko)
- DL-glyceraldehyd (BDH)
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) pro SCM (Lonza, Belgicko)
- etanol (Penta, Česká Republika)
- formononetin (Sigma, Nemecko)
- fosfátový pufr (PBS) – tablety (Sigma, Nemecko)
- genistein (Sigma, Nemecko)
- glycerol (Dr. Kulich Pharma, Česká Republika)
- GSH (Sigma, Nemecko)
- K-fosfátový pufr (Penta, Česká Republika)
- menadion (Sigma, Nemecko)
- Na-fosfátový pufr (Penta, Česká Republika)
- NADP⁺ (Merck, Nemecko)
- NADPH (Merck, Česká Republika)
- set pre stanovenie bielkovín s BCA (bicinchonic acid) (Sigma, Nemecko)
- TRIS/HCl pufr (Penta, Česká Republika)
- trypsin a EDTA (Lonza, Belgicko)
- ultračistá voda (vyrobená na prístroji Milli-Q RG, Millipore, Česká Republika)

5.3 PASÁŽOVANIE BUNIEK

Na pokusy sme použili bunkové línie adenokarcinómových buniek – MCF-7 a MDA-MB-231. Bunky sú kultivované v médiu s predpísaným zložením (fetálne bovinné sérum – 10% FBS, 10 mM HEPES a 50 µg/ml gentamycínu) v plastových nádobách. Kultivačnými podmienkami sme sa snažili napodobiť prostredie *in vivo*, preto sme bunky umiestnili v inkubátore pri 37°C v atmosfére 5% CO₂.

Po určitej dobe bunkového rastu a delenia (obvykle po 2 – 3 dňoch) je nutné bunky zpasážovať → rozrušenie medzibunkových kontaktov a kontaktov buniek s kultivačným povrchom pomocou proteázy trypsínu. Počas pasážovania sme vymenili staré médium za nové, časť buniek sme odstránili a zvyšok preniesli do novej kultivačnej nádoby.

Počet pasáží je zaznamenávaný, aby sme vedeli určiť vek bunkovej kultúry.

5.4 OVPLYVNENIE BUNIEK IZOFLAVONOIDMI

Bunky sme nasadili do Petriho misiek a po nárastu na 80% sme ich ovplyvnili roztokmi izoflavonoidov. Na ovplyvnenie buniek sme použili 10mM zásobné roztoky izoflavonoidov genisteinu, daidzeinu a formononetinu v DMSO. Cieľová koncentrácia izoflavonoidov je 10µM. DMSO sa nachádza v médiu o koncentrácii 0,1%,. Rovnaká koncentrácia DMSO bola použitá v kontrolnej skupine.

Na 1 Petriho misku sme použili 20 µl 10 mM roztoku izoflavonoidov a 20 ml média, teda výsledná koncentrácia isoflavonoidov bola 10 µM . Ovplyvnené bunky sme nechali inkubovať po dobu 24, 48 a 72 hodín, od každého izoflavonoidu z každého časového úseku po 3 Petriho misky (misky veľkosti 15 cm na priemer). To isté sme vykonali aj s kontrolnými vzorkami.

5.5 SPRACOVANIE BUNIEK NA SUBCELULÁRNE FRAKCIE

Pred samotným spracovaním bolo treba pripraviť:

1. V laminárnej miestnosti nádobu s ľadom, 0,1 M Na-fosfátovým pufr pH 7,4 a štyri 15 ml flakóny.

2. V chladiacej miestnosti miešačku a miešadielko, kadičky (do ktorých potom prelejeme cytozol, mitochondrie a mikrozómy), eppendorfky v ktorých boli uskladnené vzorky, pipeta 5ml a 1ml a potrebné špičky
3. V miestnosti s centrifúgami vychladené rotory v centrifúgach Heraeus a Beckman, kyvety pripravené do oboch centrifúg → menšie do Heraeusu, s pevným uzáverom do Beckman centrifúgy a nádobu s ľadom na uskladnenie kyviet

Postup spracovania buniek na frakcie:

A. Laminárna miestnosť

1. V laminárnej miestnosti sme vybrali Petriho misky s nainkubovanými bunkami z inkubátoru a položili na tácku s ľadom (misky veľkosti 15cm na priemer).
2. Opláchli sme misky použitím 3-5 ml schladeného PBS pufru na uvoľnenie buniek z misiek, odsávačkou odsali všetok pufir.
3. Pridali sme 2 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru pH 7,4 a zoškrabali obsah škrabkou ku jednému kraju misky a opatrne prepipetovali do 15 ml flakónov uložených v ľade. Zopakovali sme tento postup na všetkých miskách jednotlivých bunkových línií ovplyvnenými rovnakou látkou → 3 misky ovplyvnené genisteinom, 3 misky daidzeinom a 3 misky formononetinom. Ďalšie tri misky boli bez ovplyvnenia izoflavonoidom na kontrolu.
4. Vzorky sme stále udržiavali v ľade a preniesli do chladiacej miestnosti.

B. Chladiaca miestnosť

1. Sonikovaním buniek ultrazvukovou ihlou sme rozrušili štruktúry buniek (dva krát 15 sekúnd na polovičnej intenzite), flakóny je potreba udržiavať stále v ľade.
2. Zhomogenizované bunky v homogenáte sme preliali do centrifugačných kyviet.

C. Centrifugačná miestnosť

1. Prvé stočenie prevedené na centrifuge Heraeus. Kyvety boli umiestnené vždy dve oproti sebe na vyváženie rotora. Stáčali sa 60 minút pri 20000 otáčok pri teplote 4°C. Po ukončení je už viditeľne oddelená peleta (= mitochondrie, potrhané bunečné membrány, väzivo, cievy a jadrá) od supernatantu (= cytozol + mikrosomy).
2. Druhé točenie bolo vykonané na ultracentrifúge Beckman. Odseparovaný supernatant sme preliali do centrifugačných kyviet určených pre danú centrifúgu, uložili sme vždy

dve zaviečkované kyvety oproti sebe na vyváženie rotoru v centrifúge. Spustili sme centrifúgu na 65minút, schladenú na 4°C a 105000 otáčok. Supernatant z tohto točenia odpovedá cytozolu, v pelete sú obsiahnuté mikrozómy.

D. Chladiaca miestnosť

1. Pelety je potreba resuspendovať v 3ml 0,1M Na-fosfátovom pufre pH 7,4 s 20% glycerolom.
2. Cytosol s mikrozómami sme za stáleho miešania na miešačke rozpipetovali do eppendorfiiek po 330 µl a dali zamraziť do hlbokomraziaceho boxu pri -80°C na ďalšie použitie.

5.6 BCA STANOVENIE BIELKOVINY

Metóda stanovovania bielkovín pomocou BCA – bicinchonickej kyseliny, umožňuje detekciu obsahu bielkoviny v biologických vzorkách, za prítomnosti detergentov, solí, chelátorov a sukralózy s bicinchonicou kyselinou a meďnatými iónmi. Spoľahlivosť tejto metódy zvyšuje jej vysoká senzitivita (0,5 µg proteínu) a dlhodobá stabilita reagentov. (Smith, a ďalší, 1985)

Princíp

Reakcia proteínov s meďnatými iónmi v prítomnosti zásady. Meďnaté ióny sú redukované na meďné, ktoré spolu s BCA vytvára modrofialový komplex okolo pH 10. Čím viac je prítomnej bielkoviny vo vzorku, tým výraznejšie je zafarbenie tohto komplexu. Absorbanciu meriame pri 562 nm.

Potrebné roztoky

Roztok A: NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1M NaOH

Roztok B: 4% CuSO₄ x 6 H₂O

Potrebný roztok C pripravíme zmiešaním roztoku A s roztokom B v pomere 50:1

Stanovenie kalibračnej krivky

→ 0,5ml 20% roztoku hovädzieho sérového albumínu (BSA) doplníme do 10ml redestilovanou vodou, vzniknutý roztok BSA má koncentráciu 1%

	Koncentrácia	1% roztok BSA	Destilovaná voda
1	0	0 µl	500 µl
2	200	10 µl	490 µl
3	400	20 µl	480 µl
4	600	30 µl	470 µl
5	800	40 µl	460 µl
6	1000	50 µl	450 µl

Postup

1. Mikrozómy alebo cytozol sme nariedili päť krát použitím destilovanej vody do dvoch eppendorfiiek (dve riedenia), z každého riedenia štyri vzorky → dohromady 8 paralelných meraní pre jeden cytozol či mikrozómy
2. Rozpipetovali sme jednotlivé množstvo roztoku BSA, 10 µl vzoriek, respektíve 10 µl vody ako slepú vzorku, doplnili 200 µl roztoku C, inkubovali 30min pri 37°C pri miernom trepaní
3. Zmerali sme absorbanciu pri 520 nm, od vzoriek odčítať priemer slepých vzoriek
4. Na základe výslednej rovnice kalibračnej krivky sme vypočítali obsah bielkoviny v jednotlivých vzorkách.

5.7 STANOVENIE AKTIVITY ALDEHYDREDUKTÁZY (AKR1A1) POMOCOU 4-PYRIDINKARBOXALDEHYDU

Princíp:

Stanovenie aktivity redukujúcich enzýmov je založené na meraní poklesu absorbancie spôsobným premenou NADPH na NADP⁺ vo vzorku pri 340 nm za laboratórnej teploty (25°C). Poklesom absorbancie a molárnym absorbčným koeficientom NADPH = 6220M⁻¹ x cm⁻¹ sa dá kvantitatívne vyjadriť aktivita reductáz. Jednotka enzýmovej aktivity (U) je definovaná ako oxidácia 1 mol NADPH/min pri 25°C. Meranie je sprostredkované na prístroji Tecan.

Používané zásobné roztoky:

1. *Pufr (0,1 M K – fosfátový pufr, pH6,0):*

→ zmiešať 0,1M K₂HPO₄ s 0,1M KH₂PO₄ tak, aby výsledný roztok mal pH 6,0

2. *4-pyridinkarboxaldehyd (0,1M)*

→ M_r = 151,1; ρ = 1,122 -> rozpustiť v H₂O

3. *NADPH (2mM)*

→ M_r = 833,4 -> rozpustiť v H₂O

	<u>Pipetované množstvo na jednu jamku</u>	<u>Koncentrácia v jednej jamke (celk. objem 200μl)</u>
Pufr	168 μl	
4-pyridinkarboxaldehyd	2 μl	1 mM
NADPH	10 μl	100 μM
cytozol	20 μl	

Postup: Do pripravenej 96 jamkovej doštičky GAMA s okrúhlym dnom sme napipetovali 20µl cytozolu (vzorku), alebo v prípade slepej vzorky, 20µl sodno-fosfátového pufru pH 7,4 a pridali 180 µl mastermixu multikanálovou pipetou.

Príprava mastermixu: rozpočítané množstvo na 96 jamiek (1 doštičku) s rezervou.

→ pufr	21,36 ml
→ 4-pyridinkarboxaldehyd	240 µl
→NADPH	1200 µl

Mastermix sme pridali multikanálovou pipetou rovnomerne do všetkých jamiek. Doštičku sme vložili do Tecanu s nastavenou príslušnou metódou. Pokles absorbancie sme sledovali po dobu 5 minút pri 340nm. Každá vzorka je meraná v 4-6 paralelných jamkách + 1-2 jamky slepého vzorku.

Vyhodnotenie

Zmena absorbancie za minútu zistená z oblasti lineárneho poklesu. Od rozdielu absorbancie za minútu vo vzorke odpočítať rozdiel absorbancie za minútu v slepom vzorku. Použitím molárneho extinkčného koeficientu ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) vypočítať koncentráciu zreagovaného NADPH za minútu.

Výpočet aktivity:

$aktivita = \frac{(\Delta Avz. - \Delta Asl) * Vi * 1000}{\epsilon * l * Vs}$	[nmol/min/ml]	
	ϵ_{NADPH}	6,22mM ⁻¹ x cm ⁻¹
	l	dĺžka meranej vrstvy (výška jamky) → 0,75 cm
	Vi	objem reakčnej zmesi → 0,2 ml
	Vs	objem biologickej frakcii → 0,010 ml

Jednotky aktivity boli prepočítané na mg proteínu.

5.8 STANOVENIE AKTIVITY ALDEHYDREDUKTÁZY (AKR1A1) POMOCOU GLYCERALDEHYDU

Princíp:

Stanovenie aktivity redukčných enzýmov je založené na meraní poklesu absorbancie spôsobeným premenou NADPH na NADP^+ vo vzorku pri 340nm za laboratórnej teploty (25°C). Pomocou poklesu absorbancie a molárneho absorpčného koeficientu $\text{NADPH} = 6220 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ sa dá kvantitatívne vyjadriť aktivita reductáz. Jednotka enzýmovej aktivity (U) je definovaná ako oxidácia 1mol NADPH za minútu pri 25°C. Meranie je sprostredkované na prístroji Tecan.

Používané zásobné roztoky:

1. *Pufr (0,1M K - fosfátový pufr, pH 6,0)*

→ zmiešať 0,1M K_2HPO_4 s 0,1M KH_2PO_4 tak, aby pH výsledného roztoku bolo 6,0

2. *DL – glyceraldehyd (1M)*

→ $M_r = 90,08$ -> rozpustiť v DMSO

3. *NADPH (4mM)*

→ $M_r = 833,4$ -> rozpustiť vo vode

	<u>Pipetované množstvo na jednu jamku</u>	<u>Koncentrácia v jednej jamke (celk. objem 200μl)</u>
Pufr	168 μ l	
DL-glyceraldehyd	2 μ l	1 mM
NADPH	10 μ l	200 μ M
cytozol	20 μ l	

Postup: Do pripravenej 96 jamkovej doštičky GAMA s okrúhlym dnom napipetovať 20 μ l cytozolu (vzorku), alebo v prípade slepej vzorky, 20 μ l sodno-fosfátového pufr pH 7,4 a pridať 180 μ l mastermixu multikanálovou pipetou.

Príprava mastermixu: rozpočítané množstvo na 96 jamiek (1 doštičku) s rezervou.

→ pufr	21,36 ml
→ DL – glycerinaldehyd	240 µl
→ NADPH	1200 µl

Mastermix sme pridali multikanálovou pipetou rovnomerne do všetkých jamiek. Doštičku vložili do Tecanu s nastavenou príslušnou metódou. Pokles absorbancie bol sledovaný po dobu 5 minút pri 340nm. Každá vzorka je meraná v 4-6 paralelných jamkách + 1-2 jamky slepého vzorku.

Vyhodnotenie

Zmena absorbancie za minútu zistená z oblasti lineárneho poklesu. Od rozdielu absorbancie za minútu vo vzorke odpočítať rozdiel absorbancie za minútu v slepom vzorku. Použitím molárneho extinkčného koeficientu ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) vypočítať koncentráciu zreagovaného NADPH za minútu.

Výpočet aktivity:

$aktivity = \frac{(\Delta Avz. - \Delta Asl) * Vi * 1000}{\epsilon * l * Vs}$	[nmol/min/ml]	
	ϵ_{NADPH}	6,22mM ⁻¹ x cm ⁻¹
	l	dĺžka meranej vrstvy (výška jamky) → 0,75 cm
	Vi	objem reakčnej zmesi → 0,2 ml
	Vs	objem biologickej frakcii → 0,010 ml

Jednotky aktivity boli prepočítané na mg proteínu.

5.9 STANOVENIE AKTIVITY ALDOKETOREDUKTÁZ (AKR1C) POMOCOUCO ACENAFTENOLU

Princíp:

Stanovenie aktivity redukčných enzýmov je založené na meraní vzrastu absorbancie spôsobeným premenou NADP^+ na NADPH vo vzorku pri 340nm za laboratórnej teploty (25°C). Pomocou vzrastu absorbancie a molárneho absorpčného koeficientu $\text{NADPH} = 6220 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ sa dá kvantitatívne vyjadriť aktivita reductáz. Jednotka enzýmovej aktivity (U) je definovaná ako oxidácia 1 mol NADPH za minútu pri 25°C. Meranie je sprostredkované na prístroji Tecan.

Používané zásobné roztoky:

1. Pufér (0,1M TRIS/HCl, pH 8,9)

→ 1,2 g TRIS rozpustiť v 70 ml redestilovanej vode, upraviť pH na 8,9 a doplniť na 100 ml.

2. Acenaftenol (0,1 M)

→ 17,02 mg/ml rozpustiť v DMSO

3. NADP^+ (20 mM)

→ 23,6 mg do 1,5 ml redestilovanej vody

	<u>Pipetované množstvo na jednu jamku</u>	<u>Koncentrácia v jednej jamke (celk. objem 200μl)</u>
Pufér	168 μ l	
Acenaftenol	2 μ l	1 mM
NADP^+	10 μ l	1 mM
cytozol	20 μ l	

Postup: Do pripravenej 96 jamkovej doštičky GAMA s okrúhlym dnom napipetovať 20µl cytozolu (vzorku), alebo v prípade slepej vzorky, 20 µl sodno-fosfátového pufru pH 7,4 a pridať 190 µl mastermixu multikanálovou pipetou.

Príprava mastermixu: rozpočítané množstvo na 96 jamiek (1 doštičku) s rezervou.

→ pufr	21,36 ml
→ acenaftenol	240 µl
→ NADPH	1200 µl

Mastermix sme pridali multikanálovou pipetou rovnomerne do všetkých jamiek. Doštičku vložili do Tecanu s nastavenou príslušnou metódou. Vzrast absorbancie sme sledovali po dobu 5 minút pri 340 nm. Každá vzorka bola meraná v 4-6 paralelných jamkách + 1-2 jamky slepého vzorku.

Vyhodnotenie

Zmena absorbancie za minútu zistená z oblasti lineárneho vzrastu. Od rozdielu absorbancie za minútu vo vzorke odpočítať rozdiel absorbancie za minútu v slepom vzorku. Použitím molárneho extinkčného koeficientu ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) vypočítať koncentráciu vzniknutého NADPH za minútu.

Výpočet aktivity:

$\text{aktivita} = \frac{(\Delta A_{vz.} - \Delta A_{sl}) * V_i * 1000}{\epsilon * l * V_s}$	[nmol/min/ml]	
	ϵ_{NADPH}	6,22mM ⁻¹ x cm ⁻¹
	l	dĺžka meranej vrstvy (výška jamky) → 0,75 cm
	V _i	objem reakčnej zmesi → 0,2 ml
	V _s	objem biologickej frakcii → 0,010 ml

Jednotky aktivity boli prepočítané na mg proteínu.

5.10 STANOVENIE AKTIVITY KARBONYLREDUKTÁZY (CBR) POMOCOU MENADIONU

Princíp:

Metóda je založená na inkubácii subcelulárnej frakcie so substrátom menadionom. Redukcia menadionu karbonylreduktázou je súbežnou reakciou popri oxidácii NADPH, čo je fotometricky zaznamenávané ako pokles absorbancie. Pomocou poklesu absorbancie a molárneho absorbčného koeficientu $\text{NADPH} = 6220 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ sa dá kvantitatívne vyjadriť aktivita reductáz. Meranie je sprostredkované na prístroji Tecan.

Používané zásobné roztoky:

1. Pufr (0,1 M K – fosfátového roztoku, pH 7,4)

→ 8,71 g K_2HPO_4 nasypať do 500 ml odmernej banky a doplniť redestilovanou vodou po rysku

→ 2,72 g KH_2PO_4 nasypať do 200 ml odmernej banky a doplniť redestilovanou vodou po rysku

→ zmiešať oba roztoky aby výsledný roztok mal hodnotu pH 7,40

2. Menadion ($M = 172,18$; 50 mM)

→ rozpustiť 8,61 mg v 1 ml etanolu

3. NADPH ($M = 833$; 5 mM)

→ rozpustiť 6,25 mg v 1,5 ml redestilovanej vode

	<u>Pipetované množstvo na jednu jamku</u>	<u>Koncentrácia v jednej jamke (celk. objem 200μl)</u>
Pufr	168 μ l	
Menadion	2 μ l	500 μ M
NADPH	10 μ l	250 μ M
cytozol	20 μ l	

Postup: Do pripravenej 96 jamkovej doštičky GAMA s okrúhlym dnom napipetovať 20 µl cytozolu (vzorku), alebo v prípade slepej vzorky, 20 µl sodno-fosfátového pufru pH 7,4 a pridať 180 µl mastermixu multikanálovou pipetou.

Príprava mastermixu: rozpočítané množstvo na 96 jamiek (1 doštičku) s rezervou.

→ pufr	21,36 ml
→ acenaftenol	240 µl
→ NADPH	1200 µl

Mastermix sme pridali multikanálovou pipetou rovnomerne do všetkých jamiek. Doštičku vložili do Tecanu s nastavenou príslušnou metódou. Pokles absorbancie sme sledovali po dobu 5 minút pri 340nm. Každá vzorka bola meraná v 4-6 paralelných jamkách + 1-2 jamky slepého vzorku.

Vyhodnotenie

Zmena absorbancie za minútu zistená z oblasti lineárneho poklesu. Od rozdielu absorbancie za minútu vo vzorke odpočítať rozdiel absorbancie za minútu v slepom vzorku. Použitím molárneho extinkčného koeficientu ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) vypočítať koncentráciu zreagovaného NADPH za minútu.

Výpočet aktivity:

$\text{aktivita} = \frac{(\Delta Avz. - \Delta Asl) * Vi * 1000}{\epsilon * l * Vs}$	[nmol/min/ml]	
	ϵ_{NADPH}	6,22mM ⁻¹ x cm ⁻¹
	l	dĺžka meranej vrstvy (výška jamky) → 0,75 cm
	Vi	objem reakčnej zmesi → 0,2 ml
	Vs	objem biologickej frakcii → 0,010 ml

Jednotky aktivity boli prepočítané na mg proteínu.

5.11 MERANIE AKTIVITY GLUTATION-S-TRANSFERÁZY NA DOŠTIČKE

Princíp:

Meranie aktivity GST je založené na tvorbe GSH-CDNB konjugátu, ktorý ma absorpčné maximum pri 340 nm.

Používané roztoky:

1. 0,1 M Na – fosfátový pufr (pH 6,5)

→ 1,79 g Na_2HPO_4 presypať do 50 ml odmernej banky a doplniť redestilovanou vodou po rysku

→ 1,56 g NaH_2PO_4 presypať do 100 ml odmernej banky a doplniť redestilovanou vodou po rysku

→ zmiešať oba roztoky približne v pomere 1:3 aby výsledný roztok mal pH 6,5.

2. Roztok GSH (množstvo vystačujúce na jednu doštičku)

→ 5,15 mM GSH rozpustený v 0,1 M Na – fosfátovom pufre (pH 6,5)

→ 7,92 mg GSH rozpustené v 5 ml 0,1 M Na – fosfátovom pufre (pH 6,5)

3. Roztok CDNB (množstvo vystačujúce na jednu doštičku)

→ 51,5 mM CDNB rozpustené v etanole

→ 5,22 mg CDNB rozpustené v 0,5 ml etanole

4. Master Mix (pripraviť tesne pred stanovením)

→ množstvo vystačujúce na jednu doštičku

→ napipetovať do vaničky 4ml GSH, 0,4 ml CDNB a 15,6 ml 0,1 M Na-fosfátového pufre.

Postup:

Pipetované množstvo na jednu jamku

Mastermix 194 μ l

Cytozol 6 μ l

Na Tecanu sme nastavili príslušnou metódu a s vloženou mierne zamiešanou doštičkou spustili meranie. Absorbancia bola zmeraná šesť krát v minútových intervaloch pri 340 nm.

Vyhodnotenie

Pomer konjugovaného substrátu sme vypočítali z odpočítanej absorbancie po 1 min s použitím extinkčného koeficienta $9,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ pri 340 nm (potreba vedieť výšku roztoku v jamke). Jednotka enzýmovej aktivity U je definovaná ako množstvo enzýmu katalyzujúci premenu 1 μ mol S-2,4-dinitrofenyl-glutathionu za 1 minútu (pomocou 1 mM GSH a 1 mM CDNB). Špecifická aktivita je vyjadrená ako počet jednotiek na mg proteínu.

5.12 ŠTATISTICKÁ ANALÝZA

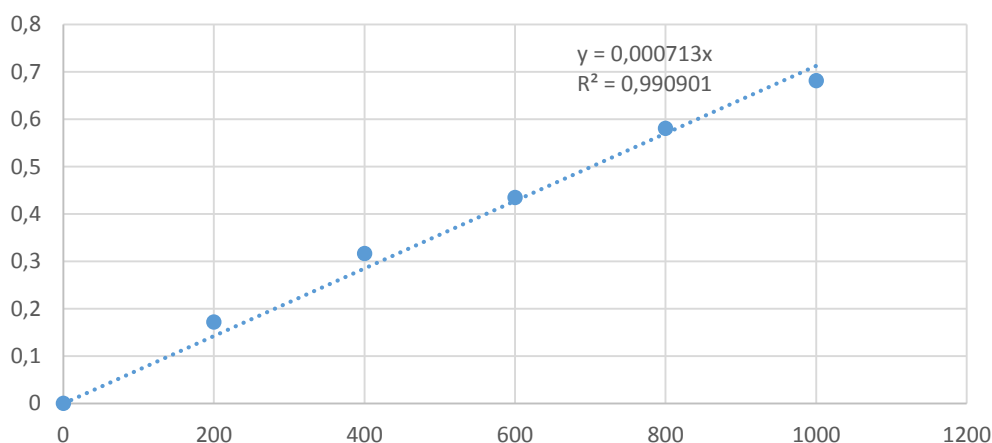
Výsledky z dvoch paralelných meraní boli použité k tvorbe grafov, znázorňujúce zmenu v enzýmovej aktivite. Štatistická významnosť výsledkov zmien aktivít bola hodnotená metódou one-way ANOVA s využitím programu GraphPad Prism verzia 6, kde boli zhodnotené výsledky z dvoch meraní ku každému enzýmu použitím danej metódy. Hladina $P < 0,05$ bola braná ako štatisticky významná.

6 VÝSLEDKY

6.1 BCA STANOVENIE BIELKOVINY

Kalibračná krivka pre stanovenie obsahu proteínu u jednotlivých vzoriek z bunečnej línie MDA-MB-231:

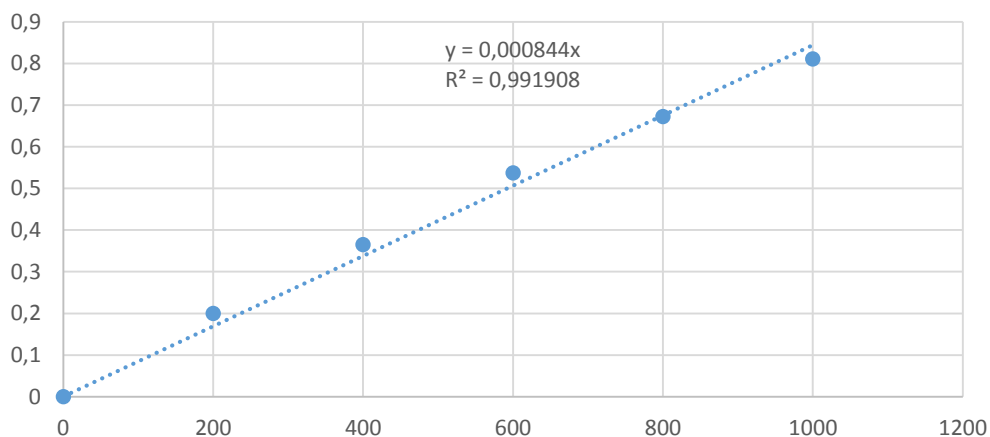
Koncentrácia [µg/ml]	0	200	400	600	800	1000
Absorbancia	0	0,172	0,316	0,435	0,581	0,682



Obr. 8 : Kalibračná krivka

Kalibračná krivka pre stanovenie obsahu proteínu u jednotlivých vzoriek z bunečnej línie MCF-7:

Koncentrácia [µg/ml]	0	200	400	600	800	1000
Absorbancia	0	0,200	0,365	0,537	0,673	0,811



Obr. 9 : Kalibračná krivka

Hodnoty bielkovín pre jednotlivé bunečné línie ovplyvnené izoflavonoidmi:

	24 hodín MDA-MB	24 hodín MCF-7
Kontrola	0,650 mg/ml	0,766 mg/ml
Genistein	0,594 mg/ml	0,786 mg/ml
Daidzein	0,605 mg/ml	0,821 mg/ml
Formononetin	0,477 mg/ml	0,765 mg/ml

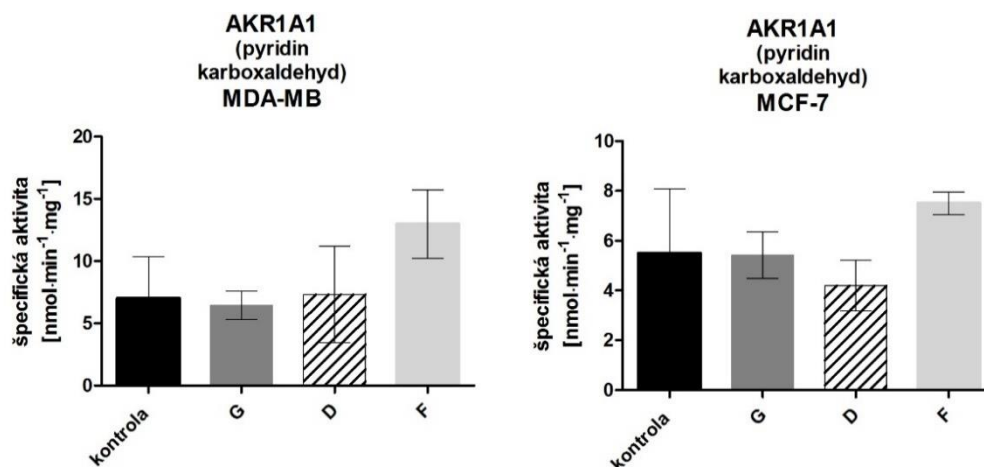
	48 hodín MDA-MB	48 hodín MCF-7
Kontrola	0,837 mg/ml	1,049 mg/ml
Genistein	0,754 mg/ml	0,854 mg/ml
Daidzein	0,726 mg/ml	0,752 mg/ml
Formononetin	0,736 mg/ml	0,860 mg/ml

	72 hodín MDA-MB	72 hodín MCF-7
Kontrola	0,871 mg/ml	0,670 mg/ml
Genistein	0,797 mg/ml	0,748 mg/ml
Daidzein	0,876 mg/ml	0,708 mg/ml
Formononetin	0,879 mg/ml	0,732 mg/ml

6.2 STANOVENIE AKTIVITY ALDEHYDREDUKTÁZY (AKR1A1) POMOCOU 4-PYRIDINKARBOXALDEHYDU

Inkubácia 24 hodín

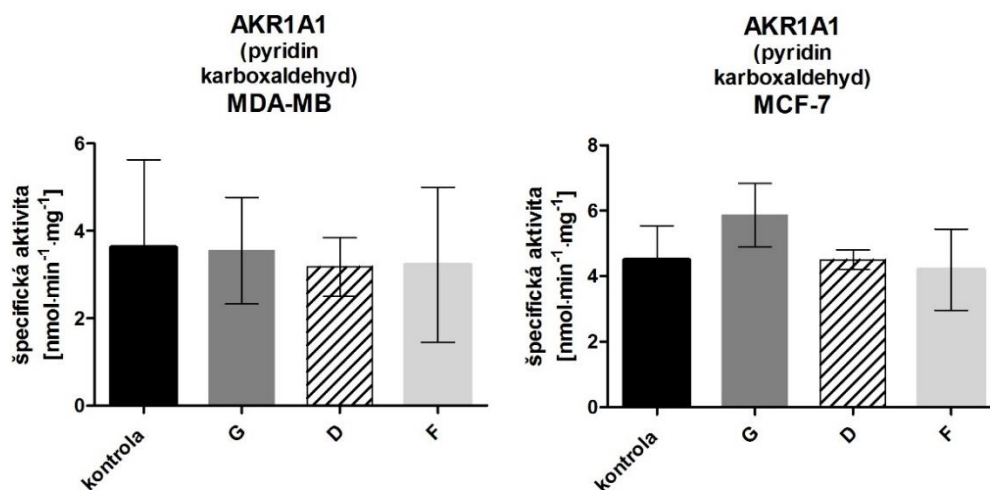
	K	G	D	F		K	G	D	F
Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	7,01	6,44	7,33	12,98	Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	5,48	5,42	4,19	7,51
smodch	3,35	1,14	3,90	2,74	smodch	2,59	0,94	1,02	0,46



Obr. 10: Aktivita enzýmu AKR1A1 po 24 hodinovom ovplyvnení izoflavonoidmi:
G- genistein, D- daidzein, F- formononetin.

Inkubácia 48 hodín

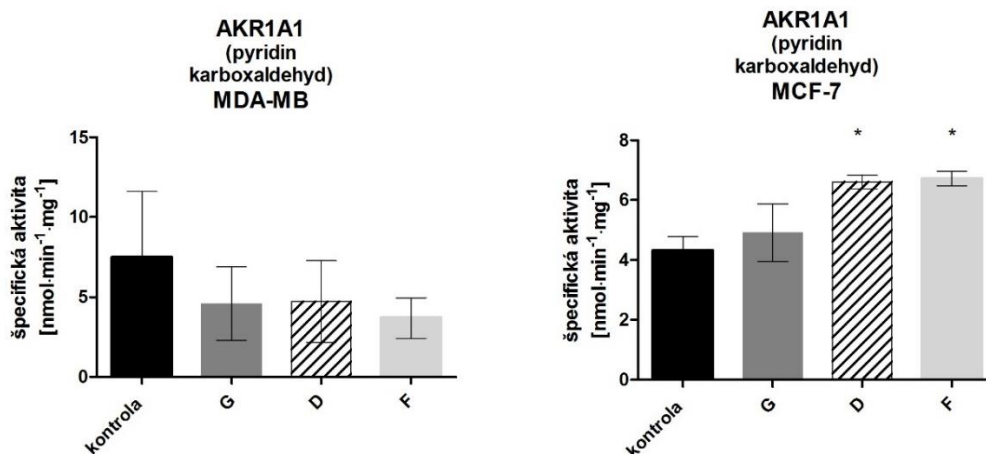
	K	G	D	F		K	G	D	F
Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	7,71	8,23	5,01	3,46	Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	4,50	5,87	4,50	4,21
smodch	4,09	4,68	1,83	0,23	smodch	1,03	0,97	0,30	1,24



Obr. 11 : Aktivita enzýmu AKR1A1 po 48 hodinovom ovplyvnení izoflavonoidmi: G- genistein, D- daidzein, F- formononetin.

Inkubácia 72 hodín

	K	G	D	F		K	G	D	F
Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	7,49	4,58	4,72	3,69	Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	4,31	4,91	6,61	6,72
smodch	4,13	2,30	2,55	1,27	smodch	0,47	0,96	0,23	0,24



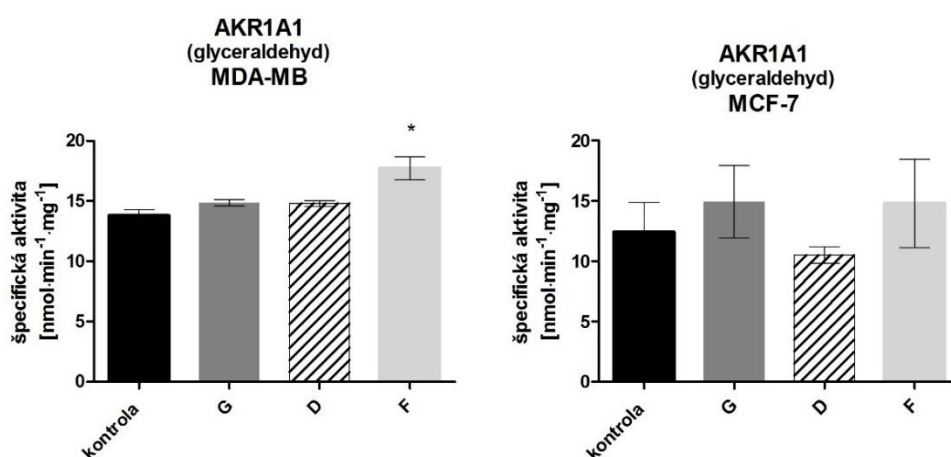
Obr. 12 : Aktivita enzýmu AKR1A1 po 72 hodinovom ovplyvnení izoflavonoidmi: G- genistein, D- daidzein, F- formononetin. Zistená štatisticky významná zmena oproti kontrole ($p < 0,05$) v aktivite po ovplyvnení daným izoflavonoidom je označaná symbolom *.

U bunečnej línii MDA-MB sa pri žiadnom pokuse nepreukázal dostatočná zmena aktivity. U bunečnej línii MCF-7 bola zistená signifikantne zvýšená aktivita po 72 hodinovej inkubácii buniek s izoflavonoidmi daidzeinom a formononetinom.

6.3 STANOVENIE AKTIVITY ALDEHYDREDUKTÁZY (AKR1A1) POMOCOU GLYCERALDEHYDU

Inkubácia 24 hodín

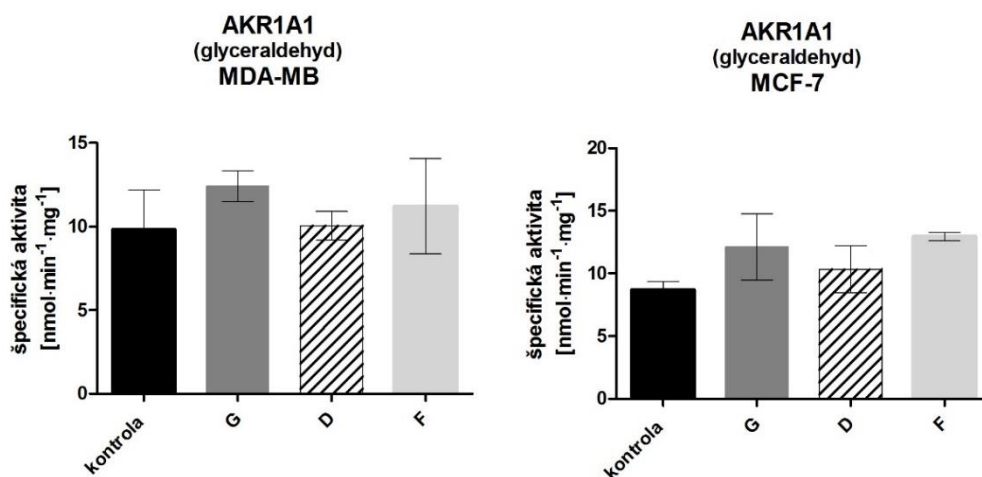
	K	G	D	F		K	G	D	F
Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg] smodch	13,79	14,86	14,81	17,73	Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg] smodch	12,44	14,93	10,52	14,79
	0,48	0,27	0,23	0,95		2,44	3,02	0,69	3,67



Obr. 13 : Aktivita enzýmu AKR1A1 po 24 hodinovom ovplyvnení izoflavonoidmi: G- genistein, D- daidzein, F- formononetin. Zistená štatisticky významná zmena oproti kontrole ($p < 0,05$) v aktivite po ovplyvnení daným izoflavonoidom je označená symbolom *.

Inkubácia 48 hodín

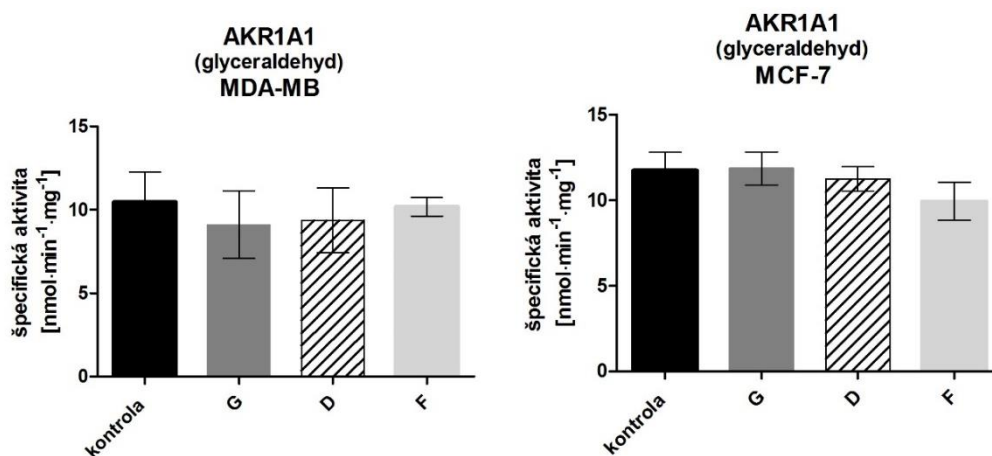
	K	G	D	F		K	G	D	F
Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	9,82	12,44	10,04	11,22	Priemer aktivity enzýmov	8,67	12,13	10,32	12,95
smodch	2,37	0,92	0,86	2,85	smodch	0,68	2,65	1,89	0,31



Obr. 14 : Aktivita enzýmu AKR1A1 po 48 hodinovom ovplyvnení izoflavonoidmi
G- genistein, D- daidzein, F- formononetin

Inkubácia 72 hodín

	K	G	D	F		K	G	D	F
Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	10,49	9,11	9,37	10,19	Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	11,74	11,86	11,24	9,95
smodch	1,79	2,03	1,94	0,56	smodch	1,07	0,97	0,72	1,11



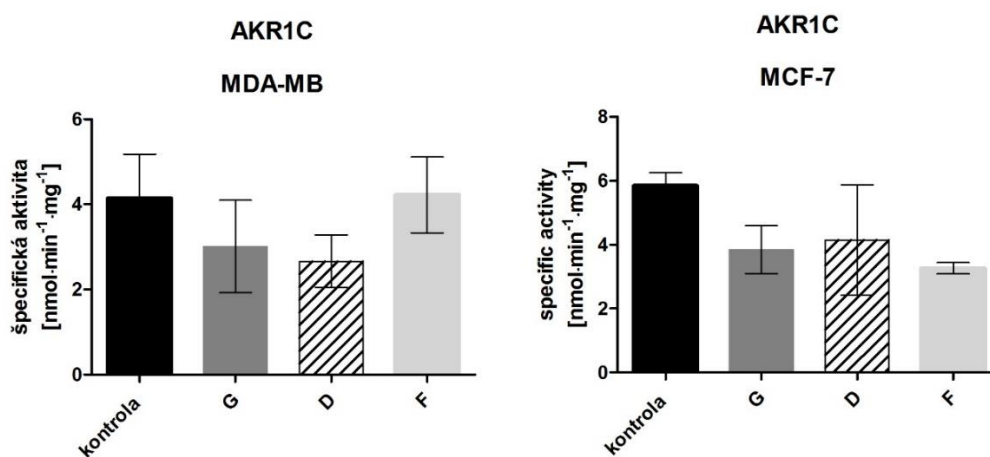
Obr. 15 : Aktivita enzýmu AKR1A1 po 72 hodinovom ovplyvnení izoflavonoidmi: G- genistein, D- daidzein, F- formononetin.

U bunečnej línii MDA-MB sa preukázala signifikantné zvýšenie aktivity enzýmu len po 24 hodinovej inkubácii buniek s izoflavonoidom formononetinom. Dlhšia inkubácia tento výsledok nepodporila. Bunečná línia MCF-7 nevykazovala žiadnu výraznú zmenu v aktivite tohto enzýmu počas celého pokusu s jednotlivými isoflavonoidami.

6.4 STANOVENIE AKTIVITY ALDOKETOREDUKTÁZ (AKR1C) POMOCOUCO ACENAFTENOLU

Inkubácia 24 hodín

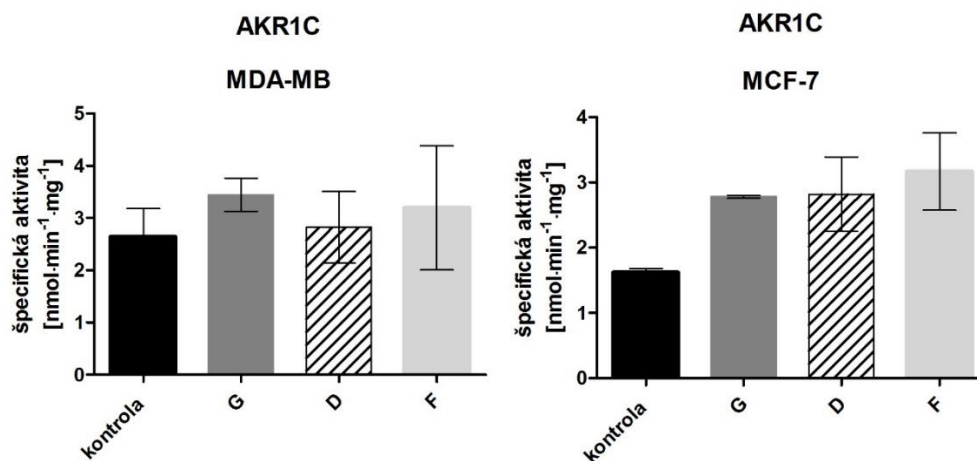
	K	G	D	F		K	G	D	F
Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	4,14	3,01	2,67	4,22	Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	5,84	3,84	4,14	3,26
smodch	1,03	1,08	0,62	0,89	smodch	0,41	0,75	1,73	0,18



Obr. 16 : Aktivita enzýmu AKR1C po 24 hodinovom ovplyvnení izoflavonoidmi:
G- genistein, D- daidzein, F- formononetin.

Inkubácia 48 hodín

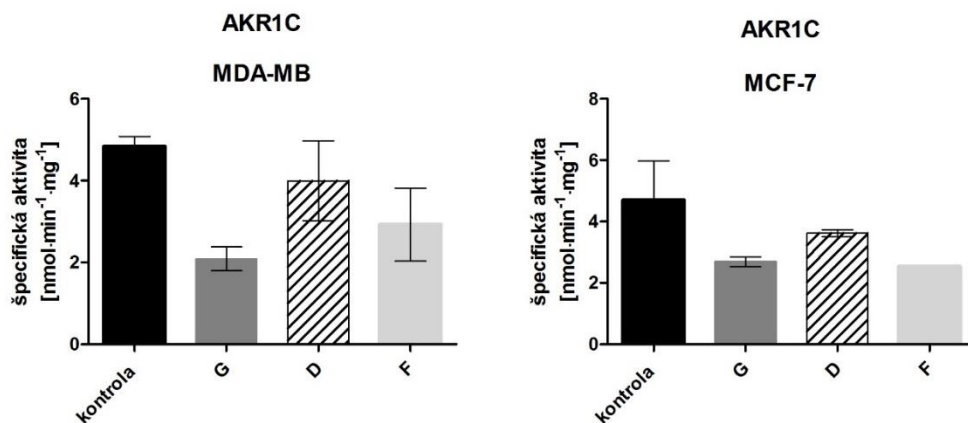
	K	G	D	F		K	G	D	F
Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	2,64	3,45	2,82	3,20	Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	1,62	2,78	2,82	3,17
smodch	0,54	0,32	0,69	1,19	smodch	0,06	0,02	0,57	0,59



Obr. 17 : Aktivita enzýmu AKR1C po 48 hodinovom ovplyvnení izoflavonoidmi: G- genistein, D- daidzein, F- formononetin.

Inkubácia 72 hodín

	K	G	D	F		K	G	D	F
Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	4,84	2,09	3,10	2,93	Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	4,70	2,69	3,62	2,54
smodch	0,25	0,29	0,98	0,89	smodch	1,28	0,16	0,11	n/a



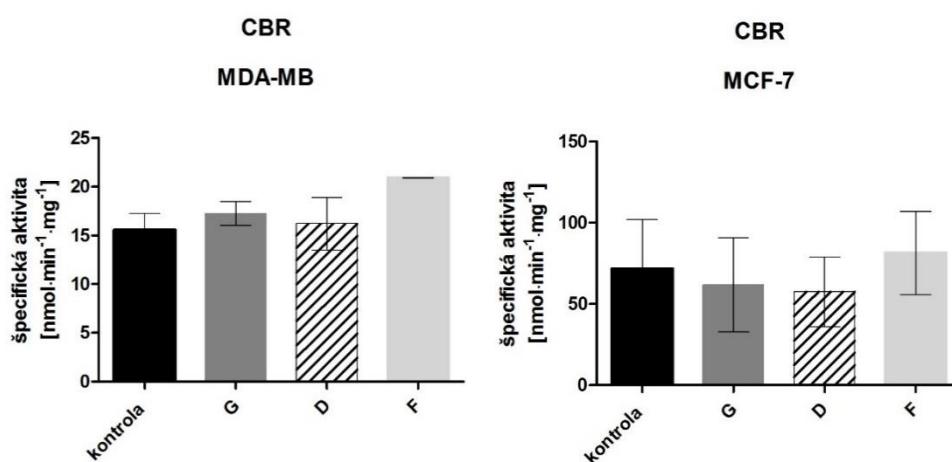
Obr. 18 : Aktivita enzýmu AKR1C po 72 hodinovom ovplyvnení izoflavonoidmi: G-genistein, D- daidzein, F- formononetin.

U daného enzýmu sa v prípade bunčných línií MDA-MB a MCF-7 nepreukázala žiadna signifikantná zmena aktivity počas pokusov.

6.5 STANOVENIE AKTIVITY KARBONYLREDUKTÁZY (CBR) POMOCO MENADIONU

Inkubácia 24 hodín

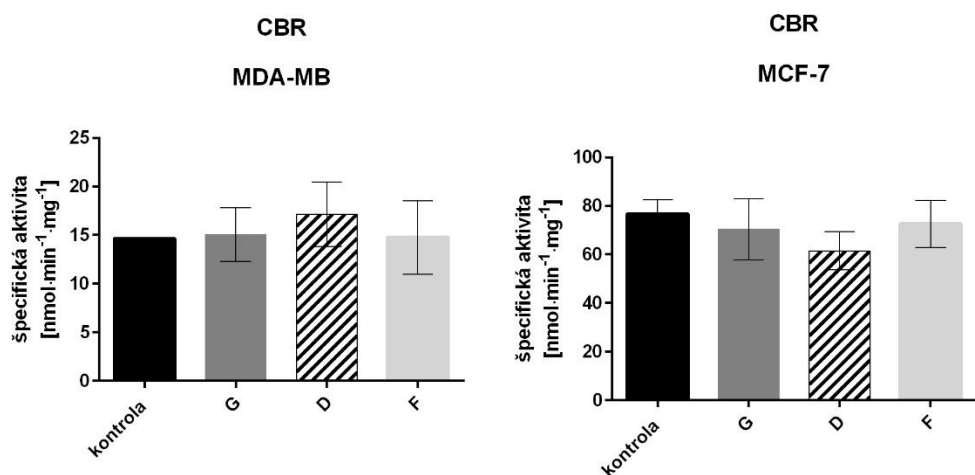
	K	G	D	F		K	G	D	F
Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	15,55	17,26	16,21	20,90	Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	71,59	61,78	57,40	81,33
smodch	1,72	1,22	2,70	0,04	smodch	30,50	29,05	21,48	25,49



Obr. 19 : Aktivita enzýmu CBR po 24 hodinovom ovplyvnení izoflavonoidmi: G-genistein, D- daidzein, F- formononetin

Inkubácia 48 hodín

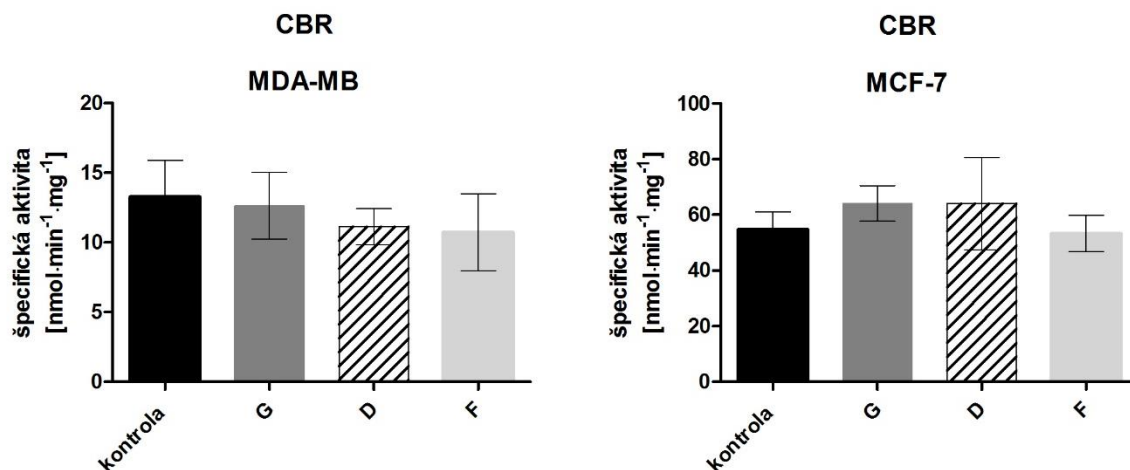
	K	G	D	F		K	G	D	F
Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	14,64	15,06	17,16	14,76	Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	76,71	70,36	61,52	72,69
smodch	0,09	2,75	3,32	3,80	smodch	5,71	12,55	7,91	9,73



Obr. 20 : Aktivita enzýmu CBR po 48 hodinovom ovplyvnení izoflavonoidmi G-genistein, D- daidzein, F- formononetin.

Inkubácia 72 hodín

	K	G	D	F		K	G	D	F
Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	13,28	12,65	11,13	10,73	Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	54,66	64,08	64,02	53,30
smodch	2,60	2,40	1,30	2,76	smodch	6,38	6,36	16,60	6,54



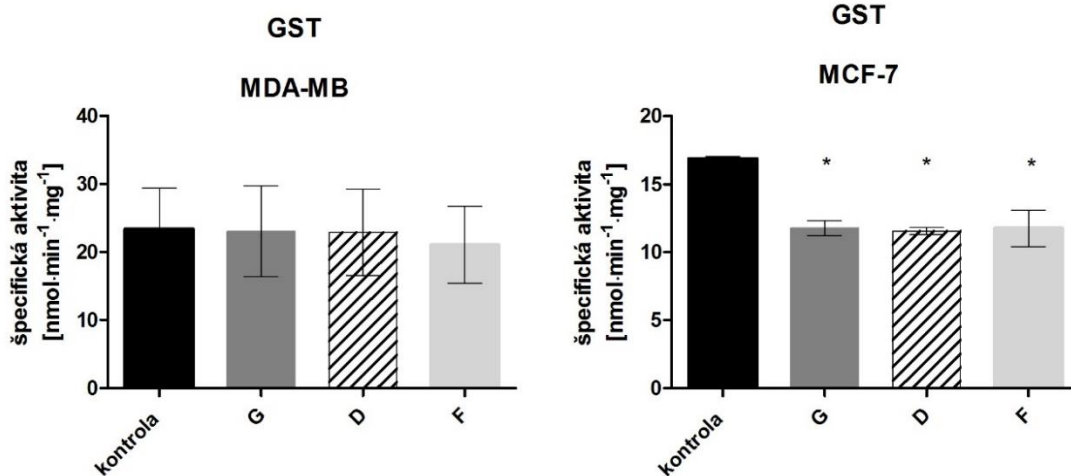
Obr. 21 : Aktivita enzýmu CBR po 72 hodinovom ovplyvnení izoflavonoidmi: G- genistein, D- daidzein, F- formononetin.

Tento enzým nepreukázal žiadnu výraznú zmenu v aktivite u oboch bunčných líniách po ovplyvnení izoflavonoidmi.

6.6 MERANIE AKTIVITY GLUTATION-S-TRANSFERÁZY NA DOŠTIČKE

Inkubácia 24 hodín

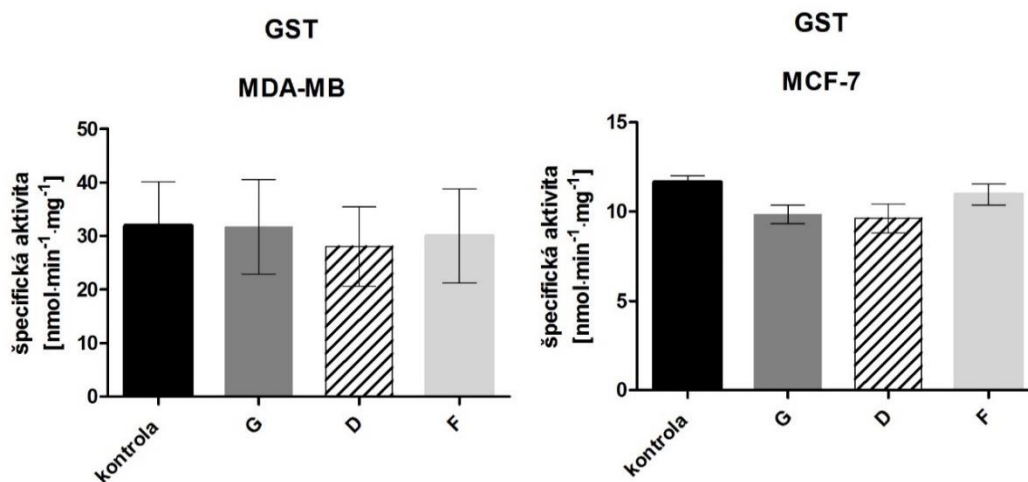
	K	G	D	F		K	G	D	F
Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	23,34	23,04	22,87	21,05	Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	16,88	11,77	11,56	11,76
smodch	6,09	6,67	6,33	5,66	smodch	0,17	0,56	0,26	1,35



Obr. 22 : Aktivita enzýmu GST po 24 hodinovom ovplyvnení izoflavonoidmi: G- genistein, D- daidzein, F- formononetin. Zistené štatisticky významné zníženie aktivity oproti kontrole ($p < 0,05$) po ovplyvnení daným izoflavonoidom je označené symbolom *.

Inkubácia 48 hodín

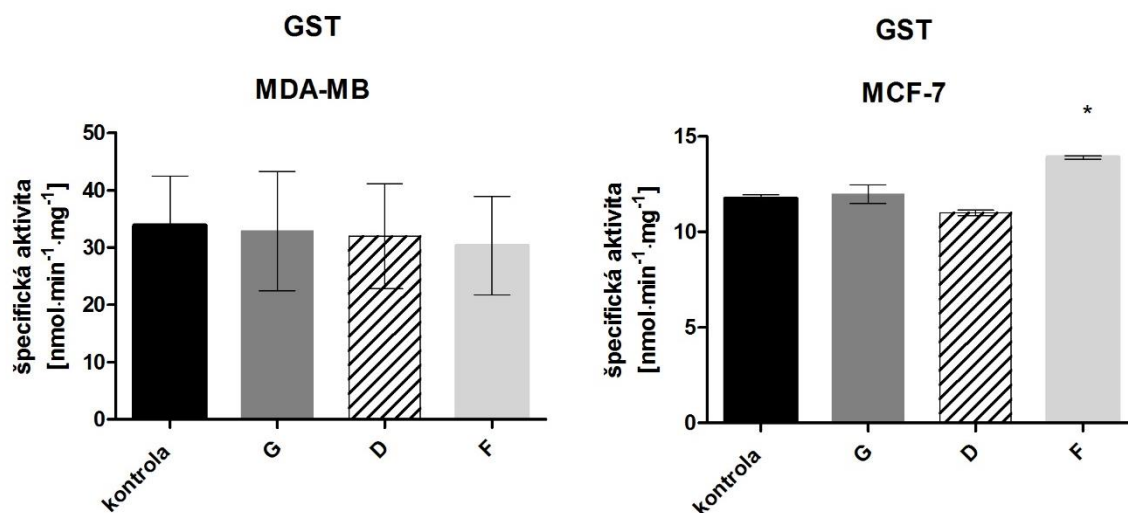
	K	G	D	F		K	G	D	F
Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	31,93	31,70	28,05	30,04	Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	11,67	9,85	9,63	10,97
smodch	8,29	8,87	7,42	8,78	smodch	0,37	0,52	0,82	0,59



Obr. 23 : Aktivita enzýmu GST po 48 hodinovom ovplyvnení izoflavonoidmi: G-genistein, D- daidzein, F- formononetin.

Inkubácia 72 hodín

	K	G	D	F		K	G	D	F
Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	33,89	32,89	32,01	30,35	Priemer aktivity enzýmov [nmol/min/mg]	11,76	12,00	11,00	13,91
smodch	8,66	10,43	9,19	8,59	smodch	0,21	0,49	0,15	0,09



Obr. 24 : Aktivita enzýmu GST po 72 hodinovom ovplyvnení izoflavonoidmi: G- genistein, D- daidzein, F- formononetin. Zistené štatisticky významné zvýšenie aktivity oproti kontrole ($p < 0,05$) po ovplyvnení daným izoflavonoidom je označá symbolom *.

Bunečná línia MDA-MB nepreukázala výraznú zmenu v aktivite daného enzýmu. Naopak bunečná línia MCF-7 preukázala úspešné zníženie aktivity po 24 hodinovej inkubácii všetkými skúmanými izoflavonoidmi: genisteinom, daidzeinom aj formononetinom. Po 48 hodinovej inkubácii sa tento výsledok už bohužiaľ nepotvrdil. Po 72 hodinovej inkubácii sa žiadaný účinok preukázal len u látky formononetin a s opačným účinkom.

7 DISKUSIA

Je preukázané, že expresia i aktivita biotransformačných enzýmov sa môže líšiť u rôznych jedincov, rovnako tak ako sa môžu meniť u konkrétneho organizmu v priebehu života. Tieto odlišnosti najčastejšie súvisia s vekom, pohlavím, genetickými faktormi, stravou a patofyziologickými podmienkami. Zmeny v expresii či aktivite pečenejých biotransformačných enzýmov významne ovplyvňujú metabolizmus a následne aj biologický efekt mnoho liečiv. To v dôsledku vedie k rozdielnej efektívnosti a bezpečnosti liečby pacientov, či k rôznym liekovým interakciám (Yun, a ďalší, 2010).

Aktivitu enzýmov môžu taktiež ovplyvňovať tiež látky, ktoré fungujú ako aktivátory, alebo naopak inhibítory enzýmov. Tieto inhibítory bývajú často zložkami liečiv, alebo potravy. Inhibícia enzýmu vedie k potlačeniu metabolizácie substrátov, napríklad liečivej látky, čo môže viesť k zásadným farmakologickým a toxikologickým dôsledkom, ako je napríklad predĺžený biologický polčas liečiva (Boušová, a ďalší, 2012) (Boušová, a ďalší, 2013).

V tejto diplomovej práci sme sa zamerali na testovanie biotransformačných enzýmov fáze I: AKR1A1, AKR1C, CBR a fáze II: GST. Všetky spomenuté enzýmy sa podieľajú na aktivácii a prípadnej detoxikácii ich substrátov. Ako je spomínané vyššie, zmenou ich aktivity navodíme aj iné výsledky v tele. Zvýšením aktivity sa môžu ich substráty, liečivá, rýchlejšie odbúravať → nebude dosiahnutý žiadaný výsledok, alebo sa prípadne môže cielene zabraňovať toxicite substrátov rýchlejšim odbúraním. Naopak znížením aktivity predĺžime účinok substrátov, zabránime jeho odbúraniu, poprípade premene na menej aktívny či toxický metabolit.

My sme sa snažili našim výskumom zistiť vplyv vybraných izoflavonoidov na aktivitu enzýmov podieľajúcich sa na biotransformácii cytostatík. V rámci pokusov boli použité bunčné línie MDA-MB-231 a MCF-7, ktoré boli inkubované po dobu 24, 48 a 72 hodín s izoflavonoidmi genisteinom, daidzeinom a formononetinom o koncentrácii 10 μ M. Tieto enzýmy sú často nadmerne exprimované v líniiach buniek, ktoré sú rezistentné k liečivám (Hayeshi, a ďalší, 2007).

Preto je snahou vedcov zistiť, či ich zmena aktivity (zníženie) nepomôže ku lepšej liečbe, kvôli predĺženému času, počas ktorého daná látka bude nemetabolizovaná. Jednou z možností, ktorá je považovaná za nápomocnú, je práve využitie prírodných látok (napr. izoflavonoidov) na zníženie aktivity biotransformačných enzýmov.

Viacero štúdií zaoberajúcich sa danou problematikou bolo vykonaných s rozdielmi vo výsledkoch. Niektoré testy boli zamerané na to, akým mechanizmom sa izoflavonoidy vôbec podieľajú na zmene aktivít, iné sa zameriavali, či vôbec majú izoflavonoidy nejaký žiadaný účinok čo sa týka nádorových ochorení. Zhrnutím ich testov by bolo, že prírodné izoflavonoidy majú protektívny antikancerózný účinok rôznymi mechanizmami. My sme sa zamerali na zmeny aktivít.

Testovaný enzým AKR1A1 metódou za využitia 4-pyridínkarboxaldehydu vykazoval signifikantné zvýšenie jeho aktivity na bunčnej línii MCF-7, ktorá bola inkubovaná 72 hodín s izoflavonoidami. Táto zmena v aktivite bola zistená po použití izoflavonoidov daidzeinu a formononetinu. Iné štúdie neboli vykonané, ktoré by potvrdili tieto výsledky. U bunčnej línii MDA-MB-231 sa nezistila žiadna výrazná zmena.

Druhý pokus bol taktiež zameraný na aktivitu enzýmu AKR1A1, s tým rozdielom, že namiesto 4-pyridínkarboxaldehydu, bol využitý glycerol. U bunčnej línii MDA-MB-231 sa preukázala signifikantné zvýšenie aktivity len po 24 hodinovej inkubácii buniek s izoflavonoidom formononetinom. Dlhšia inkubácia tento výsledok nepodporila. Bunčná línia MCF-7 nevykazovala žiadnu výraznú zmenu v aktivite počas celého pokusu s týmto enzýmom danou metódou. Taktiež ani túto metódu nepodporili výsledky iných štúdií.

Tretí pokus sa týkal aktivity enzýmu AKR1C. U žiadnej bunkovej línii, MCF-7 ani MDA-MB, nebola zistená signifikantná zmena aktivity.

Rovnaké výsledky boli zistené u štvrtého enzýmu, ktorým bol enzým CBR. Tento enzým nepreukázal žiadnu výraznú zmenu v aktivite u oboch bunčných líniiach po ovplyvnení izoflavonoidmi. Ani u týchto dvoch enzýmov, AKR1A1 a CBR, tieto výsledky nepodporili iné testovania.

Trošku výraznejšie zmeny aktivity sme preukázali u enzýmu GST, ale len čo sa týka bunčnej línii MCF-7, kde sa preukázala signifikantné zníženie aktivity po 24 hodinovej inkubácii všetkými skúmanými izoflavonoidmi: genisteinom, daidzeinom aj formononetinom. Po 48 hodinovej inkubácii sa tento výsledok už bohužiaľ nepotvrdil. Po 72 hodinovej inkubácii sa účinok preukázal len u látky formononetin, kde ale zmena v aktivite znamenala naopak zvýšenie aktivity.

Zvýšenie v aktivite biotransformačných enzýmov vedie ku kanceroprotektívnemu účinku, pretože kancerotoxické látky sú skôr zmetabolizované na neaktívne metabolity (Appelt, a ďalší, 1999).

Všetky tieto pokusy sme vykonali 10 μ M roztokom izoflavonoidov. Čo sa týka výsledkov z pokusu u enzýmu GST, u genisteinu a daidzeinu po použití rovnakej koncentrácie sa zistil časovo závislý nárast aktivity enzýmu GST, ktorý bol pozorovateľný po dobu 12 hodín po podaní látok, ale do 24 hodín sa hladiny normalizovali (Lepri, a ďalší, 2013).

Ďalším z možných mechanizmov inhibície enzýmovej aktivity GST môže byť ich redoxný potenciál v redukování GSH. Ale v danej štúdií sa taktiež nezistili signifikantné účinky na zmeny v celkovej GST aktivite v pečeni potkanov v porovnaní s kontrolnou skupinou (Wiegand, a ďalší, 2009).

Ako už bolo spomínané vyššie, bolo zistené, že napríklad genistein má aj iný mechanizmus ovplyvňovania daných enzýmov. Okrem zmeny v aktivite, sprostredkováva zvýšenie hladiny GST prostredníctvom indukcie génu pre GST v mRNA a proteínovej expresii v ľudských prsných nenádorových bunkách. Budúce testy by mali byť zamerané na preukázanie účinkov vysokej spotrebe sójových izoflavonoidov na expresiu GST v prsných bunkách *in vivo* (Steiner, a ďalší, 2006) (Moon, a ďalší, 2007).

Enzýmy sú celkovo nadmerne exprimované v bunčných líniách, ktoré sú odolné voči liečbe a hlavne GST je nadmerne exprimovaný v rakovinových bunkách. V testoch *in vitro* na rekombinantných ľudských GST, získaných z *Escherichia coli*, kde boli použité vyššie dávky genisteinu a daidzeinu ako v našich testoch, 100 μ M, bola zistená u genisteinu až 93% inhibícia aktivity a v prípade daidzeinu sa aktivita znížila o 44 – 53% (Hayeshi, a ďalší, 2007) (Boušová, a ďalší, 2012).

Bohužiaľ už i tá koncentrácia použitá v našom testovaní, 10 μ M, je vyššia, než hladina izoflavonoidov, ktorá sa vyskytuje v plazme u populácii stravujúcej sa sójovými potravinami. Pri vyššom celkovom príjme izoflavonoidov sa vyskytuje riziko kumulácie týchto látok v tkanivách (Steiner, a ďalší, 2006).

Úloha izoflavonoidov v protirakovinových opatreniach je nepopierateľná. Najlepšia prevencia rakoviny pomocou izoflavonoidov je ich prijímanie v potrave už od malička (Mishra, a ďalší, 2009). Tým pádom by bolo vhodné pokračovať v podrobnejších výskumoch vplyvu týchto izoflavonoidov na aktivitu enzýmov podieľajúcich sa na biotransformácii cytostatík. Na potvrdenie výsledkov iných štúdií by sa mohli použiť vyššie koncentrácie látok, poprípade inkubácia po kratšiu dobu.

8 ZÁVER

Dosiahnuté výsledky sa dajú zhrnúť do nasledujúcich bodov:

1. U dvoch enzýmov sa nepotvrdila žiadna zmena aktivity po ovplyvnení izoflavonoidmi. Ide o enzýmy CBR a AKR1C.
2. Bunečná línia MCF-7 vykazovala výraznejšie zmeny v aktivitách ako línia MDA-MB-231, na ktorej sa podarilo zistiť len jednu zmenu v aktivite. Týka sa to enzýmu AKR 1A1 pomocou glycerinaldehydu, kde sa preukázalo zvýšenie aktivity po ovplyvnení izoflavonoidom formononetinom po dobu 24 hodín. Na druhej strane na bunečnej línii MCF-7 sa prejavila zmena v aktivite u enzýmov AKR 1A1 za použitia 4-pyridínkarboxaldehydu, kde bolo zistené zvýšenie aktivity po ovplyvnení po dobu 72 hodín daidzeinom a formononetinom. Čo sa týka enzýmu GST, tak po 24 hodinovej inkubácii so všetkými izoflavonoidmi sa prejavilo zníženie aktivity tohto enzýmu. Dlhšia inkubácia už daný výsledok nepotvrdila, naopak sa preukázal opačný účinok formononetinu po 72 hodinovej inkubácii – aktivita bola zvýšená.
3. Len v jednom prípade sa dosiahlo žiadaného výsledku – zníženie aktivity, u všetkých izoflavonoidov: znížená bola aktivita enzýmu GST na bunečnej línii MCF-7 po 24 hodinovej inkubácii.
4. Izoflavonoid formononetin sa zaslúžil o zmenu aktivity v bunkách MCF-7, aj MDA-MB, kde v troch prípadoch bola aktivita zvýšená (AKR1A1 glycerinaldehyd 24hod MDA-MB-231, AKR1A1 4-pyridínkarboxaldehyd 72hod a GST 72hod MCF-7) a u enzýmu GST znížil aktivitu u MCF-7 po 24hod. Dva krát sa preukázal vplyv daidzeinu na aktivitu enzýmov u buniek MCF-7, raz zvýšená u AKR1A1 4-pyridínkarboxaldehyd po 72 hod a raz znížená u enzýmu GST po 24hod. Len jeden krát sa prejavil inhibičný efekt genisteinu na aktivitu enzýmov, v tomto prípade GST u MCF7 po 24 hodinovom ovplyvnení.

9 POUŽITÁ LITERATÚRA

Appelt, Lisa C. a Reicks, Marla M. . 1999. Soy Induces Phase II Enzymes But Does Not Inhibit Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Carcinogenesis in Female Rats. *The Journal of Nutrition*. 1999, Zv. 129(10), s. 1820-1826.

Atkinson, Charlotte, Frankenfeld, CL a Lampe, JW. 2005. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Experimental Biology and Medicine*. 2005, Zv. 230(3), s. 155-170.

Bains, Onkar S., a iní. 2008. Two Allelic Variants of Aldo-Keto Reductase 1A1 Exhibit Reduced in Vitro Metabolism of Daunorubicin. *Drug Metabolism & Disposition*. 2008, Zv. 36(5), s. 904-910.

Borrás, Consuelo, a iní. 2006. Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFκB. *The FASEB Journal*. 2006, Zv. 12, s. 2136-2138.

Boušová, Iva a Skálová, Lenka. 2012. Inhibition and induction of glutathione S-transferases by flavonoids: possible pharmacological and toxicological consequences. *Drug Metabolism Reviews*. 2012, Zv. 44(4), s. 267–286.

Boušová, Iva, a iní. 2013. Naturally occurring flavonoids as inhibitors of purified cytosolic glutathione. *Xenobiotica*. 2013, Zv. 42(9), s. 872–879.

Coldham, Nick G. a Sauer, Maurice J. 2002. Genistein in the Rat: Gender-Related Differences, Potential Mechanisms of Biological Action, and Implications for Human Health. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2002, Zv. 164(2), s. 206–215.

de Oliveira, Diêgo Madureira , a iní. 2014. 8-Methoxypsoralen is a competitive inhibitor of glutathione S-transferase P1-1. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014, Zv. 8.

Dewi, Fitriya N., a iní. 2012. Endogenous and Exogenous Equol Are Antiestrogenic in Reproductive Tissues of Apolipoprotein E-Null Mice. *The Journal of Nutrition*. 2012, Zv. 142(10), s. 1829-1835.

Ding, Fei a Pen, Wei. 2015. Biological activity of natural flavonoids as impacted by protein flexibility: an example of flavanones. *Molecular BioSystems*. 2015, DOI: 10.1039/c4mb00662c.

DrugBank. [Online] [Dátum: 17. 1 2015.]
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB01645>.

Forrest, Gerald L. a Gonzalez, Basilio. 2000. Carbonyl reductase. *Chemico-Biological Interactions*. 2000, Zv. 1-2, s. 21–40.

Foster, Warren G., a iní. 2002. Detection of phytoestrogens in samples of second trimester human amniotic fluid. *Toxicology Letters*. 2002, Zv. 129(3), s. 199–205.

Franke, Adrian A., Halm, Brunhild M. a Ashburn, Leslie A. 2008. Isoflavones in children and adults consuming soy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008, Zv. 476(2), s. 161–170.

Frankenfeld, Cara L. 2011. O-Desmethylangolensin: The Importance of Equol's Lesser Known Cousin to Human Health. *Advances in Nutrition*. 2011, Zv. 2, s. 317-324.

Hayeshi, Rose, a iní. 2007. The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin. *Food and Chemical Toxicology*. 2007, Zv. 45(2), s. 286–295.

Heim, Kelly E., Tagliaferro, Anthony R. a Bobilya, Dennis J. . 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002, Zv. 13.

Huang, Wu-Yang, Cai, Yi-Zhong a Zhang, Yanbo. 2010. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer*. 2010, Zv. 62(1), s. 1–20.

Hyndmana, David, a iní. 2003. The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chemico-Biological Interactions*. 2003, Zv. 143–144, s. 621–631.

Chang, Hebron C., a iní. 2000. Mass Spectrometric Determination of Genistein Tissue Distribution in Diet-Exposed Sprague-Dawley Rats. *The Journal of Nutrition*. 2000, Zv. 130(8), s. 1963-1970.

Jackson, Richard L., Greiwe, Jeffrey S. a Schwen, Richard J. 2011. Emerging evidence of the health benefits of S-equol, an estrogen β receptor. *Nutrition Reviews*. 2011, Zv. 69(8), s. 432–448.

Jez, Joseph M., Flynn, T.Geoffrey a Penning, Trevor M. 1997. A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochemical Pharmacology*. 1997, Zv. 54(6), s. 639–647.

Jin, YM, a iní. 2014. In vitro and in vivo anti-cancer activity of formononetin on human cervical cancer cell line HeLa. *Tumour Biology*. 2014, Zv. 35(3), s. 2279-2284.

Ju, Young H., a iní. 2002. Dietary Genistein Negates the Inhibitory Effect of Tamoxifen on Growth of Estrogen-dependent Human Breast Cancer (MCF-7) Cells Implanted in Athymic Mice. *Cancer Research*. 2002, Zv. 62, s. 2474 –2477.

Kaiserová, Helena a Kvasníková, Eva. 2005. Inhibition study of rabbit liver cytosolic reductases involved in daunorubicin toxication. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2005, Zv. 20(5), s. 477–483.

Lamartiniere, Coral A., a iní. 2002. Daidzein: Bioavailability, Potential for Reproductive Toxicity, and Breast Cancer Chemoprevention in Female Rats. *Toxicological Sciences*. 2002, Zv. 65, s. 228–238.

Lepri, Sandra Regina, a iní. 2013. Chemoprotective activity of the isoflavones, genistein and daidzein on mutagenicity induced by direct and indirect mutagens in cultured HTC cells. 2013, Zv. 65(2), s. 213–222.

Liu, Xiao-Jia, a iní. 2014. Up-regulating of RASD1 and Apoptosis of DU-145 Human Prostate Cancer Cells Induced by Formononetin in Vitro. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014, Zv. 15(6), s. 2835-2839.

Liu, YL, a iní. 2013. Study on intestinal absorption of formononetin in *Millettia nitita* var. *hirsutissima* in rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2013, Zv. 38(20), s. 3571-3575.

Marchand, Loïc Le. 2002. Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2002, Zv. 56(6), s. 296–301.

Mishra, Prachi, Kar, Anand a Kale, Raosaheb K. 2009. Prevention of chemically induced mammary tumorigenesis by daidzein in pre-pubertal rats: the role of peroxidative damage and antioxidative enzymes. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2009, Zv. 325(1-2), s. 149-157.

Moon, Young Jin , Brazeau, Daniel A. a Morris, Marilyn E. 2007. Effects of Flavonoids Genistein and Biochanin A on Gene Expression and Their Metabolism in Human Mammary Cells. *Nutrition and Cancer*. 2007, Zv. 57(1), s. 48-58.

Novotna, Romana, a iní. 2008. Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo–keto reductase (AKR) 1C3. *Toxicology Letters*. 2008, Zv. 1, s. 1–6.

Park, Jin, a iní. 2005. Formononetin, a phyto-oestrogen, and its metabolites up-regulate interleukin-4 production in activated T cells via increased AP-1 DNA binding activity. *Immunology*. 2005, Zv. 116(1), s. 71–81.

Penning, Trevor M. 2014. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions*. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.09.024. 2014.

Pépin, Nicolas Lacroix, Chapdelaine, Pierre a Fortier, Michel A. 2013. Evaluation of the prostaglandin F synthase activity of human and bovine aldo-keto

reductases: AKR1A1s complement AKR1B1s as potent PGF synthases. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2013, Zv. 106, s. 124–132.

PubChem. [Online] [Datum: 17. 1. 2015.]
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/genistein#section=Methods-of-Manufacturing>.

Rafii, Fatemeh. 2015. The Role of Colonic Bacteria in the Metabolism of the Natural Isoflavone Daidzin to Equol. *Metabolites*. 2015, Zv. 5(1), s. 56-73.

Roberts, Dean W., a iní. 2004. Inhibition of Extrahepatic Human Cytochromes P450 1A1 and 1B1 by Metabolism of Isoflavones Found in *Trifolium pratense* (Red Clover). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, Zv. 52, s. 6623-6632.

Ruf, TF, a iní. 2009. Atorvastatin reduces the expression of aldo-keto reductases in HUVEC and PTEC. A new approach to influence the polyol pathway. 2009, Zv. 32(3), s. 219-228.

Setchell, Kenneth D. R., a iní. 2003. Bioavailability, Disposition, and Dose-Response Effects of Soy Isoflavones When Consumed by Healthy Women at Physiologically Typical Dietary Intakes. *The Journal of Nutrition*. 2003, Zv. 133(4), s. 1027-1035.

Sfakianos, Jeff, a iní. 1997. Intestinal Uptake and Biliary Excretion of the Isoflavone Genistein in Rats. *The Journal of Nutrition*. 1997, Zv. 127, s. 1260 – 1268.

Shon, Yun-Hee, Park, Sun-Dong a Nam, Kyung-Soo. 2006. Effective Chemopreventive Activity of Genistein against Human Breast Cancer Cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2006, Zv. 39(4), s. 448-451.

Schultz, Mary, Dutta, Seema a Tew, Kenneth D. 1997. Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997, Zv. 2-3, s. 91–104.

Skálová, Lenka, Boušová, Iva a a kol. 2013. *Metabolizmus léčiv a jiných xenobiotik*. Praha : Karolinum, 2013. ISBN 9788024619170.

Smith, PK, a iní. 1985. Measurement of Protein using Bicinchonic Acid. *Analytical Biochemistry*. 1985, Zv. 150, s. 76-85.

Steiner, Claudia, a iní. 2006. Genistein protects human mammary epithelial cells from benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and 4-hydroxy-2-nonenal genotoxicity by modulating the glutathione/glutathione S-transferase system. *Carcinogenesis*. 2006, Zv. 28(3), s. 738-748.

Szotáková, Barbora, a iní. 2013. Inhibitory effect of anthocyanidins on hepatic glutathione S-transferase, UDP-glucuronosyltransferase and carbonyl reductase activities in rat and human. *Xenobiotica*. 2013, Zv. 43(8), s. 679–685.

Tolleson, William H., a iní. 2002. Metabolism of Biochanin A and Formononetin by Human Liver Microsomes in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, Zv. 50, s. 4783-4790.

TutorVista. [Online] [Dátum: 14. 1 2015.]
<http://chemistry.tutorvista.com/organic-chemistry/phenolic-compounds.html>.

Uehara, Mariko. 2013. Isoflavone metabolism and bone-sparing effects of daidzein-metabolites. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2013, Zv. 52(3), s. 193–201.

Wiegand, Heike, a iní. 2009. Effect of Dietary Genistein on Phase II and Antioxidant Enzymes in Rat Liver. *Cancer Genomics and Proteomics*. 2009, Zv. 6(2), s. 85-92.

Wsol, Vladimír, a iní. 2007. Aldo-keto reductases (AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the carbonyl reduction of the novel anticancer drug oracin in man. *Toxicology*. 2007, Zv. 2-3, s. 111–118.

Yun, KU, a iní. 2010. Age-related changes in hepatic expression and activity of cytochrome P450 in male rats. *Toxicogenomics*. 2010, Zv. 84(12), s. 939-946.

Zhou, R, a iní. 2014. Formononetin Inhibits Migration and Invasion of MDA-MB-231 and 4T1 Breast Cancer Cells by Suppressing MMP-2 and MMP-9 Through PI3K/AKT Signaling Pathways. *Hormone and Metabolic Research*. 2014, Zv. 46(11), s. 753-760.