

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: BIOCHEMIE

Studijní obor: BIOCHEMIE



Zdislava Bošíková

**Vliv dihydromyricetinu a myricetinu na vybrané
biotransformační enzymy**

**The effect of dihydromyricetin and myricetin on selected
biotransformation enzymes**

Diplomová práce

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

Praha, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením svého školitele prof. RNDr. Petra Hodka, CSc., a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 15. 8. 2016

.....
Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za cenné rady, shovívavost a trpělivost při psaní této práce.

Dále bych ráda poděkovala RNDr. Radce Václavíkové, Ph.D., která mi poskytla návod a chemikálie potřebné pro uskutečnění části mé práce a Mgr. Michaele Bebové, se kterou byla pohodová spolupráce. Musím poděkovat též celému kolektivu studentů biochemie za vytvoření příjemného prostředí pro práci a za obětavou pomoc vždy když bylo třeba. Na závěr také děkuji za neúnavnou trpělivost a podporu rodiny a přátel nejen při tvorbě této práce, ale i během celého studia.

Tato práce byla financována z grantu P303/12/G163 grantové agentury ČR.

Abstrakt

Flavonoidy jsou přírodní látky běžně přijímané v rostlinné potravě. Jsou jim přisuzovány pozitivní účinky na lidský organismus, především antioxidační, hepatoprotektivní a protirakovinné účinky. V současnosti je možné konzumovat vysoké koncentrace těchto látek ve formě potravních doplňků. Není však jisté, zda i v takto nepřírodně vysokých množstvích jsou flavonoidy stále prospěšné, či již škodlivé. Bylo například dokázáno, že flavonoidy mohou ovlivňovat aktivitu biotransformačních enzymů a tím zasahovat mimo jiné i do procesu karcinogeneze či metabolismu léčiv. Z toho důvodu je tedy důležité zkoumat možné důsledky zvýšeného příjmu flavonoidů.

V této diplomové práci byl zkoumán vliv dihydromyricetinu (potenciální lék závislosti na alkoholu) a jemu strukturně podobnému myricetinu na aktivitu cytochromu P450 2E1 (CYP2E1) a N-acetyltransferas 1 a 2 (NAT1/2). Sledován byl jak vliv premedikace potkanů těmito flavonoidy na expresi a aktivitu těchto enzymů, tak i schopnost myricetinu a dihydromyricetinu inhibovat aktivitu CYP2E1 a NAT1/2.

U CYP2E1 nebyla zaznamenána modulace na proteinové úrovni po premedikaci flavonoidy oproti kontrole. Dihydromyricetin ani myricetin neinhibovaly aktivitu CYP2E1 při koncentracích nižších než 1 mM respektive 0,1 mM.

V případě NAT1/2 nebylo pozorováno zvýšení exprese ani aktivity v preparátech jater a střev premedikovaných potkanů. Pouze v proximální části tenkého střeva byla po premedikaci myricetinem snížena aktivita potkaní NAT2 o více než 80%. Myricetin a dihydromyricetin byly prokázány jako inhibitory lidských rekombinantních NAT. Byly stanoveny hodnoty IC_{50} myricetinu pro NAT1 a NAT2 jako 3,5 μ M a 3,7 μ M, dihydromyricetin vykazoval slabší inhibiční schopnost s hodnotami IC_{50} 8,5 μ M pro NAT1 a 8,9 μ M pro NAT2.

Dihydromyricetin ani myricetin neovlivňují aktivitu CYP2E1, oba flavonoidy jsou však inhibitory NAT.

Klíčová slova: Cytochromy P450, N-acetyltransferasy, Metabolismus, Indukce

Abstract

Flavonoids are natural compounds commonly ingested in herbs and vegetables. They are believed to have a positive impact on human organism, in particular by their antioxidant, hepatoprotective and anti-cancer effects. In these days, it is possible to consume high concentrations of these compounds in form of dietary supplements. However it is not clear, whether flavonoids in such unnaturally high concentrations are still beneficial or rather harmful. It has already been proven, that flavonoids can influence the activity of biotransformation enzymes and interfere e.g. with the process of carcinogenesis and drug metabolism. For that reason it is important to investigate the impact of an increased intake of flavonoids.

The aim of this thesis was to investigate the influence of dihydromyricetin (a potential drug to cure alcohol use disorder) and its structurally similar flavonoid myricetin on the activity of enzymes, cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) and N-acetyltransferases 1 and 2 (NAT1/2). The research included the determination of the impact of a premedication by these flavonoids on the expression and activity of CYP2E1 and NAT1/2. The inhibition capacity of myricetin and dihydromyricetin towards the activity of CYP2E1 and NAT1/2 was also investigated.

After the flavonoid premedication of rats the expression of CYP2E1 at its protein level did not differ from that of untreated control. The activity of CYP2E1 wasn't inhibited in an observed range of flavonoid concentrations (less than 0.1 mM).

An increase of the expression or the activity of NAT1/2 wasn't detected in isolated hepatic and intestinal cytosols of premedicated rats. Only in a proximal part of a small intestine the activity of NAT2 was decreased (more than 80%) after the myricetin premedication. The both flavonoids were proven to be inhibitors of human recombinant NAT. IC_{50} were determined as 3.5 μ M and 3.7 μ M for myricetin towards NAT1 and NAT2 respectively, and 8.5 μ M and 8.9 μ M for dihydromyricetin towards NAT1 and NAT2.

Neither dihydromyricetin nor myricetin influenced the activity of CYP2E1, whereas both flavonoids are inhibitors of NAT.

Key words: Cytochromes P450, N-acetyltransferases, Metabolism, Induction

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
1. Úvod	9
1.1 Flavonoidy	10
1.1.1 Myricetin	12
1.1.2 Dihydromyricetin	14
1.2 Biotransformace	17
1.3 První fáze biotransformace	18
1.3.1 Cytochromy P450	18
1.3.2 CYP2E1	22
1.4 Druhá fáze biotransformace	24
1.4.1 Arylamine N-acetyltransferasy	25
1.4.2 NAT1	26
1.4.3 NAT2	27
2. Cíl práce	29
3. Materiál a metody	30
3.1. Chemikálie a materiál	30
3.2. Přístroje	32
3.3 Metody	34
3.3.1 Premedikace	34
3.3.2 Izolace cytosolárních a mikrosomálních frakcí	34
3.3.3 Stanovení koncentrace proteinů	36
3.3.4 Diskontinuální elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsiranu sodného	37
3.3.5 Western blot	39
3.3.6 Inhibice aktivity CYP2E1 působením DHM	41
3.3.7 Stanovení aktivity NAT v cytosolárních vzorcích	42
3.3.8 Inhibice aktivity NAT působením DHM a MYR	45
4. Výsledky	46
4.1 Stanovení koncentrace proteinů v izolovaných vzorcích	46
4.2 Western blot	47
4.3 Inhibice aktivity CYP2E1 působením DHM	51
4.4 Stanovení aktivity NAT v cytosolárních vzorcích	53
4.5 Inhibice aktivity NAT působením DHM a MYR	58
5. Diskuze	61
6. Souhrn	66
7. Seznam použité literatury	67

Seznam použitých zkratek

AhR	receptor aromatických uhlovodíků/ aryl hydrocarbon receptor
BCA	4,4'- dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CBB	Coomassie brilliant blue
CYP	cytochrom P450
DHM	dihydromyricetin
DTNB	5.5'dithio-bis-(2-nitrobenzoová kyselina)
ER	endoplasmatické retikulum
Gua-HCl	guanidin hydrochlorid
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MEOS	mikrosomální ethanol oxidující systém
MFO	mikrosomální monooxygenasový systém / mixed function oxidases
MYR	myricetin
NBT	nitrotetrazolová modř
NIH	Národní institut pro zdraví/ National Institutes of Health
NADPH-GS	NADPH-generující systém
PABA	<i>p</i> -aminobenzoová kyselina
PBS	isotonický fosfátový pufr
ROS	reaktivní formy kyslíku
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na nepolárních absorbentech (RP= reverse phase)
RPM	otáčka za minutu/ rotation per minute
SDS-PAGE	Diskontinuální elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného

SMZ	sulfamethazin
Tris/HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem
WHO	Světová zdravotnická organizace/ World Health Organization
6-OHCLZ	6-hydroxychlorzoxazon

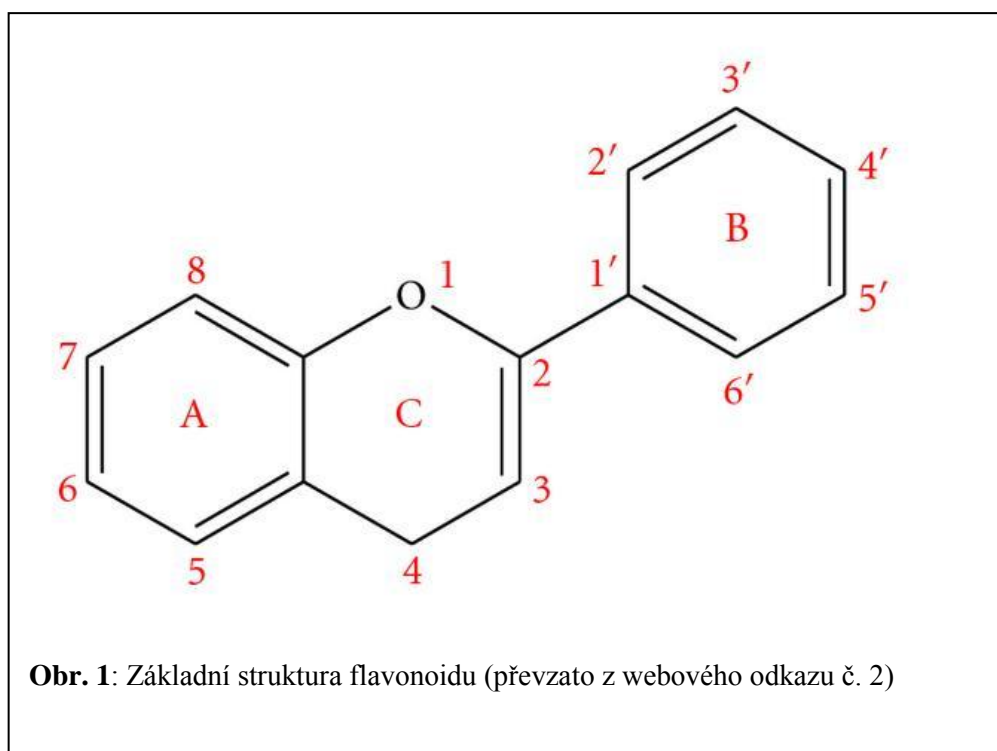
1. Úvod

V současné době vzrůstá zájem společnosti o znalosti týkající se přírodních látek. Odborná veřejnost využívá tyto vědomosti k vývoji nových léčiv a optimalizaci léčebných postupů. Také je populární zajímat se o zdravý životní styl a stravovací návyky a využívat přírodní látky ve formě potravních doplňků. Mezi zkoumané sloučeniny patří především látky rostlinného původu, u kterých již existují předpoklady o jejich biologické aktivitě díky dlouhodobým zkušenostem s užíváním dané rostliny. Jako zdroje informací v tomto případě slouží tradiční bylinkářství užívané například v čínské medicíně, indické ájurvédě, ale i mezi africkými kmeny či v indiánské kultuře. Léčivé rostliny jsou nejstarším terapeutickým prostředkem využívaným po tisíce let, jejich využití však ve vyspělých zemích pokleslo v polovině dvacátého století díky rozvoji syntetické výroby léčiv. V posledních desetiletích byl ale opět zaznamenán nárůst zájmu o fytoterapii a to i ze strany odpovědných zdravotnických orgánů jako je World Health Organization (WHO, Světová zdravotnická organizace, web. odkaz č.1) či National Institutes of Health (NIH, Národní institut pro zdraví), které finančně podporují výzkum a upravují pravidla pro výrobu léčebných přípravků či potravních doplňků rostlinného původu (Zhang A.L. a kol., 2011). Mezi biologicky aktivní látky izolované z rostlin patří především alkaloidy, glykosidy, terpeny a také flavonoidy (Springob K a Kutchan T.M., 2009)

Větší část výzkumů se přirozeně zabývá hledáním pozitivních efektů daných přírodních látek na lidský organismus, zatímco studiu možných negativních důsledků konzumace těchto, pro tělo cizích látek, takzvaných xenobiotik, je dán menší význam. Přitom již dnes jsou známé lékové interakce při požití určitých přírodních přípravků, například snížení účinnosti warfarinu po konzumaci extraktu z třezalky tečkované (Yue Q.Y., 2000). Tyto interakce jsou způsobeny vlivem xenobiotik na aktivitu enzymů, jejichž substráty jsou jak endogenní látky tak i cizorodé. Jelikož dnešním trendem je konzumace přírodních látek, včetně flavonoidů, ve formě potravních doplňků v množství mnohonásobně převyšujícím přirozenou koncentraci v potravě, je důležitou otázkou, zda takto nemohou být ovlivněny biotransformační enzymy a tím i ohroženo zdraví člověka.

1.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou přírodní sloučeniny vyskytující se v rostlinách a některých houbách. Jako první byl ve 30 letech izolován rutin z citrusových plodů. Základní struktura flavonoidu (obr. 1) je složena z 15 uhlíků ve dvou benzenových jádrech propojených pyranovým kruhem, které jsou dále modifikovány navázáním hydroxyskupin, ketoskupin či hydratací dvojně vazby na druhém uhlíku pyranového kruhu. Dle úrovně oxidace jsou flavonoidy řazeny do jednotlivých skupin: flavony, flavonoly, flavanony, isoflavony, anthokyanidiny a další. V přírodě se vyskytují především v glykosylované formě, ale mohou existovat i jako aglykony či methylované deriváty (Kumar S., Pandey A.K., 2013).



Flavonoidy jsou sekundárními metabolity rostlin a jsou syntetizovány fenylypropanoidní cestou z fenylyalaninu a malonátu (Winkel-Shirley B., 2001). Jejich význam v rostlinách je různý, zatímco anthocyaniny jsou nejčastěji barviva květů a hrají roli v několika krocích při rozmnožování rostlin, jiné flavonoidy mohou regulovat rostlinný růst či působit jako ochrana před UV zářením, hmyzem, býložravci a patogeny (Yao L.H. a kol. 2004, Stevenson D.E., 2007). Mezi další vlastnosti flavonoidů patří jejich

antioxidační schopnost, tedy vychytávání volných radikálů produkovaných například při fotosyntéze. Tento antioxidační efekt bývá častým předmětem vědeckých výzkumů a flavonoidy jsou díky němu slibnými zdraví prospěšnými sloučeninami.

V potravě jsou flavonoidy přijímané především v ovoci a zelenině, ale také v koření, bylinkách a rostlinných produktech jako jsou čaje či víno. Jejich příjem je závislý na množství konzumovaných potravin obsahujících flavonoidy, ale obecně je vyšší v porovnání s jinými prospěšnými látkami, například vitaminy. Zatímco příjem vitamínu C se pohybuje kolem 70 mg/den, vitamínu E 7-10 mg/den a β -karotenu 2-3 mg/den, příjem flavonoidů může dosahovat až 50-800 mg/den (Pietta P.G., 2000). V dnešní době je na trhu k dostání také velké množství rostlinných extraktů či přímo koncentrovaných flavonoidů, takže je možné jejich příjem uměle suplementovat. Na druhou stranu takový nepřirozený příjem cizorodých látek ve formě potravních doplňků může mít i negativní dopad na lidský organismus, jelikož jejich účinky ještě nejsou dostatečně prozkoumány.

Z pozitivních účinků na člověka přisuzovaných flavonoidům je nejznámější jejich antioxidační efekt. V buňkách se přirozeně vyskytují reaktivní formy kyslíku (ROS), kde jsou vedlejšími produkty reakcí především v mitochondriích, peroxisomech a endoplasmatickém retikulu. Jedná se například o superoxidový kyslíkový radikál ($O_2^{\cdot-}$), singletový kyslík (1O_2), peroxid vodíku (H_2O_2), nebo také vysoce reaktivní hydroxylový radikál (OH). Hladina ROS je regulována endogenním antioxidačním systémem, do kterého patří například superoxid dismutasa, glutathion-S-transferasa, glutathion, ceruloplasmin a další. ROS hrají roli v proliferaci buněk, ale i v jejich stárnutí a apoptóze. Za fyziologických koncentrací fungují jako signalizační molekuly. Jejich koncentrace však mohou být zvýšeny působením vnějších vlivů, například kouřením, konzumací alkoholu a léčiv, působením UV záření a znečištěným ovzduším. Zvýšené hodnoty ROS mají za následek oxidativní poškození biomakromolekul včetně DNA (modifikaci bází, duplikaci genů), které mohou vést i k aktivaci onkogenů a iniciaci a promoci karcinogeneze. S oxidativním stresem bývají spojená také jiná onemocnění, jako jsou diabetes, ateroskleróza a neurodegenerativní onemocnění (Waris G. a Ahsan H., 2006, Gupta S.C. a kol., 2012).

Zvýšením příjmu cizorodých antioxidačních látek, například flavonoidů, je možné snížit koncentraci ROS vzniklých oxidativním stresem a tím omezit tvorbu defektních makromolekul. Flavonoidy mohou přímo vychytávat ROS, nebo indukovat tvorbu

endogenních antioxidantů. Také mohou snižovat tvorbu ROS inhibicí enzymů, které je produkují, či chelatací iontů potřebných pro správnou funkci těchto enzymů. Nejlepšími antioxidanty jsou aglykonní flavonoidy s nenasycenou vazbou mezi uhlíky 2 a 3 a karbonylovou skupinou na uhlíku 4. Důležitou roli hraje také množství a rozmístění hydroxylových skupin na kruhu B (Kumar S. a Pandey A.K., 2013). Bylo prokázáno, že konzumace flavonoidů snižuje oxidační status plasmy v závislosti na dávce (Heim K.E. a kol., 2002).

Kromě antioxidačního efektu jsou flavonoidy známé také pro své hepatoprotektivní, protirakovinné, antimikrobiální, protizánětlivé a protivirové účinky. Například u silybinu, quercetinu a morinu byla při pokusech *in vivo* na myších prokázána jejich schopnost zvrátit indukovaný hepatotoxický efekt mikrocystinu (Jayaraj R. a kol., 2007). Flavonoidy zde mohou, kromě ochrany jaterních buněk před působením ROS, také zabránit vstupu toxických látek do buňky a podporovat proliferaci buněk, čímž urychlují regeneraci jaterní tkáně (Jayaraj R. a kol., 2007, Kumar S. a Pandey A.K., 2013). Protirakovinný efekt byl prokázán například u genisteinu na *in vivo* i *in vitro* modelech (Barnes S., 1995). Ukázalo se také, že flavonoidy mohou mít pozitivní vliv na kognitivní funkce člověka (Lamport D.J. a kol., 2012).

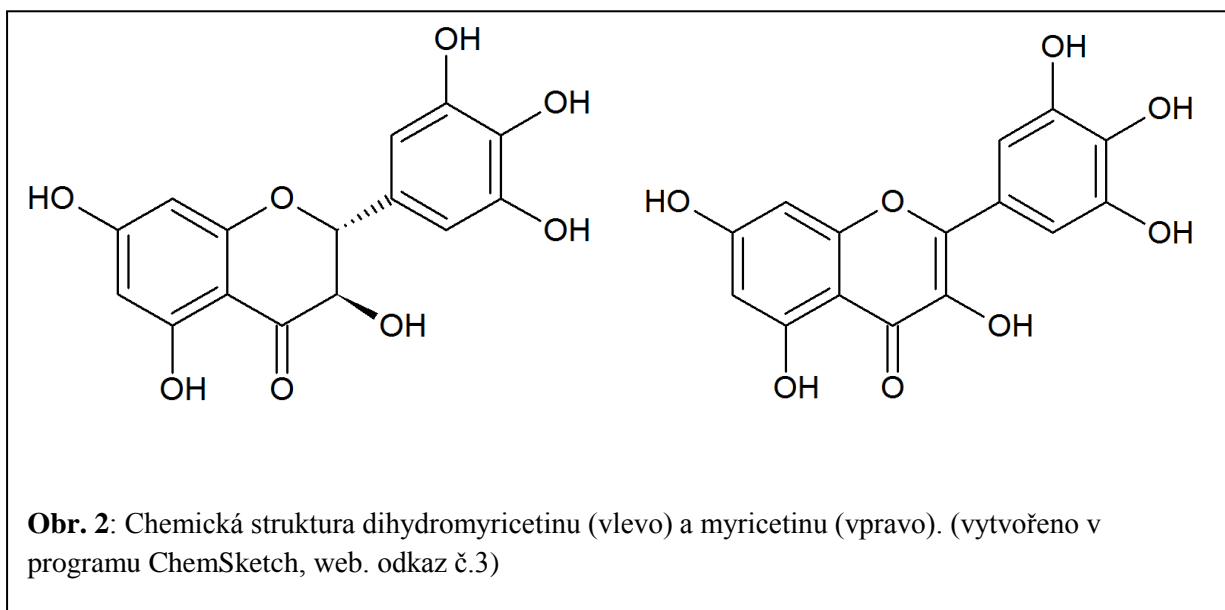
Působení flavonoidů však nemusí být vždy pozitivní. Studie na bakteriálních buněčných liniích prokázaly možnou mutagenitu a genotoxicitu některých flavonoidů. Ta může být způsobena tím, že flavonoidy nefungují vždy antioxidačně, ale za určitých podmínek také prooxidačně (Skibola C.F. a kol., 2000). Míra prooxidačních schopností jednotlivých flavonoidů přitom závisí na stejných strukturních znacích, jako jejich antioxidační vlastnosti (Heim K.E. a kol., 2002). Flavonoidy mohou také inhibovat některé enzymy, například topoisomerasu II a glutathion-S-transferasu, jeden z enzymů druhé fáze biotransformace (Skibola C.F. a kol., 2000).

1.1.1 Myricetin

Myricetin je známý flavonol, plným názvem 3,3',4',5,5',7-hexahydroxyflavon, který se běžně vyskytuje v zelenině, bylinách, ořechách a ovocných bobulích. Vzhledem k jeho

široké distribuci v konzumovaných potravinách je myricetin častým předmětem vědeckých studií a je o něm relativně velké množství informací týkajících se jeho účinků. Jeho struktura splňuje podmínky flavonoidu se silnými antioxidačními účinky, ale ze stejného důvodu může za určitých podmínek působit také prooxidačně (Ong K.C., Khoo H.E., 1997, Heim K.E. a kol., 2002). Jeho protirakovinné účinky souvisí se schopností inhibovat funkci některých biotransformačních enzymů (CYP3A4, CYP2C9), čímž omezují tvorbu karcinogenů aktivovaných právě těmito enzymy (Li C. a kol., 2011; Ong K.C., Khoo H.E., 1997). Myricetin také inhibuje arylalkylamin N-acetyltransferasu přímo v aktivním centru vázajícím acetylkoenzym A, čímž může ovlivnit hladinu melatoninu a tím cirkadiálního rytmu (Shin J.C. a kol., 2013).

V této práci byl myricetin vybrán jako komparativní sloučenina pro méně známý a méně prozkoumaný flavonoid dihydromyricetin (obr. 2). Tyto dvě látky se liší pouze dvojnou vazbou mezi druhým a třetím uhlíkem pyranového kruhu, obdobně jako například u dvojice quercetin - taxifolin.



1.1.2 Dihydromyricetin

Dihydromyricetin (DHM) je flavonoidní sloučenina s oficiálním názvem (2*R*,3*R*)-3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-on. Známý je výskyt této látky především ve dvou rostlinách, jimiž jsou *Hovenia dulcis* (česky Dužistopka sladká) a *Ampelopsis grossedentata* (obr. 3), podle níž se též daná sloučenina nazývá ampelopsin. *Hovenia dulcis* je strom z čeledi řešetlákovitých rostoucí ve východní Asii, především v Číně, Japonsku a Koreji. Jak český název napovídá, místo plodů, jimiž jsou tmavě hnědé tvrdé tobolky, jsou na této rostlině jedlé především zdužnatělé stopky těchto plodů (obr. 3), které svou chutí připomínají sladké rozinky se skořicí (Hyun T.K. a kol., 2010). Po tisíce let je extrakt z této rostliny využíván v tradiční východní medicíně pro zmírnění příznaků opilosti a také jako lék na poškozená játra, v čínském lékopisu (Chinese pharmacopoeia) je zařazen již od 6. století (Liang J., Olsen R.W., 2014). I v dnešní době je v Koreji komerčně dostupný extrakt z této rostliny prodáván pod názvem Condition, který údajně zlepšuje nepříjemné následky přílišné konzumace alkoholu (web. odkaz č. 6). Dle studií vodný extrakt z *Hovenie* významně zvyšuje aktivitu alkohol i aldehyddehydrogenasy při pokusech na zvířecích modelech. (Xu B., Sung C.K., 2005). *Ampelopsis grossedentata* je révovitá rostlina rostoucí především v Číně. Z jejích listů bývá vařen čaj, který je známý pro celou řadu prospěšných účinků (Kou X., Chen N., 2012) a je prodáván mimo jiné pod obchodním názvem Moyeam tea (web. odkaz č. 7). V sušině této rostliny tvoří DHM až 20 % hmotnosti (Du Q. a kol., 2002) a proto listy po vysušení mají bělavou barvu.



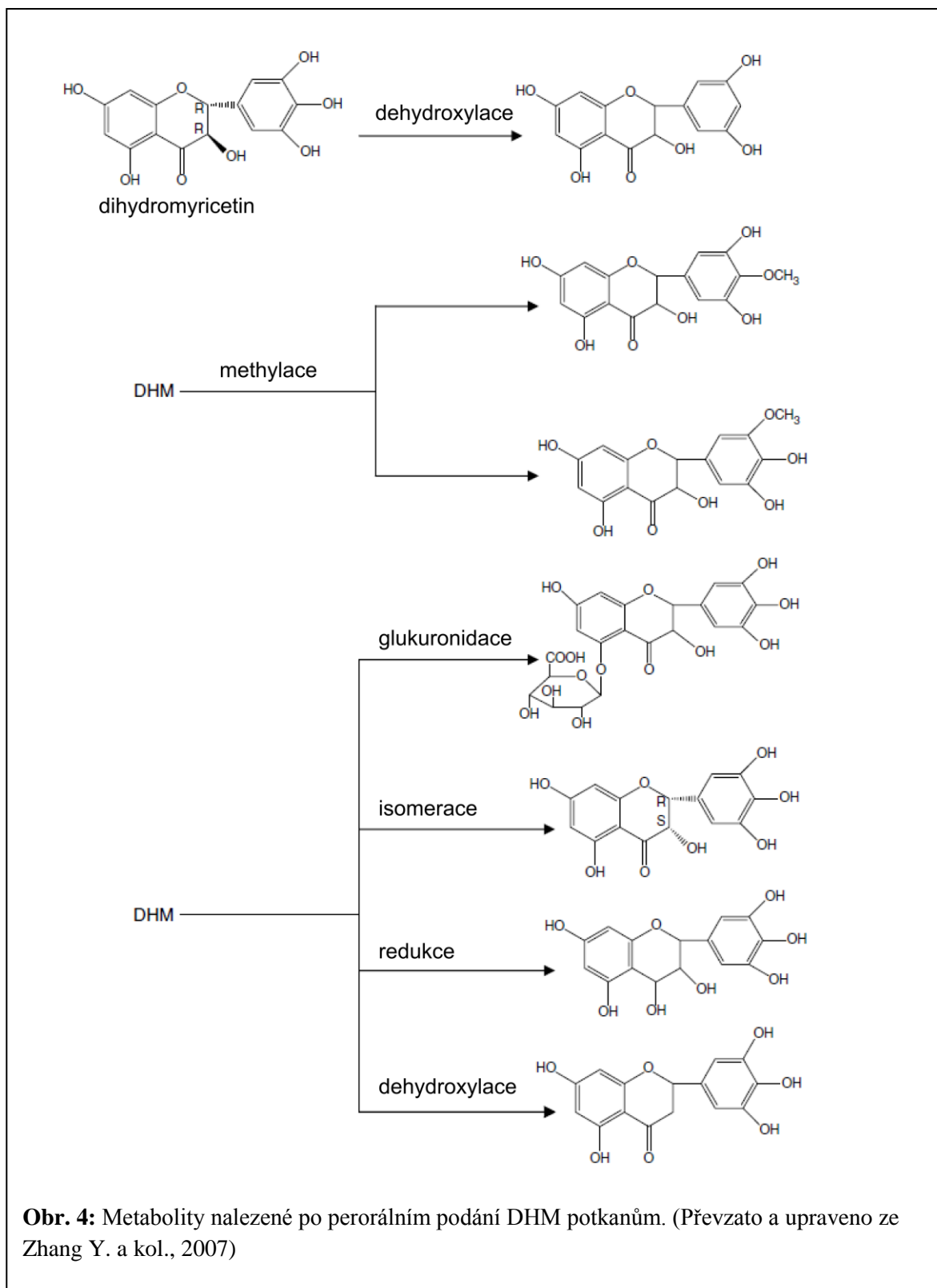
Obr. 3: Rostliny *Ampelopsis grossedentata* a *Hovenia dulcis*, převzato z webových stránek 4 a 5.

Účinky samotného DHM jsou zkoumány teprve v posledních desetiletích a ještě nejsou zcela definovány. Dosud byly doloženy antioxidační (Zhang Y.S. a kol., 2003) i protizánětlivé účinky (Hou X.L. a kol., 2015) a ukázalo se, že DHM může mít i protinádorový efekt (Zhang Q. a kol., 2014; Liu B. a kol., 2015). Jiné studie potvrdily pozitivní vliv DHM na fyzickou kondici jedince vystaveného hypoxii, například ve vyšších nadmořských výškách (Zou D. a kol., 2014). DHM také zvyšuje citlivost příčně pruhované svaloviny na insulin (Shi L. a kol., 2015). Mezi nejzajímavější patří studie týkající se vlivu DHM na účinky alkoholu a jeho odbourávání. Bylo zjištěno že DHM je antagonistou GABA receptorů (vzájících γ -aminomáselnou kyselinu). Díky tomu jsou při konzumaci alkoholu potlačovány typické příznaky opilosti, jako je ztráta stability. Dokonce může být zmírněna i plasticita GABA_A receptorů způsobená ethanolem projevující se závislostí na alkoholu. DHM u potkanů snižoval projevy abstinence, jako jsou úzkost a přecitlivělost, dokonce také snižoval chuť na konzumaci alkoholu (Shen Y. a kol., 2012). Z těchto důvodů se DHM nabízí jako potenciální léčivo závislosti na alkoholu. V nedávné studii bylo také zjištěno, že DHM by mohl fungovat jako ochrana před fetálním alkoholovým syndromem způsobeným nadměrnou konzumací alkoholu v těhotenství (Liang J., Olsen R.W., 2014).

DHM je možné zakoupit v tabletách jako potravní doplněk (web. odkaz č. 8), využívaný především pro jeho pozitivní efekt při akutní intoxikaci alkoholem a jeho následném odbourávání. DHM je velmi málo toxický s maximální tolerovanou dávkou u Wistar potkanů 5 g/kg (Su D. a kol., 2009). V tomto ohledu konzumace DHM v miligramových množstvích pravděpodobně není škodlivá. Jeho širšímu využití jako léčiva však kromě nedostatku dalších informací o dané látce brání také jeho slabá rozpustnost ve vodném prostředí. Mnohé studie se tedy zabývají vývojem rozpustnějších komplexů DHM, nejčastěji cheláty kovů, které navíc mohou mít i zvýšenou antioxidační či protinádorovou účinnost oproti samotnému DHM (Guo Q. a kol., 2012).

Co se týče tvorby metabolitů DHM, prozatím byla provedena pouze studie na potkanech, u kterých bylo v moči a stolici nalezeno 7 různých metabolitů (Zhang Y. a kol., 2007) po perorálním podání DHM (obr. 4 str. 17). Vliv DHM na biotransformační enzymy byl dosud studován jen velmi omezeně. Bylo například zjištěno, že dihydromyricetin je *in vitro* schopný inhibovat glutathion-s-transferasu (Yang X., Yang Z., 2010), která je jedním z důležitých enzymů druhé fáze biotransformace. Inhibicí tohoto inzymu *in vivo* by mohlo

docházet k hromadění toxických látek endogenního i exogenního původu a tím i k poškození organismu. Kromě studia pozitivních důsledků konzumace DHM je tedy nutné studovat i jeho vliv na aktivitu biotransformačních enzymů, aby byla zjištěna rizika při jeho případném farmaceutickém podání.



Obr. 4: Metabolity nalezené po perorálním podání DHM potkanům. (Převzato a upraveno ze Zhang Y. a kol., 2007)

1.2 Biotransformace

Člověk nežije jako izolovaný organismus. Pro svůj růst a vývoj nutně potřebuje výměnu látek s okolním prostředím a to ať již z hlediska příjmu živin tak i kvůli vylučování odpadních látek. Společně s přirozenými substráty metabolických reakcí potřebných k získání energie, stavebních jednotek či jen nízkomolekulárních látek potřebných ke správné funkci se do organismu dostávají také látky cizorodé. Jedná se o látky, které člověk může konzumovat vědomě, například léčiva či drogy, nebo nevědomě v případě polutantů prostředí, produktů tepelné úpravy potravin či jako přirozenou součást rostlinné potravy (Stiborová M. a kol., 2004). Tato xenobiotika, podobně jako léčiva, nejsou přirozenou součástí organismu, ale mohou specificky a pozitivně ovlivňovat jeho funkci. Na druhou stranu mezi xenobiotika patří i toxické a karcinogenní látky, které reagují s biomolekulami a mohou být příčinou nezvratného poškození DNA.

Polární cizorodé látky se do organismu dostávají hůře, jelikož pro jejich prostup přes hydrofobní buněčnou membránu využívají kanály či přenašeče za spotřeby energie. Hydrofilní sloučeniny jsou relativně snadno vylučovány a nedochází k jejich hromadění v organismu. Naopak hydrofobní xenobiotika snadno prochází membránou, mohou se dostat i do jádra a následně interagovat s DNA a přetrvávají v organismu delší čas (Knejzlík Z., Ruml T, 2000). Jejich vyloučení z těla bývá pomalejší, jelikož kvůli koncentračnímu gradientu tyto látky obvykle setrvávají uvnitř buněk a při procesu vylučování mohou být zpětně resorbovány. Aby nedocházelo k akumulaci hydrofobních xenobiotik v těle, existují enzymy, které vnášením polárních skupin do molekul zvyšují rozpustnost těchto látek ve vodném prostředí a tím usnadňují jejich vyloučení z organismu. V dnešní době jsou intenzivně zkoumány jak tyto biotransformační enzymy, tak i jejich substráty a modulátory aktivity, protože právě jejich aktivita může hrát zásadní roli ve zdraví jedince.

Většina biotransformačních reakcí probíhá v játrech, ale také v tenkém střevě, kůži a plicích, tedy v orgánech blízkých vstupu látek do organismu. Proces biotransformace probíhá ve dvou fázích, které však na sebe nemusí nutně navazovat. Jako třetí fáze bývá někdy označován samotný proces vylučování xenobiotika z organismu. Nejedná se však o pravou biotransformační fázi, při které by se měnily fyzikálně-chemické vlastnosti molekul, ale pouze o transport xenobiotik v rámci buněk i celého organismu.

1.3 První fáze biotransformace

V první fázi biotransformace, zvané též derivatizační, dochází ke zvýšení polaridy hydrofobních sloučenin a tedy i jejich rozpustnosti a následné reaktivity. Toho bývá docíleno tím, že je do molekuly buď přímo vnášena polární skupina (-OH, -COOH, -NH₂), nebo dochází k odkrytí těchto skupin. V této fázi biotransformace bývají využívány především oxidační, hydrolytické a redukční reakce, ale v menším zastoupení také reakce sulfoxidační, peroxidační či hydroxylační (Knejzlík Z., Ruml T, 2000). Enzymy zapojenými do této fáze jsou flavinové monooxygenasy, dioxygenasy, hydrolasy, peroxidasy, isomerasy, xanthinoxidasy a tzv. systémy monooxygenas se smíšenou funkcí (Mixed function oxidase system, MFO) jejichž součástí jsou cytochromy P450 (CYP) (Stiborová M. a kol., 2004, Schroer K. a kol., 2010).

MFO jsou významné především jako katalyzátory oxidačních, oxygenačních a redukčních dějů. Skládají se z několika komponent, z nichž svou roli hraje také buněčná membrána endoplasmatického retikula (ER) nebo mitochondrií, ve které je celý systém ukotven (Edwards R.J. a kol., 1991). Reakční sled katalyzovaný MFO je složený z jednotlivých oxidačně redukčních kroků, obdobně jako je tomu v dýchacím řetězci, a je při něm rozložena molekula O₂ na atomy, z nichž jeden bývá inkorporován do substrátové molekuly a druhý redukován na vodu. Zdrojem elektronů je NADPH, ze kterého jsou elektrony dále přenášeny pomocí ferredoxin reduktasy (v mitochondriích) nebo oxidoreduktasa s flavinovým kofaktorem (v ER) na CYP, který je terminální oxidasou celého MFO systému (Hannemann F. a kol., 2007, Cederbaum A.I., 2015). Součástí tohoto elektron-transportního řetězce může být také cytochrom b5 a jeho reduktasa (Hildebrandt A., Estabrook R.W., 1971).

1.3.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou hemthiolátové proteiny, které v aktivním centru mají ferroprotoporfyrin IX kovalentně navázaný přímo na protein přes sulfhydrylovou skupinu cysteinu. Tím se CYP zásadně liší od ostatních cytochromů, u kterých je hem, resp. ion železa vázaný pouze koordinační vazbou na imidazolový zbytek histidinu (Stiborová M. a kol., 1999). Název „cytochrom“ je tedy v tomto případě velmi zavádějící i z toho

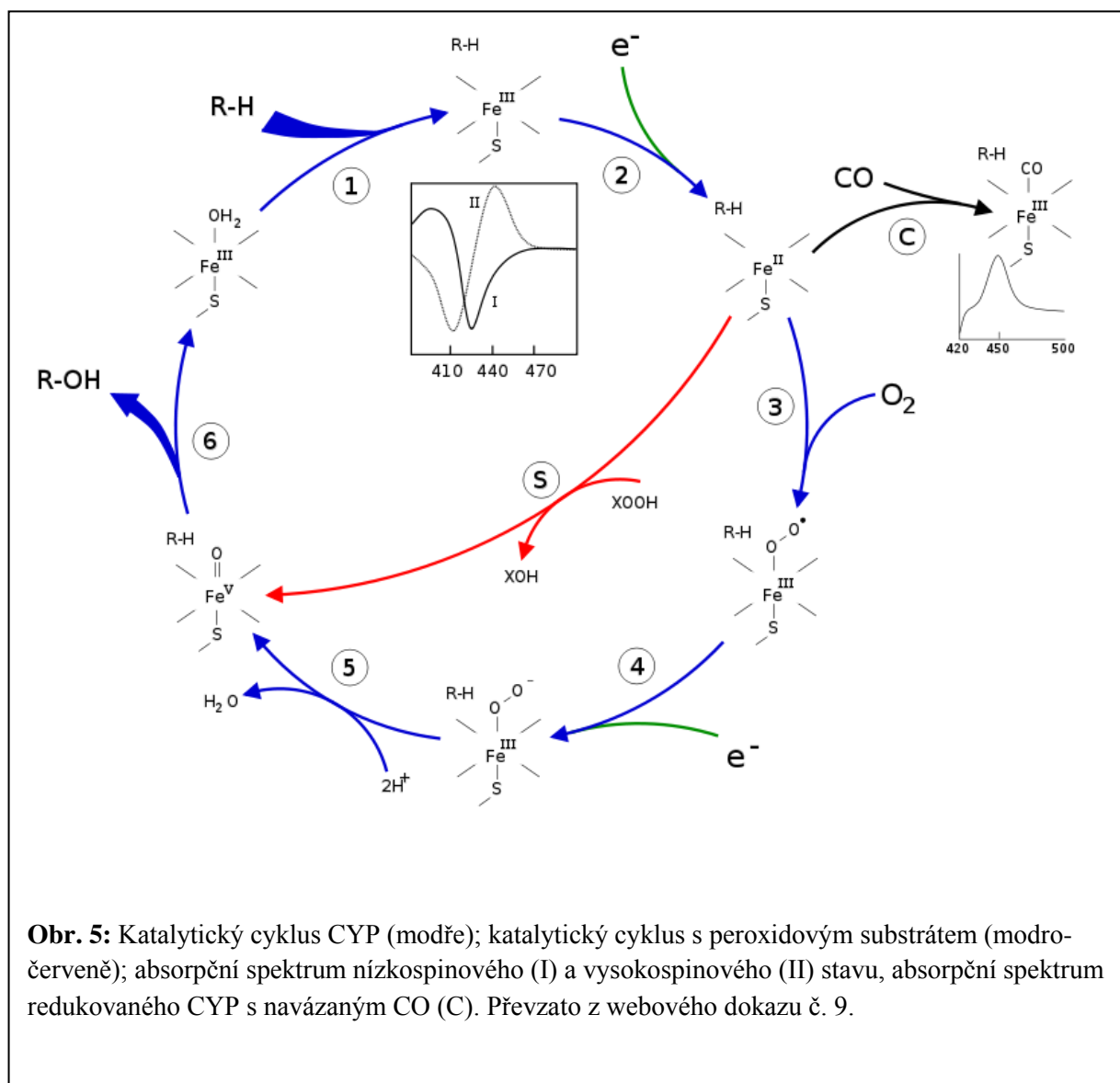
důvodu, že CYP zároveň vykazují enzymatickou aktivitu, avšak je nadále užíván z historických důvodů. Poprvé byly CYP popsány na konci 50. let 20. století M. Klingenbergem (1958) a D. Garfinklem (1958) jako zvláštní pigment vyskytující se v jaterních mikrosomech, který v redukovaném stavu v komplexu s oxidem uhelnatým vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 450 nm (obr. 5, str. 21). Následně byl také prokázán hemoproteinový charakter těchto pigmentů (Omura T., Sato R., 1962). Odtud tedy pochází název cytochrom, písmeno P jako pigment a číslovka 450 odvozená od vlnové délky typického absorpčního maxima Soretova pásu.

Evolučně se jedná o velmi staré proteiny. Předpokládá se, že všechny CYP mají svůj původ ve stejném předchůdci žijícím před více než 3 miliardami let. V současné době bylo celkově popsáno více než 18 tisíc genů u rozmanitých organismů od bakterií až po člověka. Konkrétně u lidí bylo nalezeno 57 genů a 58 pseudogenů kódujících CYP, které jsou na základě sekvenční podobnosti rozdělené do 18 rodin a 41 podrodin (Nebert D.W. a kol., 2013). Rodiny obsahují jednotlivé CYP s alespoň 40% sekvenční homologií a v nomenklatuře jsou označeny první arabskou číslicí. Podrodiny jsou geneticky identické alespoň z 55% a jejich symbolem je velké písmeno, zatímco jednotlivé isoformy CYP jsou opět značeny numericky (Nebert D.W. a kol., 1989).

Jak již bylo řečeno, CYP jsou složeny z proteinové složky a porfirinového skeletu na něj navázané. Eukaryotní CYP jsou vázány na fosfolipidovou dvojvrstvu membrán ER či mitochondrií prostřednictvím N-terminální hydrofobní domény tvořené 20-30 aminokyselinami. Hydrofilní část CYP je orientována směrem do cytosolu, obsahuje katalytické místo a tedy je zodpovědná za enzymatickou funkci CYP (Nelson D.R., Strobel H.W., 1988). Prokaryotní CYP bývají cytosolární, neukotvené v membráně, jejich proteinový řetězec je tedy kratší o chybějící hydrofobní doménu a krček (Stiborová M. a kol., 2004). Hem b (protoporfyrin IX), který tvoří neproteinovou složku CYP, obsahuje tetrapyrolové jádro vázající uprostřed 4 koordinačně-kovalentními vazbami atom železa. Pátou vazbou na atom Fe tvoří koordinačně-kovalentní vazba s thiolátovou sírou proteinu (Kadkhodayan S a kol., 1995).

Bez navázaného substrátu je Fe hexakoordinovaný šestou vazbou na molekulu vody a CYP se tak nachází v nízkospinovém stavu, při kterém vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 418 nm. Po navázání substrátu do aktivního místa dochází k vytlačení

H₂O. Atom železa je pentakoordinovaný a CYP se nachází ve vysokospinovém stavu s absorpčním maximem Soretova pásu při 390 nm (Kadkhodayan S a kol., 1995). Reakční mechanismus CYP probíhá ve dvou krocích (obr. 5.). Prvním je aktivace O₂, přičemž atom železa musí být nejprve redukován z trojmocného na dvojmocné. Elektrony jsou dodávány pomocí již výše zmíněného elektron-transportního řetězce v MFO jehož jsou CYP součástí. Ve druhém kroku je aktivovaná molekula kyslíku využita z jedné poloviny na hydroxylaci substrátu a druhý atom je současně redukován na vodu (Kadkhodayan S a kol., 1995; Cederbaum AI., 2015; Anzenbacher P., Anzenbacherová E., 2001; Denisov I.G. a kol., 2005). CYP však mohou místo molekuly O₂ vázat i peroxidy a využít peroxidový kyslík obdobným způsobem (White R.E. a kol., 1980).



Obr. 5: Katalytický cyklus CYP (modře); katalytický cyklus s peroxidovým substrátem (modročerveně); absorpční spektrum nízkospinového (I) a vysokospinového (II) stavu, absorpční spektrum redukováného CYP s navázaným CO (C). Převzato z webového dokazu č. 9.

CYP vykazují velmi širokou substrátovou specifitu. Jsou zapojeny jak do metabolismu a biosyntézy endogenních látek, například tromboxanu, prostacyklinu, cholesterolu či vitamínu D₃, tak do biotransformace xenobiotik (Rendic S., Di Carlo F.J., 1997). Z hlediska odbourávání cizorodých látek hrají důležitou roli především při metabolismu léčiv a karcinogenů. Například příliš vysoká aktivita může být důvodem rychlého odbourávání farmaceutik a tím snížením jejich účinnosti a naopak inhibice funkce CYP může být příčinou nechtěného předávkování účinnou látkou kvůli zpomalenému odbourávání (Danielson P.B., 2002). Působením CYP také nedochází pouze k odstranění toxických látek, ale naopak mohou katalyzovat přeměnu xenobiotik na aktivované karcinogeny, které vykazují vyšší reaktivitu než původní sloučeniny (prokarcinogeny). Příkladem takové aktivace je benzo(a)pyren, vznikající při nedokonalém spalování organických materiálů (kouření, pečení masa), který v těle bývá aktivován CYP1A1 na karcinogenní metabolit (Gelboin H.V., 1980)

Na aktivitu CYP mají vliv jak genetické predispozice (pohlaví, polymorfismus), tak i chemické modulátory spojené s životním stylem (stravovací návyky, kouření, konzumace alkoholu). Inhibice CYP může být ireverzibilní, částečně ireverzibilní či reverzibilní. Mezi ireverzibilní inhibitory patří takzvané „sebevražedné substráty“. Ty jsou metabolizovány CYP za tvorby reaktivních produktů, které se ihned kovalentně váží do aktivního centra enzymu, ve kterém se právě nachází. Částečně ireverzibilní inhibice je způsobena koordinačně-kovalentní vazbou ligandu na protoporfyrin IX. Reverzibilní inhibice bývá kompetitivní či nekompetitivní a většinou při ní dochází k nekovalentní blokaci aktivního místa inhibitorem (Montellano P.R.O., Correia M.A., 1995). Specifické inhibitory mohou být využity ke studiu aktivity CYP a nabízí se zde také možnost jejich terapeutického využití (Zhou S. a kol. 2005). Mezi známé inhibitory patří grapefruitový džus (CYP3A4), erythromycin (CYP3A4), doxorubicin (CYP2D6), disulfiram (CYP2E1) (Danielson P.B., 2002).

Ke zvýšení aktivity CYP dochází na různých úrovních. Zprv může docházet přímo ke zvýšení aktivity enzymu působením aktivátoru (Ludwig E. a kol., 1999), což však nebývá zaznamenáno příliš často. K nárůstu celkové aktivity ale může dojít také díky zvýšené koncentraci CYP. Některé látky mohou zvyšovat stabilitu mRNA či přímo proteinu v buňce, což vede k nahromadění enzymu. K indukci však může docházet také přímo na transkripční úrovni (Danielson P.B., 2002). Existuje více druhů

jaderných receptorů zapojených do iniciace transkripce *CYP* genů, z nichž jedním z nejznámějších je „aryl-hydrocarbon receptor“ (AhR), který bývá aktivován polycyklickými aromatickými uhlovodíky a je zodpovědný za zvýšenou transkripci podrodin *CYP1A* a *CYP1B* (Honkakiski P., Negishi M., 2000).

Jak již bylo řečeno, cytochromy P450 jsou širokou rodinou enzymů katalyzující velké množství substrátů. Do metabolismu xenobiotik přitom zasahují jen první tři rodiny – CYP1, CYP2 a CYP3. Ostatní CYP katalyzuje metabolismus endogenních látek, především biosyntézu steroidů (CYP11, CYP17, CYP19 a CYP21), metabolismus mastných kyselin (CYP4), biosyntézu žlučových kyselin (CYP8), nebo také deaktivaci vitamínu D (CYP24) (Danielson P.B., 2002). Existují také CYP, u kterých dosud nebyl zjištěn jejich funkce a regulace a které proto bývají nazývány sirotčí CYP (z anglického „orphan“) (Stark K., Guengerich F.P., 2007). Ačkoli se o CYP mluví především v souvislosti s lidským zdravím, mají tyto enzymy možnosti využití i v jiných biotechnologických odvětvích. Díky vnesení genu *CYP* do DNA rostlin byly vytvořeny transgenní květiny s neobvyklými barvami (Ogata J. a kol., 2005) a své využití nalézají i jako biokatalyzátory při výrobě léčiv (Kumar S., 2010) či ve výzkumu bioremediace (Doty S.L. a kol., 2007).

1.3.2 CYP2E1

Důležitou podrodinou zapojenou do metabolismu xenobiotik je podrodina cytochrom P450 2E. Podrodina CYP2E zahrnuje u lidí jednu isoformu a to CYP2E1. U těchto enzymů se často vyskytuje genetický polymorfismus, nikdy však nevede k celkové inaktivaci genu, což naznačuje jejich důležitou funkci v organismu (Gonzales F.J., 2007). Poprvé byl tento membránový protein popsán v 70. letech 20. století jako součást "mikrosomálního ethanol oxidujícího systému" (MEOS) (Lieber C.S. a kol., 1970). Později byl izolován a byla potvrzena jeho příslušnost k cytochromům P450 (Gonzales F.J., 2007). V lidském těle se nachází ve vyšších koncentracích především v játrech, ale byl nalezen také v jiných orgánech, jako jsou plíce, mozek, srdce, ledviny a kostní dřeň (Anzenbacher P., Anzenbacherová E., 2001). CYP2E1 je zapojen do mnoha toxikologicky významných reakcí, včetně odbourávání ethanolu, anestetik (efluran,

halothan), anilinu, halogenovaných uhlovodíků a paracetamolu (web. odkaz č. 10; Gonzales F.J., 2007). Jelikož většina substrátů CYP2E1 jsou malé molekuly, také jeho aktivní centrum je velmi malé v porovnání s ostatními CYP (Porubsky P.R. a kol., 2008).

Biotransformační reakce katalyzované CYP2E1 jsou mnohdy příčinou aktivace prokarcinogenů či toxinů (Gonzales F.J., 2007). Mezi nejznámější patří aktivace nitrosaminů, které se vyskytují v tabákovém kouři, a které následně působí genotoxicky (Guengerich F.P., 1991). Také paracetamol (acetaminofen) je metabolizován na vysoce reaktivní produkt, který se kovalentně váže na proteiny (Lee S.S.T. a kol., 1996, Manyike P.T. a kol., 2000), což bývá příčinou závažných jaterních selhání při předávkování tímto lékem.

Existuje více faktorů, jejichž působením dochází k indukci CYP2E. Mezi ně patří především chemické látky jako ethanol či aceton (Anzenbacher P., Anzenbacherová E., 2001; web. odkaz č. 10), ale také patologické stavy jako jsou hladovění (Hong J. a kol., 1987) či diabetes (Wang T. a kol., 2000). Chemická indukce může být způsobena zvýšením transkripce, stabilizací CYP2E1 mRNA či přímo stabilizací proteinu (Gonzales F.J., 2007, Anzenbacher P., Anzenbacherová E., 2001). Bylo zjištěno, že transkripce genu *CYP2E1* je ovlivněna jaterním jaderným faktorem 1 α (hepatocyte nuclear factor, HNF1 α) (Akiyama T.E., Gonzales F.J., 2003), a hormonálně regulována růstovým faktorem (GH) (Chen G.F. a kol., 1999). Mezi inhibitory CYP2E1 patří diethyldithiokarbamát či disulfiram (web. odkaz č. 10), z běžných potravin snižují aktivitu CYP2E1 například česnek a cibule obsahující dialylylsulfid (Ioannides C., 1999).

CYP2E1 je také intenzivně studován v souvislosti s hepatotoxicitou. Nejen díky své schopnosti aktivovat substráty za tvorby toxických produktů, jak je tomu v případě již zmíněných nitrosaminů a acetaminofenu, ale CYP2E1 mohou také vyvolat oxidační stres. Jako vedlejší produkt reakce CYP2E1 vznikají tzv. "reactive oxygen species" (ROS), které následně reagují s okolními biomolekulami včetně DNA, lipidů i proteinů. Tento proces bývá udáván jako jedna z příčin steatózy jater při chronickém alkoholismu (Yang L. a kol., 2014). Vychytávání ROS napomáhá v těle množství antioxidantních látek, především glutathion (GSH), nebo také antioxidanty přijímané v potravě, jako je vitamin E a fenolické sloučeniny (Lu Y., Cederbaum A.I., 2008; Khan R.A. a kol., 2012).

CYP2E1 hraje také důležitou roli v metabolismu ethanolu. Ethanol je zároveň substrátem i induktorem CYP2E1, což je příčinou jeho zrychleného odbourávání při chronickém alkoholismu. Pro léčbu závislosti na alkoholu je využíván disulfiram, který inhibuje alkoholdehydrogenasu i CYP2E1, tedy oba enzymy metabolizující ethanol (Carper W.R. a kol., 1987; Danielson P.B., 2002). Disulfiram však nemá vliv na receptory v mozku, jak je tomu v případě jiného potencionálního léčiva, dihydromyricetinu. Právě přímé působení na plasticitu mozku ovlivněnou dlouhodobou konzumací alkoholu je slibným směrem léčby této závislosti. Oproti disulfiramu DHM údajně zvyšuje aktivitu alkoholdehydrogenasy i aldehyddehydrogenasy (Shen Y. a kol., 2012), dosud však nebylo zjištěno, zda také ovlivňuje aktivitu CYP2E1.

1.4 Druhá fáze biotransformace

Druhá fáze biotransformace, označovaná jako konjugační, hraje také důležitou roli při odbourávání xenobiotik i endogenních sloučenin. Enzymy této fáze jsou především cytosolární transferázy. Ty katalyzují konjugační reakce, kdy na substrát připojí polární endogenní molekulu. Tato modifikace molekuly má za cíl detoxikaci a snadnější exkreci cizorodých látek z těla díky zvýšené hydrofilitě. Substráty této reakce mohou být jak produkty první fáze biotransformace, tak i sloučeniny které již mají funkční skupinu potřebnou pro reakci zabudovanou ve svém skeletu (Chen C.H., 2011). Enzymy této fáze biotransformace zahrnují UDP-glukuronosyltransferasy, sulfotransferasy, N-acetyltransferasy, glutathion-S-transferasy a methyltransferasy (Jancova P. a kol., 2010).

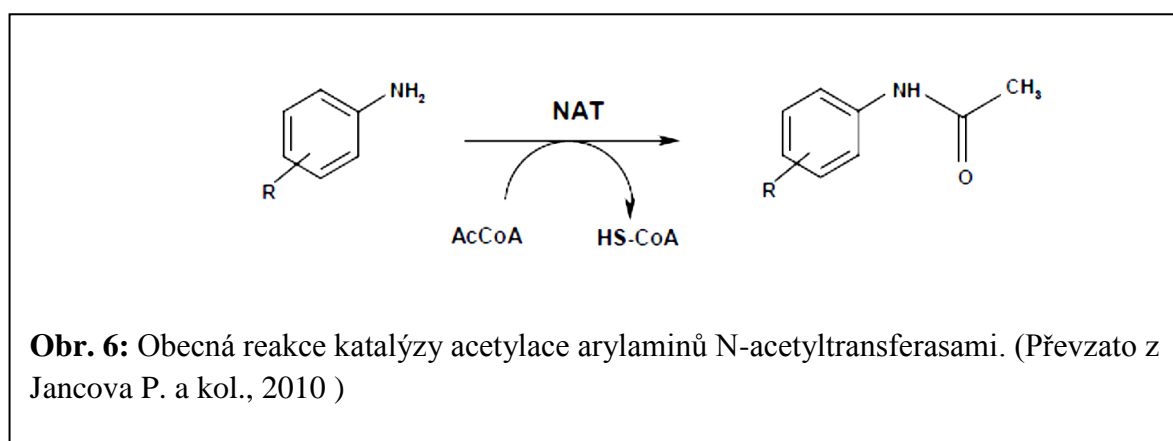
Výzkum týkající se enzymů druhé fáze biotransformace byl dlouho dobu zpomalen oproti cytochromům P450, jelikož jejich působením většinou nevznikají aktivované reaktivní produkty, jak tomu bývá u CYP. Ačkoli byly zaznamenány případy, kdy se tento negativní efekt projevuje. Například hydroxymethyl polyareny mohou být aktivovány sulfotransferasami na vysoce reaktivní produkty, které se kovalentně váží na DNA (Surh Y.J., 1998). Zvýšená aktivita enzymů druhé fáze biotransformace, způsobená například fenolickými sloučeninami (Chen C. a kol., 2000, Appelt L.C., Reicks M.M., 1999), tedy může mít negativní dopad na zdraví organismu. Stejně tak i jejich snížená aktivita však může být fatální. Při nedostatečné funkci těchto enzymů dochází k hromadění

toxických či karcinogenních intermediátů vytvořených předešlým biotransformačním krokem a také může dojít k toxickému působení léčiv, která nejsou odbourávána a dochází k jejich akumulaci v těle (Jancova P. a kol., 2010).

Mezi jednotlivci, stejně jako u CYP, existují rozdíly v zastoupení a funkci jednotlivých enzymů druhé fáze biotransformace. Příčinou těchto rozdílů jsou jak genetické predispozice, tak i životní styl (kouření, strava, okolní prostředí). (Evans G. a kol., 1960). Jako typická ukázka dopadu rozdílné enzymatické výbavy je skupina N-acetyltransferas.

1.4.1 Arylamine N-acetyltransferasy

Arylamine N-acetyltransferasy (NAT) jsou cytosolární enzymy druhé fáze biotransformace. Poprvé byly izolovány v 60. letech 20. století (Jenne J.W., Orser M., 1965), ale již dříve byla tato rodina enzymů jako jedna z prvních rozpoznána jako příčina rozdílné schopnosti lidí odbourávat farmakologicky aktivní látky, konkrétně lék proti tuberkulóze isoniazid (Evans D.A.P. a kol., 1960). NAT jsou také známými aktivátory prekarcinogenů, konkrétně 2-aminofluorenu na N-acetyl-2-aminofluoren. Ten může být dále metabolizován a výsledné produkty jsou ultimátními karcinogeny, které tvoří kovalentní DNA adukty (Hsia T.C. a kol., 2002).



NAT katalyzují konjugaci acetylové skupiny z acetylkoenzymu A (AcCoA) na aminovovou, hydroxylaminovou či hydrazinovou skupinu aromatického substrátu

(obr. 6, str. 26) (Upton A. a kol., 2001). Tato reakce probíhá tzv. ping-pongovým mechanismem reakce (Riddle B., Jencks W.P., 1971). V aktivním centru enzymu se nachází cysteinová skupina Cys⁶⁸, na kterou se v prvním kroku kovalentně váže acetyl z AcCoA. Ve druhém kroku poté enzym reaguje s druhým substrátem a přenáší acetyl na jeho funkční skupinu (Boukouvala S., Fakis G., 2005).

U lidí se vyskytují dva zástupci těchto enzymů – NAT1 a NAT2. Oba isoenzymy mají stejnou velikost 290 aminokyselin a jsou z 85% homologní (Upton A. a kol., 2001). U myši a potkanů, typických pokusných zvířat, byly také objeveny isoenzymy NAT1 a NAT2, ty ale mají opačnou substrátovou specifitu a nukleotidovou sekvenci, než stejně značené lidské NAT. Zatímco typickým substrátem lidské „NAT1“ je p-aminobenzoová kyselina, u potkana tuto látku metabolizuje isoenzym zvaný „NAT2“ a naopak zatímco lidská „NAT2“ acetyluje isoniazid, tyto sloučeniny jsou substráty potkaní „NAT1“ (Sim E. a kol., 2008). Navíc se u hlodavců vyskytuje ještě třetí gen kódující *NAT3* (Walraven J.M. a kol., 2006), který však není příliš přepisován. NAT byly identifikovány v různých tkáních i organismech, včetně prokaryot. Zatímco u potkanů vykazují NAT vysokou aktivitu, u člověka je spíše střední a u psů tato skupina enzymů úplně chybí (Jancova P. a kol., 2010).

Výzkum NAT probíhá především v souvislosti s vylučováním léčiv a odbouráváním karcinogenních látek. Jejich funkce v endogenním metabolismu je však prozatím nejasná (Sim E. a kol., 2003; Jancova P. a kol., 2010). Pro úplnost je nutné také dodat, že do této skupiny enzymů nepatří arylalkylamin N-acetyltransferasy, které jsou zapojeny do metabolismu melatoninu a tím do regulace cirkadiálního rytmu. Ačkoli i tento enzym je zvaný „N-acetyltransferasa“, zkratkou NAT jsou označovány pouze příslušné detoxikační isoenzymy (Boukouvala S., Fakis G., 2005).

1.4.2 NAT1

Lidská arylamin N-acetyltransferasa 1 (NAT1) byla detekována v různých tkáních, a to jak v játrech a střevech, které jsou hlavním centrem biotransformace, tak i v erytrocytech, leukocytech, močovém měchýři a také ve vyvíjejícím se plodu (Boukouvala S., Fakis G., 2005). Jejimi specifickými substráty jsou především

p-aminobenzoová kyselina a *p*-aminosalicylová kyselina, ale také *p*-aminobenzylglutamát (Kawamura A. a kol., 2005). Ačkoli původně byl tento enzym brán jako monomorfní, dodnes již bylo nalezeno 28 alel vyskytující se v lidské populaci (web. odkaz č. 11), přičemž nejvíce zastoupené jsou alely NAT1*3, *4 a *10 (Boukouvala S., Fakis G., 2005). Ovlivnění aktivity NAT vnějšími vlivy není zatím dostatečně prostudováno. Jako inhibitory NAT1 byly prokázány kyselina kávová a fenolické sloučeniny quercetin, ganistein a eskuletin (Kukongviriyapan V. a kol., 2006), z možných terapeutických inhibitorů byly zkoumány rhodanin a naftochinony (Sim E. a kol., 2014). Bylo zjištěno, že také přímo některé substráty NAT1, arylaminy, mohou být příčinou snížení exprese těchto enzymů (Butcher N.J. a kol., 2000; Sim E. a kol., 2008). Potenciálními induktory NAT1 jsou estery forbolu (Minchin R.F. a kol., 2007) a androgeny (Jancova P. a kol., 2010).

Výzkum NAT1 se týká především role tohoto enzymu v karcinogenezi. V prsních nádorech mužů i žen byla detekována výrazně zvýšená exprese NAT1 (Sim E. a kol. 2014). Alela NAT1*10, jejíž přítomnost způsobuje vyšší N-acetyltransferasovou aktivitu než ostatní, je spojována s vyšším rizikem výskytu non-Hodgkinova lymfomu, rakoviny tlustého střeva, rakoviny prostaty a rakoviny pankreatu (Minchin R.F. a kol., 2007).

1.4.3 NAT2

Lidská arylamin N-acetyltransferasa 2 (NAT2) se vyskytuje především v játrech a střevech (Boukouvala S., Fakis G., 2005). Specifickými substráty NAT2 jsou sulfamethazin, isoniazid, hydralazin a sulfonamidy (Jancova P. a kol., 2010). Jako inhibitory NAT2 byly identifikovány látky scopuletin a kumarin (Kukongviriyapan V. a kol., 2006).

Již od 60. let byl tento enzym dáván do souvislosti s pozorovanými metabolickými rozdíly mezi lidmi. Zatímco jedna skupina se projevuje fenotypem tzv. pomalých acetylátorů, odbourává isoniazid - lék podávaný při onemocnění tuberkulózou, s poločasem až 180 minut, u skupiny rychlých acetylátorů bývá tento lék z poloviny metabolizován již za 80 minut (Kinzig-Schippers M. a kol., 2005). Ukázalo se, že příčinou tohoto rozdílu je genetický polymorfismus NAT2, kdy alely NAT2*4 a NAT2*12C byly

nalezeny v DNA rychlých acetylátorů zatímco alely NAT2*5 a NAT2*6 u pomalých acetylátorů (Hein D.W., 2000). Dosud bylo identifikováno více jak 100 alel (web. odkaz č. 12), mezi nejčastější však patří alely NAT2*4, NAT2*5^b, NAT2*6^c a NAT2*7^d (Boukouvala S., Fakis G., 2005). Výskyt jednotlivých alel se výrazně liší mezi populacemi, například alela NAT2*5 se v kavkazské populaci vyskytuje v 52-68%, v Japonsku má tuto alelu pouze 10-15% populace (Boukouvala S., Fakis G., 2005). I v dalších výzkumech s jinými substráty, například s kofeinem, se projevil rozdíl mezi rychlými a pomalými acetylátory (Kinzig-Schippers M. a kol., 2005). Ačkoli NAT2, na rozdíl od NAT1, téměř není exprimována ve tkáni močového měchýře, fenotyp pomalého acetylátora zvyšuje pravděpodobnost rakoviny tohoto orgánu u kuřáků (Sim E. a kol., 2014).

2. Cíl práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo určení vlivu flavonoidů myricetinu a dihydromyricetinu na aktivitu enzymů CYP2E1 , NAT1 a NAT2. Byl studován inhibiční a indukční efekt těchto flavonoidů jak při použití rekombinantních enzymů, tak v mikrosomální a cytosolární frakci izolovaných z jater a střev orálně premedikovaných potkanů. Pro dosažení tohoto cíle bylo třeba splnit následující dílčí úkoly:

1. Premedikace potkanů myricetinem a dihydromyricetinem
2. Izolace cytosolárních a mikrosomálních frakcí z jater a střev premedikovaných potkanů
3. Stanovení koncentrace proteinů v izolovaných preparátech
4. Imunodetekce CYP2E1 a NAT ve směsi elektroforeticky separovaných mikrosomálních, respektive cytosolárních proteinů pomocí specifických protilátek
5. Stanovení inhibiční schopnosti myricetinu a dihydromyricetinu vůči CYP2E1 a NAT

3. Materiál a metody

3.1. Chemikálie a materiál

Abcam (Spojené království)

primární králičí protilátka proti CYP2E1 (ab19140)

Bio-Rad (USA)

TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit 10%/12%, Trans-Blot® Turbo™ Transfer Buffer

BD Bioscience, USA

lidské arylamin N-acetyltransferasy NAT1 a NAT2 v Supersomech™

Fluka (Švýcarsko)

dodecylsulfát sodný (SDS), 2-merkptoethanol, tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), tokoferol (vitamin E)

Lachema Brno (Česká republika)

bromfenolová modř, dekahydrát uhličitanu sodného, hydrogenuhlíčan sodný, ethanol, hydrogenuhlíčan sodný, hydroxid sodný, kyselina chlorovodíková, pentahydrát síranu měďnatého, vínan sodný, glycerol, kyselina octová, methanol

Lach-ner (Česká republika)

dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, glycin, chlorid sodný

Linde (Česká republika)

kapalný dusík

LifeSpan BioSciences, Inc. (USA)

primární králičí protilátka proti NAT1 (LS-C192679)

Merck (Německo)

acetonitril

Millipore Corp. (USA)

přenosová membrána Immobilon-P (PVDF, 0,45 µm)

Mlékárna Pragolaktos, a.s. (Česká republika)

trvanlivé mléko 0,5%

Promega (USA)

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

Roche (Švýcarsko)

inhibitory proteas (tablety Complete protease inhibitor, inhibice serinových, cysteinových a metalo proteas)

Serva (Německo)

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

Sigma-Aldrich (USA)

4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, NADPH, NADP⁺, dichlormethan, koží IgG protilátka proti králíkovi s konjugovanou alkalickou fosfatou (A3687)

Thermo Scientific

Microplate BCA Protein Assay Kit

Whatman (USA)

Filtrační papír, č. 3

chlorzoxazon a 6-hydroxychlorzoxazon (6-OHCLZ) byly obdrženy od RNDr. Radky Václavíkové, Ph.D. ze Státního zdravotního Úřadu v Praze

Mikrosomy izolované z potkanů premedikovaných ethanolem byly připraveny na katedře biochemie Přírodovědecké fakulty v roce 2009 (c(CYP)= 16,7 μ M; c(prot)= 21,5 mg/ml)

3.2. Přístroje

Analytické váhy

40SM-200, PESA (Švýcarsko), DV215CD, Ohaus (Švýcarsko)

Automatické mikropipety

Nichiryo (Japonsko), Eppendorf (Německo)

Blotovací systém

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

Centrifugy

EBA 270, Hettich (USA), K-23 a K-24 Janetzki (Německo), XPN-90 a LE-80K Ultracentrifuge Beckman Coulter Optima (USA)

Elektroforetická aparatura

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

Inkubátor

IR 1500 Automatic CO2 Incubator, Flow Laboratories (Spojené království)

HPLC systém

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

Laboratorní třepačka

ČSAV – vývojové dílny (Československo),

Vodní lázeň

Lab Companion BS-11, Montréal Biotech Inc. (Kanada)

pH metr

HI2211, HANNA Instruments (USA)

Sonikátor

Elmasonic E 30H, ELMA (Německo)

Spektrofotometr

Sunrise Absorbance Reader, TECAN (Švýcarsko)

Vodní purifikační systém

Simplicity 185, Millipore Corp. (USA)

Zdroj pro elektroforesu

PowerPac Basic, Bio-Rad (USA)

Další použité přístroje:

Vortex (*MS1 Minishaker, IKA*), mikrocentrifuga (*C1301B, Labnet*), mikrodávkoč (*MICROLITER Syringe 702RN, Hamilton*)

3.3 Metody

3.3.1 Premedikace

Premedikace pokusných zvířat proběhla v souladu s vyhláškou Ministerstva zemědělství o chovu a využití pokusných zvířat (311/1997). Pokusná zvířata (potkani kmene Wistar 200-250 g) byli rozděleni po dvou jedincích do skupin a drženi v podmínkách při teplotě 22°C, 12 hodinovým denním režimem, s volným přístupem k potravě a vodě. Premedikace probíhala tři dny podáním vzorku gaváží do žaludku. Jednotlivé flavonoidy byly rozpuštěny ve slunečnicovém oleji a potkanům bylo podáno 60 mg flavonoidu na kg váhy. Kontrolní skupině bylo podáno 0,5 ml slunečnicového oleje. Čtvrtý den, 24 hodin před usmrcením, byla potkanům odebrána potrava.

3.3.2 Izolace cytosolárních a mikrosomálních frakcí

Pufr 1	0,15 M KCl
	0,05 M tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid (Tris/HCl)
	50 µM tokoferol
	pH 7,4
Pufr 2	0,1 M Na ₂ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O
	pH 7,2
Pufr 3	0,15 M KCl
	0,05 M Tris/HCl

20% (v/v) glycerol

pH 7,4

Celý proces izolace byl proveden při 4°C, použité materiály a pufrů byly též předem vychlazeny. Mikrosomální a cytosolární frakce byly izolovány z jater a střev potkanů, pro každý vzorek byly použity tkáně ze dvou pokusných zvířat. Tenké střevo bylo rozděleno na tři části označené jako proximální, střední a distální část, každá přibližně 15 cm dlouhá.

Izolované tkáně byly zváženy, omyty pufrů 1 a poté nůžkami rozstříhány na menší části. Tkáň byla homogenizována v pufru o objemu 4 ml/g tkáně tkáň ve dvou různých homogenizátorech podle Pottera-Elvehjema a poté centrifugována 10 minut při 600×g (centrifuga Janetzki K-23, výkyvný rotor 4×70 ml, 2 000 RPM). Supernatanty byly odebrány a uchovány a pelety byly resuspendovány v pufru 1 v množství 0,25 ml/g tkáně a opětovně homogenizovány. Homogenáty byly opět centrifugovány za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Supernatanty z obou centrifugací byly smíchány a 20 minut centrifugovány při 15 000×g (centrifuga Janetzki K-24, úhlový rotor 6×35 ml, 13 500 RPM). Poté byly supernatanty opatrně odebrány a centrifugovány při 100 000×g (centrifuga Beckman Coulter Optima XPN-90 Ultracentrifuge, rotor SW 32 Ti, 29 000 RPM). Supernatanty, které nyní představovaly cytosolární frakci, byly alikvotovány do mikroskopavek, ihned zmrazeny tekutým N₂ a dále uchovávány při -80°C. Pelety byly opět resuspendovány v pufru 2 o objemu 2 ml/g tkáně a homogenizovány pomocí Potter-Elvehjemova homogenizátoru. Následně byly homogenáty již naposledy centrifugovány, tentokrát 90 minut při 150 000×g (centrifuga Beckman Coulter Optima LE-80K Ultracentrifuge, TYPE 70 ti, 45 000 RPM). Supernatanty byly odlity a pelety resuspendovány v pufru 3 (0,2 ml/g tkáně). Suspenze, mikrosomální frakce, byla alikvotována do mikroskopavek, ihned zmrazena tekutým N₂ a poté uchována při -80°C.

3.3.3 Stanovení koncentrace proteinů

Činidlo A	2% (w/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$
	0,95% (w/v) NaHCO_3
	0,16% (w/v) $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$
	0,4% (w/v) NaOH
	1% (w/v) sodná sůl 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninové kyseliny (BCA)

Činidlo B	4% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
------------------	--

Stanovení proteinů v obou izolovaných frakcích bylo provedeno pomocí bicinchoninové kyseliny, dle metody Smithe a kol. (1985).

Aminokyseliny cystein, tryptofan a tyrosin jsou schopné redukovat ionty Cu^{2+} na Cu^+ , které poté reagují s BCA za tvorby modrofialového komplexu rozpustného ve vodě. Intenzita zabarvení roztoku je poté měřena při 562 nm a je přímo úměrná koncentraci daných aminokyselin. Naměřené hodnoty absorbance lze poté extrapolovat na hodnoty koncentrací proteinů, při zanedbání rozdílů v zastoupení jednotlivých aminokyselin v různých bílkovinách.

Jaterní mikrosomální i cytosolární vzorky byly naředěny destilovanou vodou 50x a 75x, střevní preparáty 5x a 10x. Do 96jamkové destičky bylo odměřeno po 9 μl naředěných vzorků, vždy třikrát pro každý preparát. Jako slepý vzorek sloužila deionizovaná voda. Pro kalibraci byly připraveny roztoky BSA o koncentracích 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 a 2,0 mg/ml a zpracovány jako neznámé vzorky v paralelním provedení. Reakční činidlo bylo připraveno z roztoků A a B v poměru 1:50 a do každé jamky bylo aplikováno 260 μl .

Poté byla mikrotitrační destička 30 minut inkubována při 37°C. Po skončení inkubace byla změřena absorbance při 562 nm a data byla vyhodnocena v programu Kim32 (web. odkaz č. 13).

3.3.4 Diskontinuální elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

Polymerační gely TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit 10%/12%

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

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

Barvicí lázeň 0,25% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250 (CBB)

46% (v/v) EtOH

9,2% (v/v) CH₃COOH

Odbarvovací lázeň 25% (v/v) EtOH

10% (v/v) CH₃COOH

Diskontinuální elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) je separační metoda, která slouží k rozdělení proteinů především dle jejich molekulové hmotnosti. Proteiny jsou nejprve denaturovány a inkubovány s SDS, čímž získávají záporný náboj. V elektrickém poli se poté pohybují směrem k anodě.

Zaostřovací i rozdělovací gel byly připraveny dle návodu k používanému kitu (BIO-RAD, TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit). Použité gely byly silné 1 mm s hustotou zesíťování separačního gelu 10% v případě dělení mikrosomální frakce a 12% pro cytosolární frakci (hustota zaostřovacího gelu není výrobcem uvedena). Rozměry zaostřovacího gelu byly přibližně 1,5×8,5 cm, separační gel asi 4,5×8,5 cm. Jednotlivé vzorky byly ředěny vodou a vzorkovým pufrem na výslednou koncentraci proteinu 1 mg/ml a pět minut zahřívány při 100°C. Do každé jamky v zaostřovacím gelu bylo pipetováno 20 µl vzorku, tedy 20 µg proteinu. Gely byly umístěny do elektroforetické vany (BIO-RAD, Mini-PROTEAN® Tetra System) s elektrodovým pufrem a byly připojeny ke zdroji konstantního elektrického napětí 200 V (BIO-RAD, PowerPac® Basic) po dobu přibližně 1 hodiny (dokud se čelo indikované zónou bromfenolové modři nenacházelo přibližně 0,5 cm od spodního okraje gelu).

Po ukončení elektroforesy byl oddělen vrchní zaostřovací gel a rozdělovací gel byl dále použit pro Western blot nebo byl barven 1 hodinu v barvicí lázni na třepačce (ČSAV - vývojové dílny) a poté přes noc odbarvován.

3.3.5 Western blot

Přenosový pufr	Trans-blot® Turbo™ Transfer Buffer (BIO-RAD)	
PBS Triton X-100	0,134 M NaCl	
	1,8 mM Na ₂ HPO ₄	
	1 mM NaH ₂ PO ₄	
	0,3% (w/v) Triton X-100	
	pH 7,2	
Blokovací roztok	5% (w/v) sušené odtučněné mléko v PBS Tritonu X-100	
Vyvolávací roztok	Pufr 5 ml	100 mM Tris/HCl
		150 mM NaCl
		1 mM MgCl ₂
		pH 9,0
	33 µl	nitrotetrazolová modř (NBT)
	16,5 µl	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát (BCIP)

Western blot, neboli imunoblot, je analytická imunodetekční metoda. Směs proteinů je po rozdělení metodou SDS-PAGE přenesena pomocí elektrického proudu na PVDF či nitrocelulosovou membránu. Studovaný protein je poté nalezen a vyznačen imunochemicky (Towbin H. a kol., 1979).

Separáční gel byl změřen a byla ustřzena stejně velká PVDF membrána. Ta byla nejprve zvlhčena v methanolu a poté byla na 2 minuty ponořena do přenosového pufru. Také byly nastřihány filtrační papíry, které byly též namočeny do přenosového pufru na 2 minuty. Na spodní desku blotovacího přístroje (anodu) byly položeny tři filtrační papíry, na ně byla umístěna membrána, na kterou byl přiložen polyakrylamidový gel. Vrchní vrstvu tvořily opět tři filtrační papíry a blotovací přístroj byl uzavřen vrchní deskou. Elektropřenos probíhal 7 minut s konstantním proudem 1,3 A (plocha membrány asi 38 cm²; BIO-RAD Trans-Blot® Turbo™ Blotting System).

Po ukončení přenosu byla membrána 1 hodinu blokována v 15 ml blokovacího roztoku za stálého míchání na třepačce (ČSAV - vývojové dílny). Poté byla přenesena do 10 ml roztoku primární protilátky naředěné v blokovacím roztoku a byla přes noc inkubována při 6°C. Primární protilátka proti CYP2E1 byla produkována v králíkovi a pro imunodetekci bylo dle doporučení výrobce zvoleno ředění 1:5 000. Primární protilátka proti NAT1 byla též izolována z králíka a ředěna byla v poměru 1:500.

Druhý den byla membrána promyta třikrát 5 minut 15 ml blokovacího roztoku a poté byla hodinu inkubována v 10 ml roztoku sekundární protilátky v blokovacím roztoku. Pro obě králíčí primární protilátky byla použita stejná kozí IgG konjugovaná s alkalickou fosfátasou, ředěna v poměru 1:5 000.

Po ukončení inkubace byla membrána promyta dvakrát v blokovacím roztoku, dvakrát v roztoku PBS Triton X-100 a nakonec ve vodě, každé promytí probíhalo 5 minut za stálého míchání na třepačce.

Zviditelnění proběhlo pomocí 5 ml vyvolávacího roztoku. Poté byla membrána promyta ve vodě a vysušena filtračním papírem.

3.3.6 Inhibice aktivity CYP2E1 působením DHM

Inkubační směs (V = 0,5 ml)	pufr	150 mM KCl 50 mM Tris/HCl pH 7,4
	NADPH-generující systém (GS)	1 mM NADP 10 mM MgCl ₂ 10 mM glukosa-6-fosfát 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa
	chlorzoxazon	0,5 mM (250 nmol) v MetOH
	mikrosomální preparát	100 pmol CYP
	flavonoid	dihydromyricetin (0,1 μM - 1 mM) nebo myricetin (1 μM - 100 μM); přídavek v 10 μl acetonitrilu
Zastavovací roztok	43% H ₃ PO ₄	
Vnitřní standard	1 mM phenacetin v MetOH	
Extrakční činidlo	CH ₂ Cl ₂	

Pro stanovení aktivity CYP2E1 byla sledována tvorba produktu 6-hydroxychlorzoxazonu z chlorzoxazonu, který je specifickým substrátem CYP2E1. Detekce produktu probíhala pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Peter R. a kol., 1990).

Nejprve byly připraveny inkubační směsi, přičemž reakce byla startována přidáním NADPH-GS po tříminutové pre-inkubaci ostatních reaktantů při 37°C za stálého míchání (90 otáček za minutu; Lab companion BS-11). Reakční směsi byly inkubovány 15 minut (stejně podmínky jako pre-inkubace) a poté byla reakce zastavena přidáním 25 µl 43% H₃PO₄. Mikrostríkačkou typu Hamilton bylo do každé směsi přidáno 5 µl 1 mM roztoku phenacetinu jako vnitřního standardu. Poté byla provedena vířivá extrakce do 2 ml CH₂Cl₂ 20 s na vortexu (Labnet, Vortex mixer VX-200). Zkumavky byly centrifugovány 5 minut při 3 000 RPM (centrifuga Hettich, EBA 270, výkyvný rotor, 1 000×g) a ze spodní organické fáze byl do skleněné zkumavky odebrán 1 ml, který byl poté odpařen (přibližně 30 minut při 38°C).

Pro analýzu HPLC byl odparek rozpuštěn v 50 µl MetOH a 20 µl bylo aplikováno na kolonu (Macherey-Nagel, Nucleosil 100-5 column C₁₈) v přístroji Agilent technologies 1200. Rozdělení směsi probíhalo při 30°C a průtoku mobilní fáze (56% methanol v deionizované vodě) 0,5 ml/min. Celkový čas analýzy jednoho vzorku byl 16 minut. Phenacetin, substrát i jeho hydroxylovaný metabolit byly detekovány absorbančně při 287 nm a 210 nm v časech přibližně 10 respektive 7 a 14 minut. Vzorky byly připravovány v tripletech a výsledky byly standardizovány pomocí vnitřního standardu phenacetinu.

Pro stanovení množství vytvořeného produktu byla připravena kalibrační řada, pro kterou byly použity reakční směsi bez flavonoidu zastavené v čase 0 (ihned po přidání NADPH-GS), do kterých byl následně přidán substrát ve výsledných koncentracích 0; 2,5; 5,0; 7,4; 9,8 a 15 µM.

3.3.7 Stanovení aktivity NAT v cytosolárních vzorcích

Pufr	20 mM Tris/HCl
	pH 8,0

Substráty	2,0 mM acetylkoenzym A (AcCoA) v pufru
	1 mM <i>p</i> -aminobenzoová kyselina (PABA) v H ₂ O
	10 mM sulfamethazin (SMZ) v MetOH
Zastavovací roztok/ detekční činidlo	10 mM 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoová kyselina) (Ellmanovo činidlo, DTNB)
	6,4 M guanidin hydrochlorid (Gua-HCl)
	0,1 M Tris/HCl
	pH 7,3

V izolovaných cytosolárních frakcích potkanů byla měřena acetylační aktivita NAT. Substrátem potkanní NAT1 je SMZ, PABA je substrátem pro NAT2, zatímco v případě lidských enzymů je značení NAT opačné (Sim E. a kol., 2008). Acetylaci substrátů vzniká v roztoku koenzym A (CoA) s volnou sulfhydrylovou skupinou, jehož přítomnost je detekovatelná pomocí Ellmanova činidla. Reakcí CoA s DTNB vzniká thionitribenzoová kyselina (TNB), která silně absorbuje okolo 412 nm (Brooke E.W. a kol., 2003; De Angelis J. a kol., 1998).

Na jednu jamku bylo smícháno 20 μ l 2,0 mM AcCoA, cytosolární preparát (20 μ g celkového proteinu) a pufr v příslušném dopočítaném množství. Tato směs byla 5 minut pre-inkubována při 37°C a třepání 450 RPM (Eppendorf Thermomixer compact) a poté byla reakce iniciována přidáním druhého substrátu – v množství 25 μ l 1 mM PABA/ 2,5 μ l 10 mM SMZ. Inkubace probíhala 25 minut při 37°C a 450 RPM a byla ukončena přenesením alikvotů do jamky (96jamková průhledná destička) obsahující 25 μ l DTNB ve stopovacím činidle. Zabarvení bylo měřeno absorbančně po 5 minutách při 405 nm na čtečce Tecan Sunrise™. Pro ověření linearity reakce byly u kontrolních preparátů odebírány alikvoty v tripletech každých 5 minut.

Pro srovnání byly také provedeny experimenty s rekombinantními lidskými enzymy NAT1 a NAT2. Vzhledem k rozdílné specifické aktivitě rekombinantních enzymů

deklarované výrobcem byly použity rozdílné koncentrace proteinů (0,1 mg/ml pro NAT1 a 0,2 mg/ml pro NAT2). Množství vytvořeného produktu tak bylo v obou uspořádáních srovnatelné.

Pro výpočet enzymové aktivity, bylo nutné provést kalibraci roztoku standardu CoA. CoA byl přidán do reakční směsi obsahující jaterní kontrolní cytosoly bez přítomnosti druhého substrátu. Použité výsledné koncentrace pro kalibraci byly 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 μM .

Pro určení absolutních hodnot absorbance odpovídající množství vytvořeného produktu byla odečtena absorbance činidla v reakční směsi zastavené v čase 0 (reakce zastavena ihned po přidání druhého substrátu) od absorbance po 25 minutách. Specifická aktivita enzymu v jednotlivých preparátech poté byla spočítána dle vzorce 1.

Vzorec 1: Výpočet specifické aktivity enzymu

$$a_{spec} = \frac{n_{prod}}{t \cdot m_{prot}} = \frac{c_{prod} \cdot V_{směsi}}{t \cdot m_{prot}}$$

$$c_{prod} = \frac{A}{k}$$

$$a_{spec} = \frac{A \cdot V_{směsi}}{t \cdot m_{prot} \cdot k}$$

a_{spec} ... specifická aktivita enzymu

t ... doba inkubace

n_{prod} ... látkové množství detekovaného produktu

m_{prot} ... hmotnost celkového proteinu

$V_{směsi}$... celkový objem reakční směsi

A ... naměřené absolutní hodnoty absorbance

k ... směrnice kalibrační přímky

c_{prod} ... koncentrace produktu

3.3.8 Inhibice aktivity NAT působením DHM a MYR

Princip metody i použité reagensy byly stejné jako metody v kapitole 3.3.7. Pro stanovení inhibiční schopnosti MYR a DHM byly využity rekombinantní enzymy NAT1 a NAT2 se substráty PABA respektive SMZ. Do reakční směsi bylo navíc přidáno 5 μ l methanolu, který obsahoval rozpuštěný flavonoid. Výsledné použité koncentrace myricetinu byly 0,78; 1,56; 3,13; 6,25; 12,50; 25,0 a 50,0 μ M a pro dihydromyricetin 0,25; 0,50; 1,0; 3,25; 6,50; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100; 150 a 200 μ M.

Vzorek s nulovou koncentrací flavonoidu (5 μ l methanolu) sloužil jako kontrola (100% aktivity). Naměřené hodnoty absorbancí byly následně převedeny na procenta aktivity kontroly a výsledky vyneseny do grafu. Logaritmickou regresí experimentálních dat byly určeny hodnoty koncentrace MYR a DHM, která způsobuje pokles kontrolní aktivity na polovinu (IC_{50}).

4. Výsledky

4.1 Stanovení koncentrace proteinů v izolovaných vzorcích

Koncentrace proteinů v jednotlivých mikrosomálních i cytosolárních vzorcích izolovaných z potkanů premedikovaných myricetinem a dihydromyricetinem byla stanovena pomocí BCA, metodou popsanou v kapitole 3.3.3. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1: Koncentrace proteinů v izolovaných mikrosomálních frakcích.

Koncentrace (mg/ml)	Kontrola	Myricetin	Dihydromyricetin
Játra	20,5	41,6	36,8
Tenké střevo – proxi	2,61	1,23	5,67
Tenké střevo – middle	2,74	2,96	4,41
Tenké střevo – distal	2,13	2,43	2,06
Tlusté střevo	3,98	3,86	2,85

Vzorky byly izolovány z jater a střev z potkanů premedikovaných flavonoidy myricetinem a dihydromyricetinem. Kontrolní skupině byl podán slunečnicový olej.

Tabulka 2: Koncentrace proteinů v izolovaných cytosolárních frakcích.

Koncentrace (mg/ml)	Kontrola	Myricetin	Dihydromyricetin
Játra	30,1	26,2	22,8
Tenké střevo – proxi	3,56	1,85	2,30
Tenké střevo – middle	5,49	4,38	5,81
Tenké střevo – distal	4,57	4,45	3,91
Tlusté střevo	3,42	3,52	3,06

Vzorky byly izolovány z jater a střev z potkanů premedikovaných flavonoidy myricetinem a dihydromyricetinem. Kontrolní skupině byl podán slunečnicový olej.

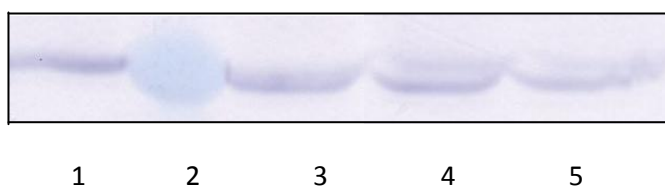
4.2 Western blot

Metodou Western blot (kapitoly 3.3.4 a 3.3.5) bylo sledováno množství proteinu CYP2E1 a NAT1 v jednotlivých vzorcích v závislosti na premedikaci potkanů. Pro vizuální kontrolu, zda bylo do všech jamek naneseno stejné množství proteinu, byla provedena paralelní SDS elektroforesa se stejnými vzorky, kde však gel nebyl dále použit pro metodu elektropřenosu. Pro kontrolu úspěšnosti elektropřenosu byl polyakrylamidový gel, použitý pro Western blot, nabarven a poté bylo opět vizuálně zhodnoceno, zda v gelu nezůstaly nepřenesené proteiny.

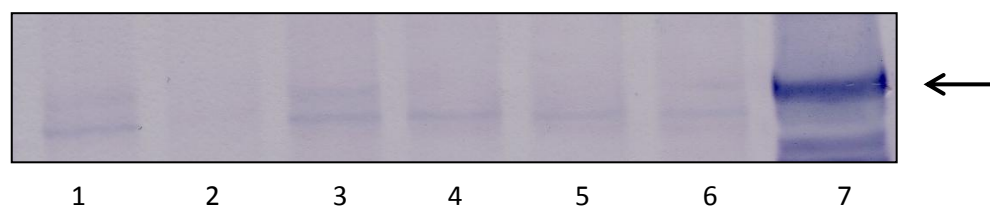
Pozitivní kontrolou v případě imunodetekce CYP2E1 byly jaterní mikrosomy izolované z potkanů premedikovaných ethanolem, ve kterých by tato izoforma CYP měla být indukována. Ve vzorcích jater (obr. 7, str. 49) nebyl nalezen viditelný rozdíl v množství CYP2E1 mezi pozitivní kontrolou a kontrolním vzorkem (potkani premedikovaní slunečnicovým olejem), respektive vzorky po premedikaci flavonoidy. Zóny představující množství CYP2E1 v játrech potkanů premedikovaných flavonoidy myricetinem a dihydromyricetinem měly srovnatelnou intenzitu zabarvení jako kontrolní vzorek. Ve střevech potkanů rozdělených na čtyři části (proximální, střední a distální část tenkého

střeva a tlusté střevo) také nebyl nalezen významný rozdíl v obsahu CYP2E1 (obr. 8, str. 49 a obr. 9, str. 50)

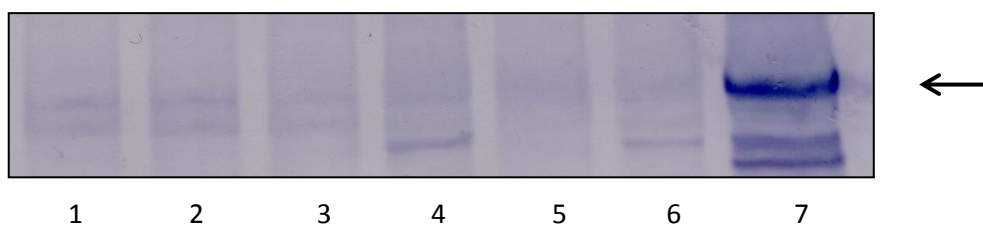
Pro stanovení NAT byly kontroly funkčnosti primární protilátky použity rekombinantní lidské enzymy pro NAT1 a NAT2. V játrech byla detekována přítomnost NAT velmi slabě, srovnatelně ve všech vzorcích (obr. 10, str. 50). Nebylo zjištěno žádné výrazné navýšení koncentrace tohoto enzymu ve vzorcích po premedikaci flavonoidy oproti kontrole. V žádné části střev NAT nebyly detekovány (obr. 11 a 12, str. 51).



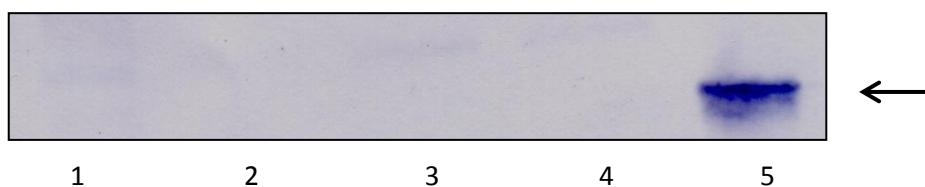
Obr. 7: Vliv myricetinu a dihydromyricetinu na indukci CYP2E1 v játrech. Pro elektroforesu byl použit 10% polyakrylamidový gel, do každé jamky bylo pipetováno 20 μ g proteinu. Do jednotlivých drah byly aplikovány vzorky v redukujícím pufru v následujícím pořadí: jaterní mikrosomy po premedikaci ethanolem (1); standard (50kDa) (2); mikrosomy po premedikaci slunečnicovým olejem - kontrolní (3), myricetinem (4) a dihydromyricetinem (5).



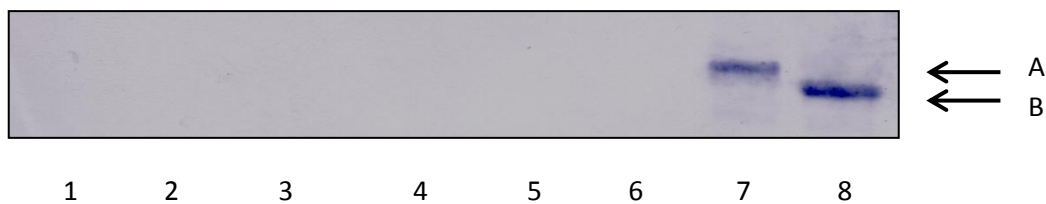
Obr. 8: Vliv myricetinu a dihydromyricetinu na indukci CYP2E1 v proximální a střední části tenkého střeva. Pro elektroforesu byl použit 10% polyakrylamidový gel, do každé jamky bylo pipetováno 20 μ g proteinu. Šipkou je vyznačena pozice CYP2E1 na membráně. Do jednotlivých drah byly aplikovány vzorky v redukujícím pufru v následujícím pořadí: mikrosomy izolované z proximální části tenkého střeva po premedikaci slunečnicovým olejem (1), myricetinem (2) a dihydromyricetinem (3); mikrosomy izolované ze střední části tenkého střeva po premedikaci slunečnicovým olejem (4), myricetinem (5) a dihydromyricetinem (6); jaterní mikrosomy po premedikaci ethanolem (7).



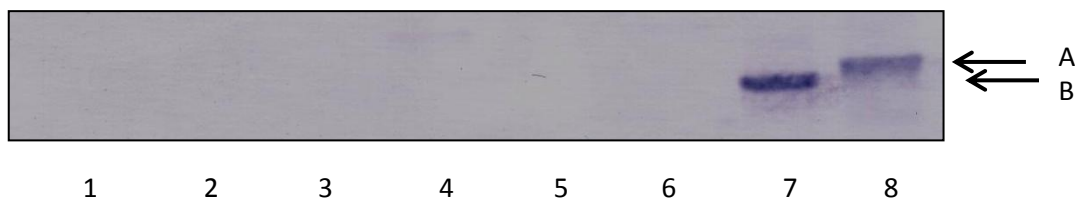
Obr. 9: Vliv myricetinu a dihydromyricetinu na indukci CYP2E1 v distální části tenkého střeva a v tlustém střevě. Pro elektroforesu byl použit 10% polyakrylamidový gel, do každé jamky bylo pipetováno 20 μg proteinu. Šipkou je vyznačena pozice CYP2E1 na membráně. Do jednotlivých drah byly aplikovány vzorky v redukujícím pufru v následujícím pořadí: mikrosomy izolované z distální části tenkého střeva po premedikaci slunečnicovým olejem (1), myricetinem (2) a dihydromyricetinem (3); mikrosomy izolované z tlustého střeva po premedikaci slunečnicovým olejem (4), myricetinem (5) a dihydromyricetinem (6); jaterní mikrosomy po premedikaci ethanolem (7).



Obr. 10: Vliv myricetinu a dihydromyricetinu na indukci NAT v játrech. Pro elektroforesu byl použit 12% polyakrylamidový gel, do každé jamky bylo pipetováno 20 μg proteinu. Šipkou je vyznačena pozice NAT1 na membráně. Do jednotlivých drah byly aplikovány vzorky v redukujícím pufru v následujícím pořadí: standard (1); mikrosomy po premedikaci slunečnicovým olejem - kontrolní (2), myricetinem (3) a dihydromyricetinem (4); rekombinantní NAT1 (5), 4 μg /jamka.



Obr. 11: Vliv myricetinu a dihydromyricetinu na indukci NAT v proximální a střední části tenkého střeva. Pro elektroforesu byl použit 12% polyakrylamidový gel, do každé jamky bylo pipetováno 20 μg proteinu. Šípkami jsou vyznačeny pozice NAT1 (A) a NAT2 (B) na membráně. Do jednotlivých drah byly aplikovány vzorky v redukujícím pufru v následujícím pořadí: mikrosomy izolované z proximální části tenkého střeva potkanů po premedikaci slunečnicovým olejem - kontrolní (1), myricetinem (2) a dihydromyricetinem (3); mikrosomy izolované ze střední části tenkého střeva potkanů po premedikaci slunečnicovým olejem - kontrolní (4), myricetinem (5) a dihydromyricetinem (6); rekombinantní NAT1 (7), 4 μg /jamka; rekombinantní NAT2 (8), 4 μg /jamka.

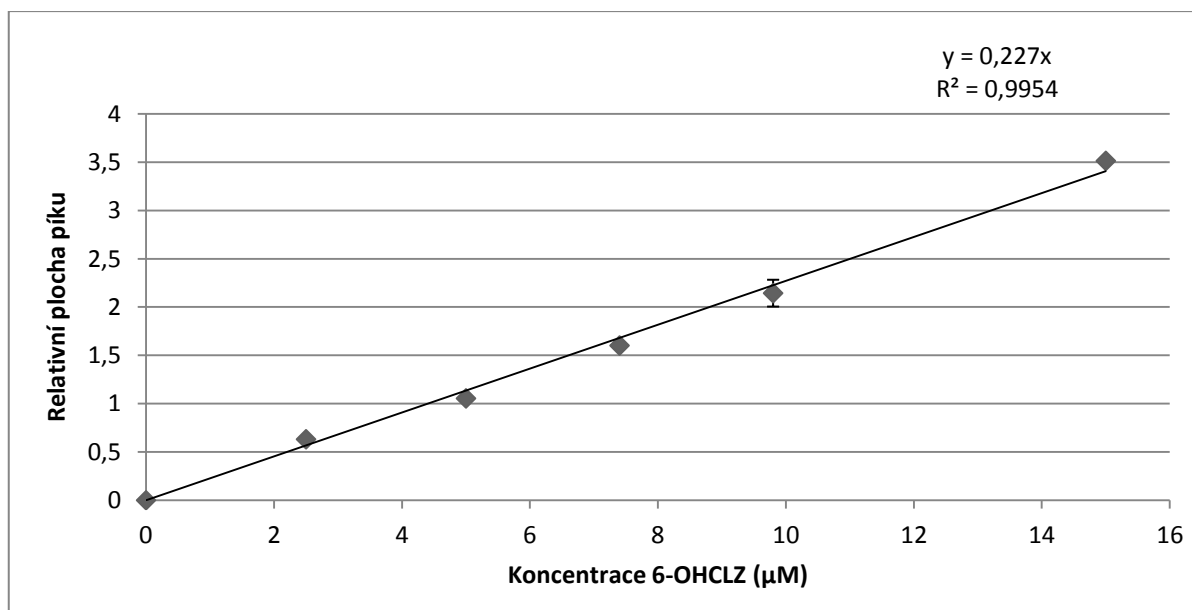


Obr 12: Vliv myricetinu a dihydromyricetinu na indukci NAT v distální části tenkého střeva a v tlustém střevě. Pro elektroforesu byl použit 12% polyakrylamidový gel, do každé jamky bylo pipetováno 20 μg proteinu. Šípkami jsou vyznačeny pozice NAT1 (A) a NAT2 (B) na membráně. Do jednotlivých drah byly aplikovány vzorky v redukujícím pufru v následujícím pořadí: mikrosomy izolované z distální části tenkého střeva potkanů po premedikaci slunečnicovým olejem - kontrolní (1), myricetinem (2) a dihydromyricetinem (3); mikrosomy izolované z tlustého střeva potkanů po premedikaci slunečnicovým olejem - kontrolní (4), myricetinem (5) a dihydromyricetinem (6); rekombinantní NAT2 (7), 4 μg /jamka; rekombinantní NAT1 (8), 4 μg /jamka

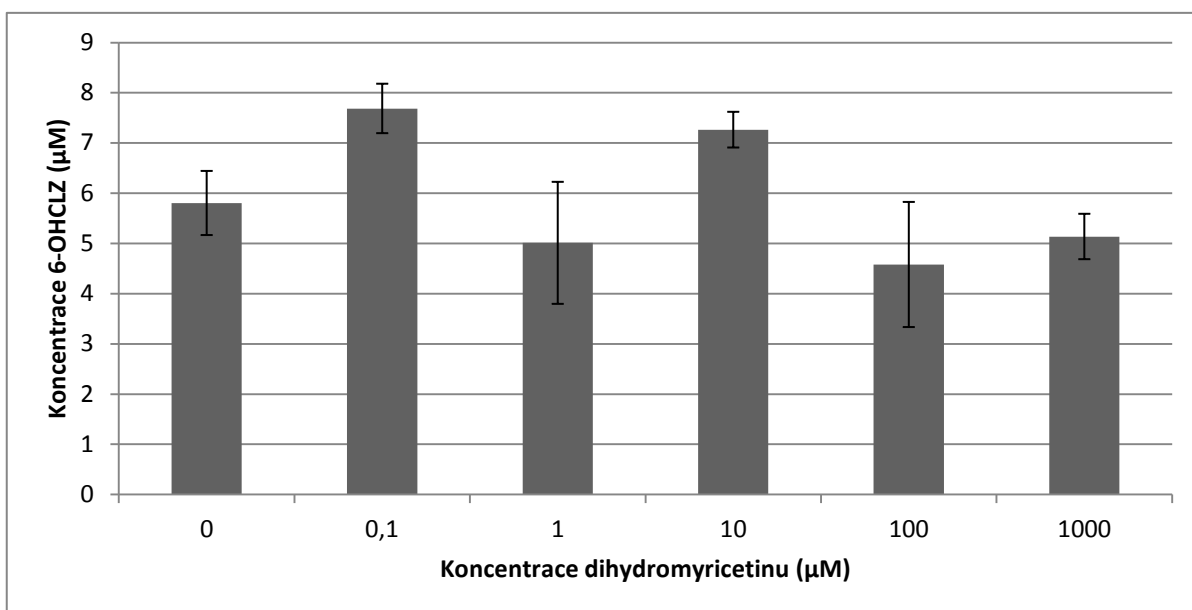
4.3 Inhibice aktivity CYP2E1 působením DHM

Aktivita CYP2E1 byla měřena na základě tvorby produktu 6-hydroxychlorzoxazonu. Reakční směsi byly míchány v celkovém objemu 0,5 ml a extrahovány dle metody popsané v kapitole 3.3.6. Detekce substrátu, produktu i standardu (phenacetin) probíhala měřením absorbance při 287 nm a 210 nm po rozdělení směsi metodou HPLC. Nejprve byla provedena kalibrace 6-hydroxychlorzoxazonu (2,5 - 15 μM) zobrazená na obr.13. Poté byla sledována inhibice CYP2E1 dihydromyricetinem a myricetinem ve vzorku jater potkana premedikovaného ethanolem. DHM a MYR byly přidávány do reakční směsi ve výsledných koncentracích 0,1 μM - 1 mM, respektive 1 - 100 μM . kontrolou byl vzorek s přidavkem acetonitrilu.

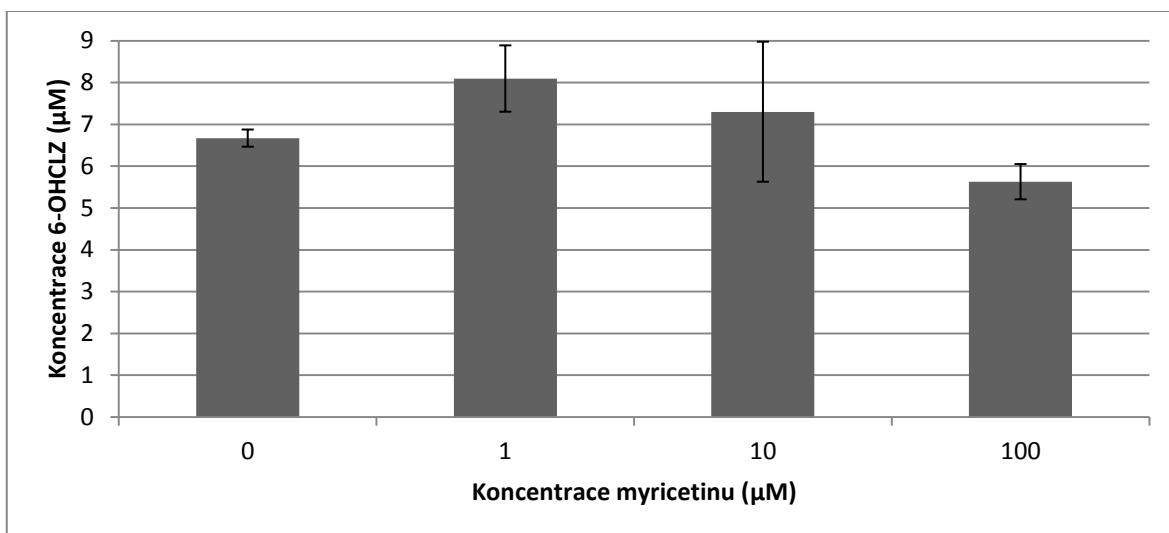
Z naměřených hodnot (obr. 14 na str. 53) vyplývá, že ve studovaném rozmezí koncentrací DHM neinhibuje aktivitu CYP2E1. Naopak při nižších koncentracích DHM vykazuje stimulační efekt.



Obr. 13: Kalibrační řada 6-hydroxychlorzoxazonu. Do reakční směsi o celkovém objemu 0,5 ml byl po zastavení v čase byly přidán 6-hydroxychlorzoxazon (6-OHCLZ) ve výsledných koncentracích 2,5-15 μM . Množství 6-OHCLZ bylo stanoveno pomocí RP-HPLC (mobilní fáze 56% methanol, průtok 0,5 ml/min, 30°C) a standardizováno na phenacetin. Měření byla provedena v triplikátech.



Obr. 14: Množství 6-hydroxychlorzoxazonu (6-OHCLZ) produkované CYP2E1 v přítomnosti různých koncentrací dihydromyricetinu. Dihydromyricetin byl rozpuštěn v acetonitrilu a přidáván v 10 µl do reakční směsi o celkovém objemu 0,5 ml. Množství 6-OHCLZ bylo stanoveno pomocí RP-HPLC (mobilní fáze 56% methanol, průtok 0,5 ml/min, 30°C) a standardizováno na phenacetin. Měření byla provedena v triplikátech.

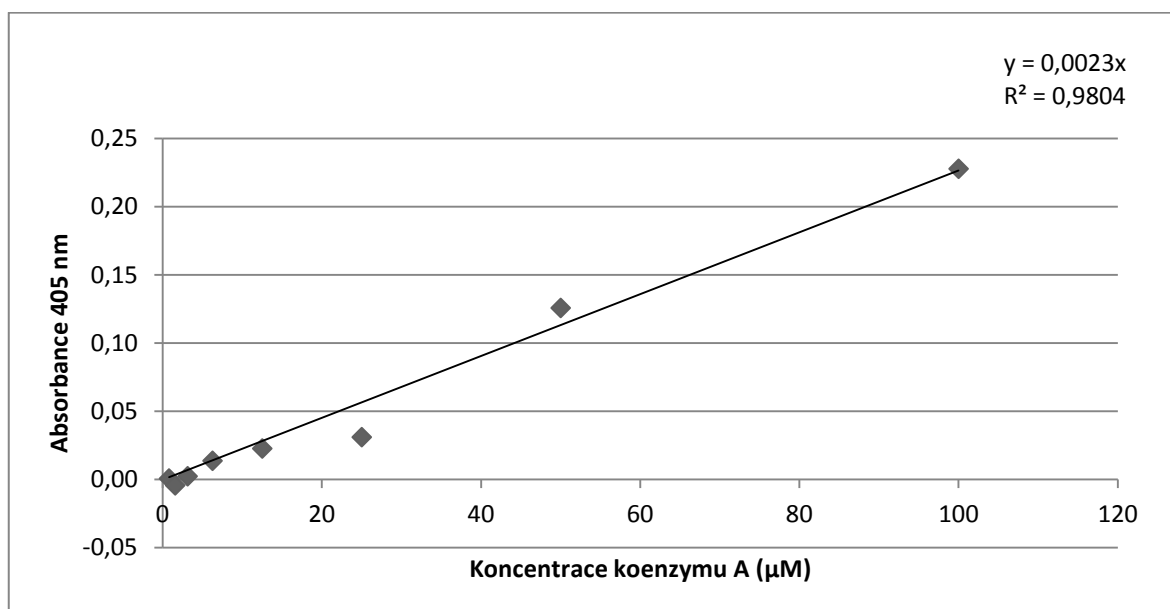


Obr. 15: Množství 6-hydroxychlorzoxazonu (6-OHCLZ) produkované CYP2E1 v přítomnosti různých koncentrací myricetinu. Myricetin byl rozpuštěn v acetonitrilu a přidáván v 10 µl do reakční směsi o celkovém objemu 0,5 ml. Množství 6-OHCLZ bylo stanoveno pomocí RP-HPLC (mobilní fáze 56% methanol, průtok 0,5 ml/min, 30°C) a standardizováno na phenacetin. Měření byla provedena v triplikátech.

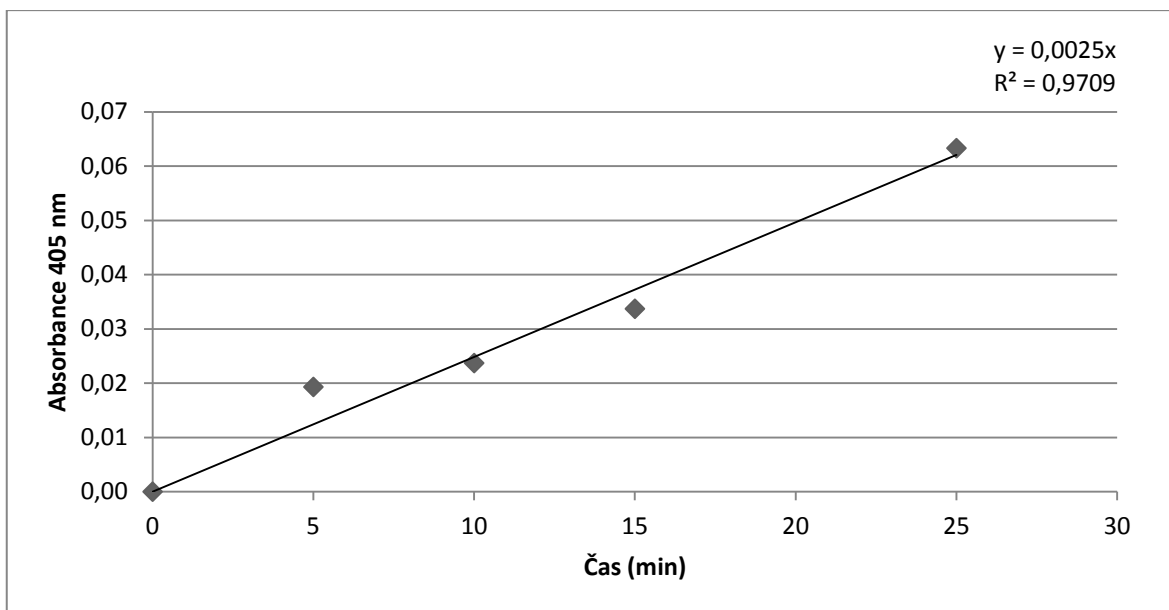
4.4 Stanovení aktivity NAT v cytosolárních vzorcích

Aktivita NAT byla stanovena na základě tvorby produktu - koenzymu A ze substrátu acetylkoenzymu A dle metody popsané v kapitole 3.3.7. Druhým substrátem reakce byla pro enzym NAT1 (potkaní NAT2) kyselina *p*-aminobenzoová a pro NAT2 (potkaní NAT1) sulfamethazin. Kalibrační závislost pro CoA (0,78 - 100 μ M), je zobrazena v grafu na obr. 16. Lineární regresí byla nalezena rovnice přímky $y = 0,0023x$. Správné složení reakční směsi tak, aby reakce probíhala lineárně, bylo ověřeno pro oba rekombinantní enzymy (obr. 17 a 18, str. 55) a také pro kontrolní potkaní preparáty (pro příklad uvedeno na obr. 19, str. 56)

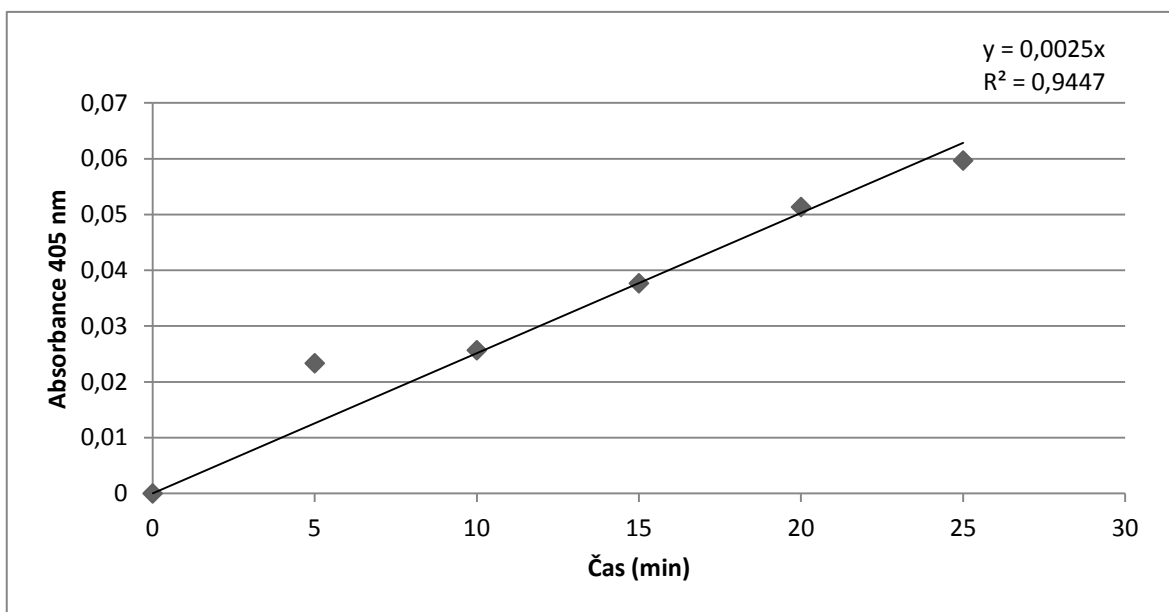
Naměřené absorbance byly přepočítány na enzymovou aktivitu jednotlivých vzorků. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 3, str. 57 a 4, str. 58. Naměřené hodnoty jsou srovnatelné, v žádné z tkání nedochází k výraznému ovlivnění aktivity po premedikaci myricetinem či dihydromyricetinem.



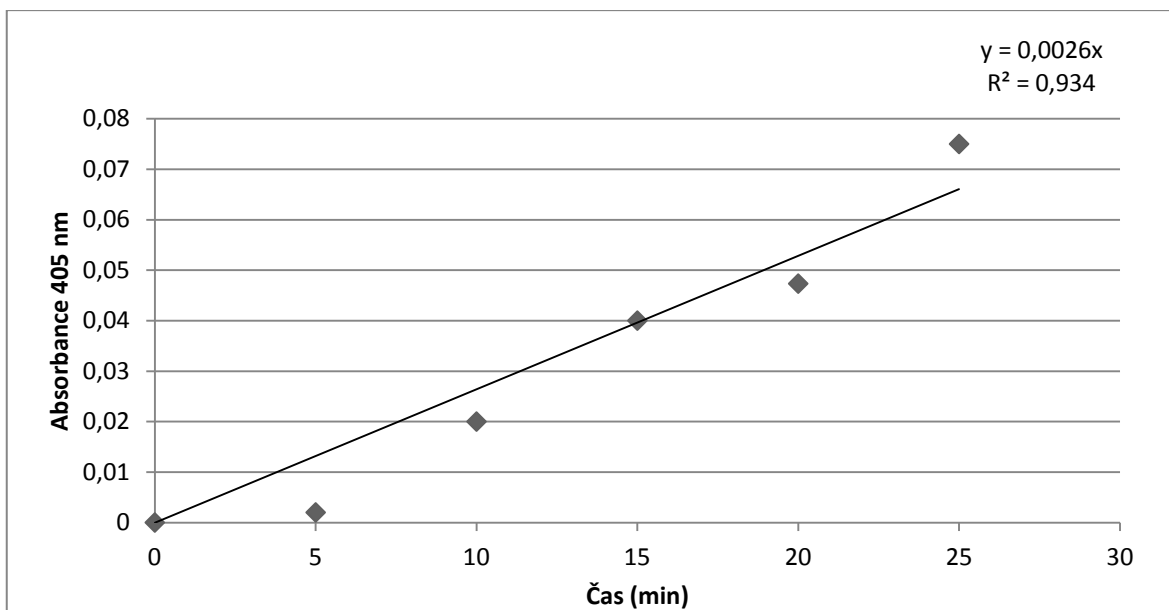
Obr. 16: Kalibrační závislost CoA. CoA byl přidáván do reakční směsi (400 μ M AcCoA, jaterní kontrolní cytosol 20 μ g proteinu, pufr, $V = 100 \mu$ l) bez druhého substrátu (PABA). Detekčním činidlem bylo 25 μ l 10 mM DTNB v 6,4 M Gua-HCl. Absorbance byla měřena při 405 nm.



Obr. 17: Produkce AcCoA v čase v reakční směsi obsahující rekombinantní NAT1. Reakční směs obsahovala AcCoA 400 μ M; PABA 250 μ M; rekombinantní NAT1 0,1 mg/ml; pufr; V= 100 μ l. Detekčním činidlem bylo 25 μ l 10 mM DTNB v 6,4 M Gua-HCl. Absorbance byla měřena při 405 nm.



Obr. 18: Produkce AcCoA v čase v reakční směsi obsahující rekombinantní NAT2. Reakční směs obsahovala AcCoA 400 μ M; SMZ 250 μ M; rekombinantní NAT2 0,2 mg/ml; pufr; V= 100 μ l. Detekčním činidlem bylo 25 μ l 10 mM DTNB v 6,4 M Gua-HCl. Absorbance byla měřena při 405 nm.



Obr. 19: Produkce AcCoA v čase v reakční směsi obsahující kontrolní cytosoly a SMZ jako substrát. Reakční směs obsahovala AcCoA 400 μ M; SMZ 250 μ M; potkaní jaterní kontrolní cytosoly 20 μ g celkového proteinu; pufr; V= 100 μ l. Detekčním činidlem bylo 25 μ l 10 mM DTNB v 6,4 M Gua-HCl. Absorbance byla měřena při 405 nm.

Tabulka 3: Enzymová aktivita NAT2 v cytosolárních vzorcích izolovaných z potkanů premedikovaných myricetinem a dihydromyricetinem.

Potkaní NAT2	Premedikace	Absorbance	Specifická aktivita (nmol/min/mg)
Játra	Kontrola	0,096	16,7 ± 2,2
	Myricetin	0,100	17,4 ± 0,78
	Dihydromyricetin	0,106	18,4 ± 1,3
Proximální část t.s.	Kontrola	0,041	7,1 ± 2,2
	Myricetin	0,035	6,1 ± 1,0
	Dihydromyricetin	0,043	7,4 ± 1,4
Střední část t.s.	Kontrola	0,078	6,8 ± 0,30
	Myricetin	0,049	4,3 ± 0,86
	Dihydromyricetin	0,052	4,5 ± 0,83
Distální část t.s.	Kontrola	0,048	4,2 ± 0,39
	Myricetin	0,055	4,8 ± 0,53
	Dihydromyricetin	0,060	5,2 ± 1,1
Tlusté střevo	Kontrola	3,44	29,9 ± 0,20
	Myricetin	0,126	11,0 ± 0,50
	Dihydromyricetin	0,318	27,7 ± 0,60

Reakční směs obsahovala AcCoA 400 μM; PABA 250 μM; potkaní cytosoly v množství 20 μg celkového proteinu; pufr; V= 100 μl. Detekčním činidlem bylo 25 μl 10 mM DTNB v 6,4 M Gua-HCl. Absorbance byla měřena při 405 nm a tyto hodnoty poté byly přepočítány na specifickou aktivitu enzymu dle vzorce uvedeného v metodě 3.3.7.

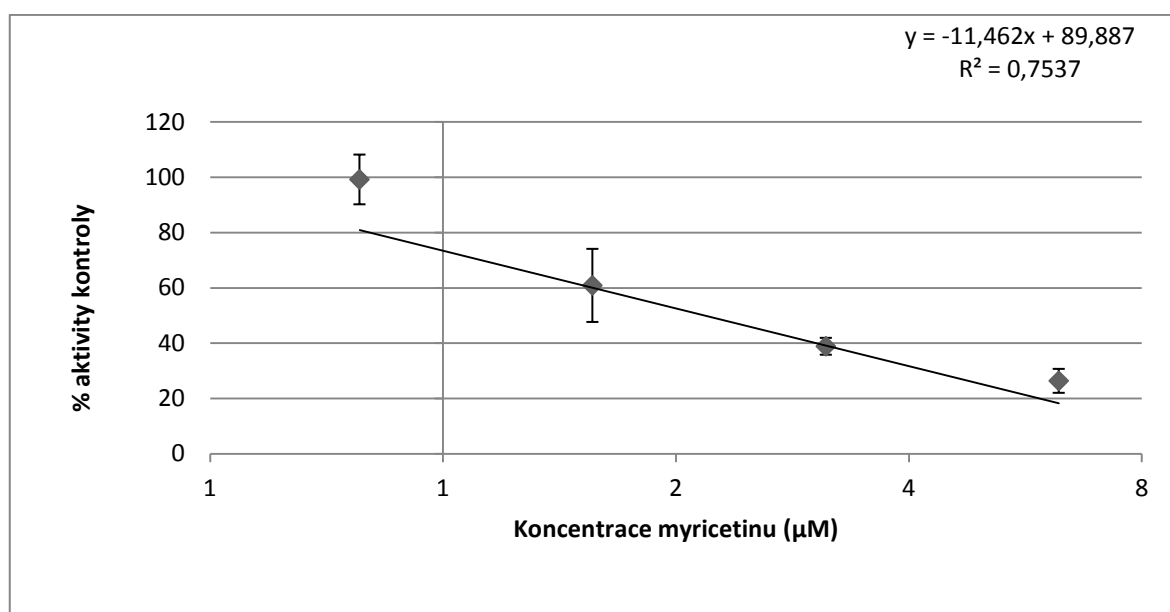
Tabulka 4: Enzymová aktivita NAT1 v cytosolárních vzorcích izolovaných z potkanů premedikovaných myricetinem a dihydromyricetinem.

Potkaní NAT1	Premedikace	Absorbance	Specifická aktivita (nmol/min/mg)
Játra	Kontrola	0,075	13,0 ± 3,8
	Myricetin	0,089	15,5 ± 1,4
	Dihydromyricetin	0,061	10,6 ± 0,79
Proximální část t.s.	Kontrola	0,108	6,3 ± 0,71
	Myricetin	0,018	1,0 ± 0,52
	Dihydromyricetin	0,093	5,4 ± 0,41
Střední část t.s.	Kontrola	0,050	2,9 ± 0,29
	Myricetin	0,051	3,0 ± 0,26
	Dihydromyricetin	0,031	1,8 ± 0,38
Distální část t.s.	Kontrola	0,063	3,6 ± 0,24
	Myricetin	0,091	5,3 ± 0,74
	Dihydromyricetin	0,091	5,3 ± 0,10
Tlusté střevo	Kontrola	0,091	5,3 ± 0,21
	Myricetin	0,040	2,3 ± 0,33
	Dihydromyricetin	0,098	5,2 ± 1,0

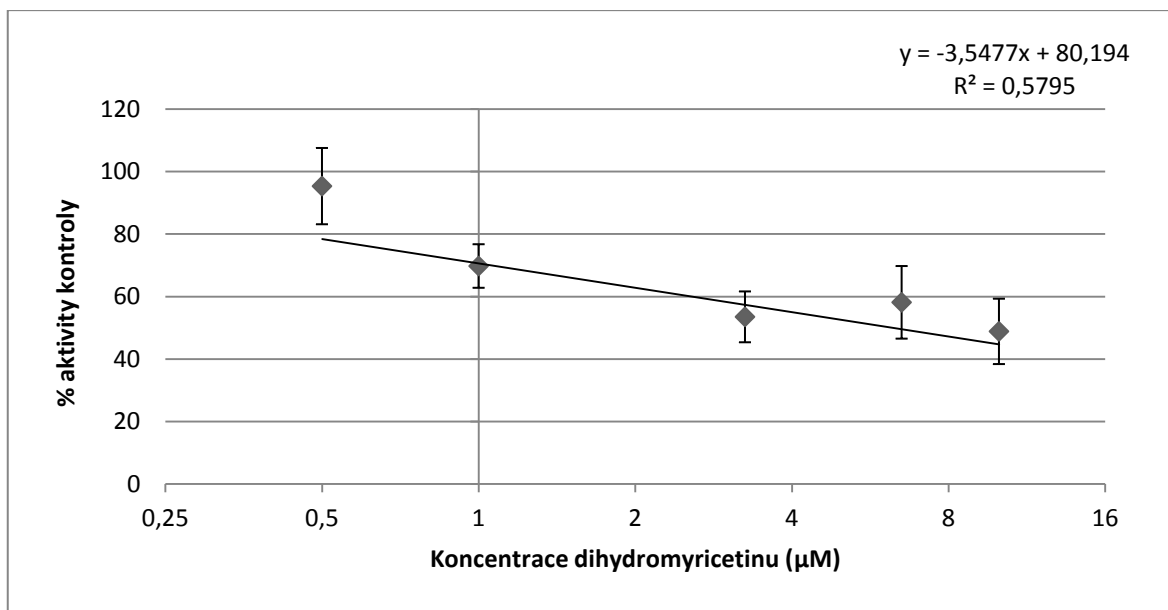
Reakční směs obsahovala AcCoA 400 μ M; SMZ 250 μ M; potkaní cytosoly v množství 20 μ g celkového proteinu; pufr; V= 100 μ l. Detekčním činidlem bylo 25 μ l 10 mM DTNB v 6,4 M Gua-HCl. Absorbance byla měřena při 405 nm a tyto hodnoty poté byly přepočítány na specifickou aktivitu enzymu dle vzorce uvedeného v metodě 3.3.7.

4.5 Inhibice aktivity NAT působením DHM a MYR

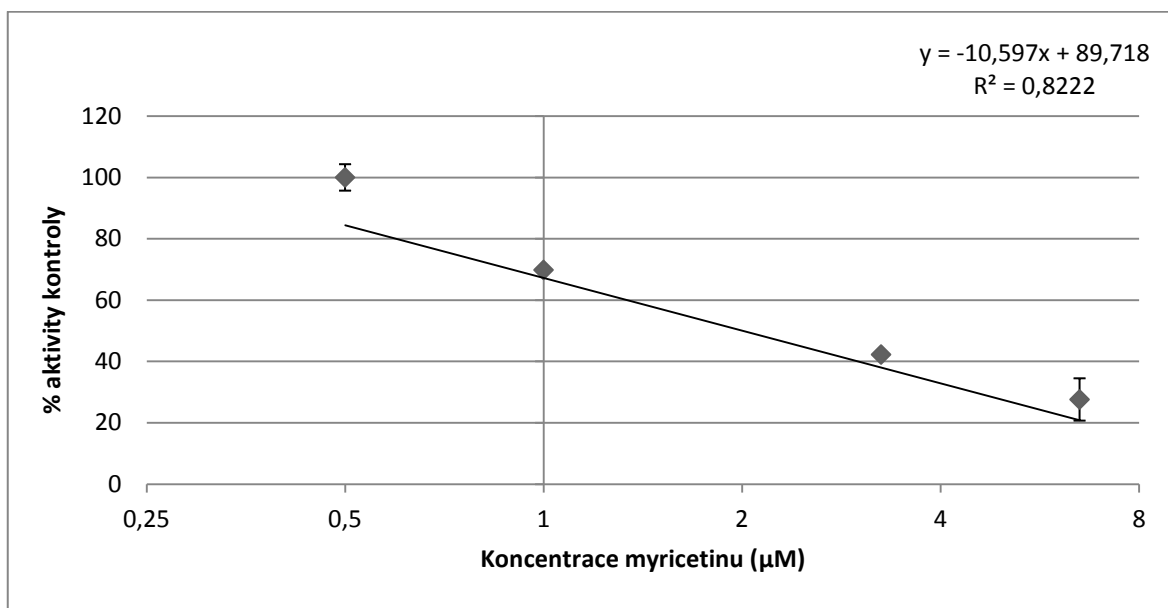
Reakční směs pro sledování inhibice NAT byla sestavena stejně jako směs pro ověření linearitu reakce. Součástí reakční směsi bylo také 5 μl methanolu s obsahem flavonoidu. Následně byly porovnány naměřené hodnoty absorbance směsi s inhibitorem vůči směsi s nulovou koncentrací inhibitoru. Výsledné procentuální hodnoty byly vyneseny do grafů (obr. 20-23, str. 59 -61) a z proložených logaritmických křivek byly stanoveny hodnoty IC_{50} , které jsou uvedeny v tabulce 5 na str. 61.



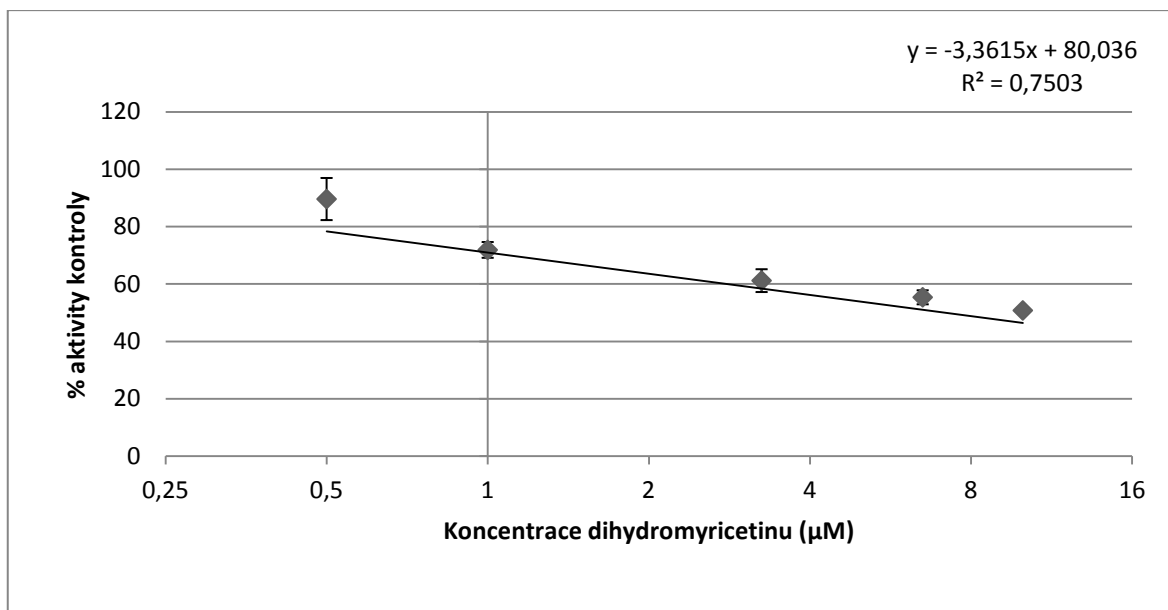
Obr. 20: Inhibice aktivity NAT1 myricetinem vyjádřená v procentech aktivity kontroly. Koncentrace substrátů ve směsi byla 400 μM AcCoA a 250 μM PABA a množství proteinu 0,1 mg/ml (rekombinantní NAT1).



Obr. 21: Inhibice aktivity NAT1 dihydromyricetinem vyjádřená v procentech aktivity kontroly. Koncentrace substrátů ve směsi byla 400 µM AcCoA a 250 µM PABA a množství proteinu 0,1 mg/ml (rekombinantní NAT1).



Obr. 22: Inhibice aktivity NAT2 myricetinem vyjádřená v procentech aktivity kontroly. Koncentrace substrátů ve směsi byla 400 µM AcCoA a 250 µM SMZ a množství proteinu 0,2 mg/ml (rekombinantní NAT2).



Obr. 23: Inhibice aktivity NAT2 dihydromyricetinem vyjádřená v procentech aktivity kontroly. Koncentrace substrátů ve směsi byla 400 µM AcCoA a 250 µM SMZ a množství proteinu 0,2 mg/ml (rekombinantní NAT2).

Tabulka 5: Hodnoty IC₅₀ myricetinu a dihydromyricetinu.

	NAT1	NAT2
Myricetin	3,5 µM	3,7 µM
Dihydromyricetin	8,5 µM	8,9 µM

Pro koncentrace substrátů 400 µM AcCoA a 250 µM PABA/SMZ a množství proteinu 0,1 µg/µl (NAT1) respektive 0,2 µg/µl (NAT2).

5. Diskuze

V současné době je na trhu velký výběr potravních doplňků, které bývají užívány za účelem prevence onemocnění či zlepšení zdravotního stavu. Často se jedná o přírodní látky, jejichž pozitivní účinky jsou ověřeny jak tradicí (bylinkářství, čínská medicína), tak i vědeckým výzkumem. Vedlejší účinky jsou však studovány velmi omezeně. Mimo jiné mohou tyto látky modulovat aktivitu biotransformačních enzymů a tím zasahují do metabolismu jak endogenních látek, tak i xenobiotik. Z toho důvodu je důležité znát možné dopady zvýšené konzumace těchto sloučenin, přestože jsou přírodního původu a proto jsou často považovány za nezávadné.

Předmětem této diplomové práce bylo studium vlivu dihydromyricetinu a pro srovnání také myricetinu na aktivitu biotransformačních enzymů CYP2E1 a NAT1/2. CYP2E1 je enzymem první fáze biotransformace, který se účastní například do metabolismu ethanolu a aktivace karcinogenních nitrosaminů. NAT jsou enzymy druhé fáze biotransformace, které hrají důležitou roli jak v odbourávání léčiv (isoniazid), tak v procesu aktivace prokarcinogenů (2-aminofluoren). Dihydromyricetin je přírodní sloučenina, která vykazuje zajímavé účinky při současném či *ex post* podání s ethanolem. Díky nim je dihydromyricetin potenciálním léčivem závislosti na alkoholu a také atraktivním potravním doplňkem pro lidi konzumující ve větší míře jednorázově alkohol. V souvislosti s touto vlastností dihydromyricetinu byl studován jeho vliv na CYP2E1. Myricetin je dihydromyricetinu velmi strukturně podobný (liší se dvojnou vazbou mezi atomy uhlíku C2 a C3) a jelikož se jedná o běžný rostlinný flavonoid, je také mnohem lépe prostudovaný. Vykazuje různé pozitivní účinky na lidský organismus, především antioxidační a protirakovinný.

Vliv myricetinu a dihydromyricetinu na aktivitu CYP2E1 nebyl dosud studován. Myricetin byl prokázán jako inhibitor jiných CYP, konkrétně CYP3A4 a CYP2C9 (Li C. a kol., 2011) ale určitý inhibiční efekt vykazuje také vůči CYP1A1/2 a CYP2B1 (Bostikova Z. a kol., 2015). Indukce CYP působením myricetinu není známá. Dihydromyricetin byl zjištěn jako inhibitor CYP2C9 a zároveň induktor CYP3A4 u potkanů (Huang Y. a kol., 2013). Jiné flavonoidy, například genistein a equol, byly

nalezeny jako inhibitory CYP2E1 (Helsby N.A. a kol., 1998), indukce tímto typem sloučenin však nebyla potvrzena (Helsby N.A. a kol., 1997) .

Vliv flavonoidů na aktivitu (indukce a inhibice) CYP2E1 byl zkoumán dvěma metodami. Nejprve byli těmito látkami premedikováni potkani, u kterých poté byla sledována proteinová exprese CYP2E1 v mikrosomálních vzorcích jater a střev technikou Western blot. V játrech nebyla zaznamenána indukce po premedikaci flavonoidy oproti kontrolnímu vzorku po premedikaci slunečnicovým olejem. Pro lokalizaci CYP2E1 na membráně byly použity jaterní mikrosomy izolované z potkanů premedikovaných ethanolem. Ačkoli v těchto mikrosomech měl být CYP2E1 indukován, tedy zobrazená zóna měla být výraznější, intenzita zabarvení zóny byla srovnatelná s ostatními. Příčinou tohoto efektu je pravděpodobně skutečnost, že CYP2E1 může být indukován nejen cizorodými látkami, ale také v důsledku hladovění (Hong J a kol., 1987). Vzhledem k tomu, že v průběhu premedikace byli potkani poslední den drženi bez potravy, došlo pravděpodobně k určité indukci CYP2E1 u všech skupin zvířat. Ve střevních preparátech nebylo detekováno zvýšené množství CYP2E1 oproti kontrole. Protože preparáty střev po indukci ethanolem nebyly k dispozici, k lokalizaci CYP2E1 na PVDF membráně a ověření funkčnosti protilátek byl použit též vzorek jaterních mikrosomů po indukci ethanolem. V případě proximální části tenkého střeva je na membráně viditelně snížené množství CYP2E1 po premedikaci myricetinem, což je pravděpodobně způsobeno nanesením celkově nižšího množství preparátu. Tato domněnka byla potvrzena kontrolním gelem barveným po SDS-PAGE barvivem Coomassie Brilliant Blue R250.

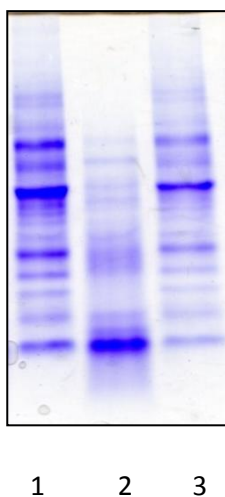
Druhou metodou bylo stanovení inhibice aktivity CYP2E1 působením myricetinu a dihydromyricetinu. Při tomto experimentu byla sledována tvorba produktu 6-hydroxychlorzoxazonu z chlorzoxazonu detekcí na HPLC. Jako zdroj enzymu byly použity mikrosomální vzorky izolované z jater potkanů premedikovaných ethanolem. Chlorzoxazon je sice substrátem nejen pro CYP2E1, ale také pro CYP1A1 (Lucas D. a kol., 1996), v předchozím výzkumu jsme však prokázali, že dihydromyricetin je velmi slabým inhibitorem CYP1A1 (Bostikova Z. a kol., 2015). V tomto uspořádání by tedy změna v hydroxylační aktivitě byla přisuzována modulaci především CYP2E1. Ani jedna z látek však za očekávaných fyziologických koncentrací (do 100 μ M) výrazně neinhibovala aktivitu CYP2E1.

Co se týče vlivu myricetinu a dihydromyricetinu na enzymy druhé fáze biotransformace, i zde již byly prokázány některé interakce. Oba flavonoidy mohou inhibovat aktivitu glutathion-S-transferasy (Yang X., Yang Z., 2010; Sahu S.C., Gray G.C., 1996). Myricetin byl prokázán jako inhibitor sulfottransferasy SULT1A1 (James M.O., Amabadapadi S., 2013). Také NAT mohou být ovlivněny flavonoidy, například quercetin zvyšuje *in vivo* aktivitu NAT2 (Chen Y. a kol., 2009), zatímco *in vitro* je quercetin inhibítoem obou NAT (Kukongviriyapan V. a kol., 2006). Jako další flavonoidní inhibitory NAT se projeví například wogonin (Yu C.S. a kol., 2005) či genistein (Kukongviriyapan V. a kol., 2006). Informace o interakcích dihydromyricetinu s těmito enzymy v literatuře zatím chybí.

Množství NAT na proteinové úrovni bylo sledováno v cytosolárních vzorcích jater a střev potkanů premedikovaných myricetinem a dihydromyricetinem. Ve studovaných vzorcích nebyla zaznamenána indukce NAT působením těchto flavonoidů. Ve střevech nebyla přítomnost NAT detekována v žádném ze studovaných vzorků. V játrech byla velmi slabě detekována přítomnost NAT v obou preparátech, jejich koncentrace byla srovnatelná s kontrolou. Nebylo však možné určit, o kterou detekovanou isoformu se jedná, jelikož protilátka s deklarovanou specifitou vůči NAT1 interagovala s oběma lidskými rekombinantními enzymy (NAT1 i NAT2), které byly použity jako pozitivní kontroly. Vzorek potkaních NAT, které se strukturně liší od lidských NAT, nebyl k dispozici. Nelze tedy vyloučit, že ačkoli výrobce uvádí, že protilátku lze použít i pro detekci potkaních isoform, ve skutečnosti tato protilátka nedostatečně funguje. Slabá či žádná detekce tedy nemusí být nutně způsobena nízkými koncentracemi sledovaného enzymu.

V dalším kroku byla sledována aktivita NAT1 a NAT2 v izolovaných vzorcích. Ve většině vzorků byly stanovené aktivity srovnatelné, ani jeden z flavonoidů nezpůsobil indukci NAT, což naznačují výsledky imunodetekce. V tlustém střevě po podání myricetinu bylo zaznamenáno výrazné snížení aktivity více než o 50% u obou isoform v porovnání s kontrolou. Toto snížení však pravděpodobně bylo způsobeno degradací proteinů ve vzorku. Tento důvod potvrdil i kontrolní barvený gel pro elektropřenos (obr. 24, str. 65), kde byl obsah proteinů s vyšší molekulovou hmotností zřetelně snížen. Obdobný trend, tedy nižší aktivita v tlustém střevě po premedikaci myricetinem, byl zjištěn též Mgr. Michaelou Bebovou, v případě aktivity sulfottransferas v identických preparátech

(dosud nepublikované výsledky). K degradaci vzorku pravděpodobně došlo, i přes použití inhibitorů peptidas, již v průběhu izolace, důvodem mohlo být nedostatečné promytí střev před homogenací. Kromě snížené aktivity ve vzorku tlustého střeva, byl zaznamenán významný pokles (více než 80%) specifické aktivity potkaní NAT1 také v proximální části tenkého střeva po premedikaci myricetinem. Tento jev byl opakovaně potvrzen a nelze ho přisuzovat poškození preparátu, jelikož pro NAT2 nebylo snížení aktivity zaznamenáno. Jak bylo zjištěno v následujícím experimentu, myricetin je schopen dosud neobjasněným mechanismem inhibovat aktivitu NAT již v poměrně nízkých koncentracích. Je tedy možné, že v izolovaném vzorku z nejvíce exponované tkáně byl myricetin ještě stále přítomen. Mohl by být například kovalentně vázaný v aktivním centru enzymu jako tzv. sebevražedný substrát. Není ovšem jasné, proč nedošlo též k ovlivnění aktivity NAT2, kterou je myricetin schopen účinně inhibovat za podmínek *in vitro*.



Obr. 24: Elektroforetický gel vzorků izolovaných z tlustého střeva premedikovaných potkanů. Pro elektroforesu byl použit 12% polyakrylamidový gel, do každé jamky bylo aplikováno 20 μg proteinu cytosolárních vzorků v redukujícím pufru po premedikaci slunečnicovým olejem - kontrola (1), myricetinem (2), dihydromyricetinem (3).

V poslední části této diplomové práce byla sledována inhibiční aktivita myricetinu a dihydromyricetinu vůči rekombinantním enzymům NAT1 a NAT2. Za použitých experimentálních podmínek byly nalezeny poměrně nízké hodnoty IC_{50} . Pro myricetin byly IC_{50} přibližně 2x nižší (3,5 μM pro NAT1 a 3,7 μM pro NAT2), než pro dihydromyricetin (8,5 μM pro NAT1 a 8,9 μM pro NAT2). Tento jev nižší účinnosti (např.

antioxidační či inhibiční vůči glutathion-S-transferase) více nasyceného flavonoidu je známý pro podobné dvojice, které se liší pouze jednou dvojnou vazbou, například taxifolin a quercetin (Rice-Evans C.A. a kol., 1996; Kumar S., Pandey A.K., 2013). U NAT byla již dříve popsána inhibice flavonoidními sloučeninami jako jsou wogonin (Yu C.S. a kol., 2005) a quercetin, u kterého byla také stanovena hodnota K_i a inhibice byla označena jako nekompetitivní (Kukongviriyapan V. a kol., 2006). V této studii však nebyl brán v úvahu dvousubstrátový mechanismus reakce N-acetyltransferas. Pokud by flavonoidy inhibovaly první krok, tedy reakci s navázáním AcCoA do aktivního centra, měla by inhibice obraz nekompetitivního mechanismu, jak naznačuje zmíněná studie. Ačkoli v rámci této diplomové práce nebyl studován mechanismus dané inhibice působením myricetinu a dihydromyricetinu, bylo by třeba provést experimenty, při nichž by byl testován efekt flavonoidů na oba substráty N-acetyltransferas (AcCoA a PABA/SMZ).

Dihydromyricetin je sloučenina potenciálně účinná jako lék závislosti na alkoholu díky svému vlivu na receptory v mozku a také na aktivitu enzymů podílejících se na odbourávání alkoholu (alkohol dehydrogenasy a aldehyddehydrogenasy) (Shen Y. a kol., 2012). V této práci bylo dokázáno, že dihydromyricetin nezasahuje do metabolismu ethanolu modulací exprese či aktivity CYP2E1. Ani myricetin, dihydromyricetinu strukturně podobný flavonoid, nemá vliv na aktivitu CYP2E1.

Ani jeden z flavonoidů neindukuje NAT, ale oba dva flavonoidy inhibují jejich aktivitu. Již dříve bylo dokázáno, že aktivitu NAT mohou inhibovat i jiné flavonoidy, především quercetin (Kukongviriyapan V. a kol., 2006). Quercetin je nejrozšířenějším flavonoidem přijímaným v potravě, přičemž jeho průměrný denní příjem se pohybuje v desítkách miligramů (Formica J.V., Regelson W, 1995). Tento relativně vysoký příjem však zřejmě nemá vliv na lidské zdraví. Dihydromyricetin z tohoto hlediska tedy nemusí být vnímán jako škodlivá sloučenina.

6. Souhrn

V této diplomové práci zaměřené na studium vlivu dvou flavonoidů, dihydromyricetinu a myricetinu na biotransformační enzymy CYP2E1 a NAT1/2 bylo dosaženo následujících výsledků:

- CYP2E1 nebyl indukován v játrech ani ve střevech potkanů po premedikaci myricetinem a dihydromyricetinem
- Dihydromyricetin ani myricetin neinhibovali aktivitu CYP2E1 v koncentracích nižších než 1 mM respektive 0,1 mM
- NAT1/2 nebyly indukovány v játrech ani střevech potkanů po premedikaci myricetinem a dihydromyricetinem
- Po premedikaci myricetinem došlo ke snížení aktivity NAT1 (o více než 80%) v proximální části tenkého střeva potkanů, v jiných preparátech nebylo detekováno relevantní snížení aktivity NAT1/2 po premedikaci myricetinem ani dihydromyricetinem
- Oba flavonoidy inhibovaly aktivitu NAT. Byly stanoveny jejich hodnoty IC_{50} vůči oběma enzymům, NAT1 i NAT2. Pro myricetin byly IC_{50} nižší (3,5 μ M pro NAT1 a 3,7 μ M pro NAT2), než pro dihydromyricetin (8,5 μ M pro NAT a 8,9 μ M pro NAT2)

7. Seznam použité literatury

- Akiyama, T.E., Gonzalez, F.J.: *Biochim. Biophys. Acta* 1619, 223-234 (2003)
- De Angelis, J., Gastel, J., Klein, D.C., Cole, P. A.: *J. Biol. Chem.* 273, 3045-3050 (1998)
- Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E.: *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 737-747 (2001)
- Appelt, L. C., Reicks, M.M.: *J. Nutr.* 129, 1820-1826 (1999)
- Barnes, S.: *J. Nutr.* 125, 777S-783S (1995)
- Bostikova, Z., Moserova, M., Pavek, P., Stiborova, M., Hodek, P.: *Neuroendocrinol. Lett.* 36, 46-52 (2015)
- Boukouvala, S., Fakis, G.: *Drug Metab. Rev.* 37, 511-564 (2005)
- Brooke, E.W., Davies, S.G., Mulvaney, A.W., Pompeo, F., Sim, E., Vickers, R.J.: *Bioorg. Med. Chem.* 11, 1227-1234 (2003)
- Butcher, N.J., Ilett, K.F., Minchin, R.F.: *Mol. Pharmacol.* 57, 468-473 (2000)
- Carper, W.R., Dorey, R.C., Beber, J.H.: *Clin. Chem.* 33, 1906-1910 (1987)
- Cederbaum, A.I.: *Redox. Biol.* 4, 60-73 (2015)
- Danielson, P.B.: *Curr. Drug Metab.* 3, 561-597 (2002)
- Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G., Schlichting, I.: *Chem. Rev.* 105, 2253-2277 (2005)
- Doty, S.L., James, C.A., Moore, A.L., Vajzovic, A., Singleton, G.L., Ma, C., Khan, Z., Xin, G., Kang, J.W., Park, J.Y., Mellan, R., Strauss, S.H., Wilkerson, J., Farin, F., Strand, S.E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 16816-16821 (2007)
- Du, Q., Cai, W., Xia, M., Ito, Y.: *J. Chromatogr. A* 973, 217-220 (2002)
- Edwards, R.J., Murray, B.P., Singleton, A.M., Boobis, A.R.: *Biochemistry* 30, 71-76 (1991)
- Evans, D.A.P., Manley, K.A., McKusick, V.A.: *Br. Med. J.* 2, 485-491 (1960)
- Formica, J.V., Regelson, W.: *Fd. Chem. Toxic.* 33, 1061-1080 (1995)
- Garfinkel, D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493-509 (1958)
- Gelboin, H.V.: *Physiol. Rev.* 60, 1107-1166 (1980)
- Gonzales, F.J.: *Drug Metab. Dispos.* 35, 1-8 (2007)
- Guengerich, F.P.: *Chem. Res. Toxicol.* 4, 391-407 (1991)
- Guo, Q., Yuan, J., Zeng, J., He, X., Li, D.: *J. Mol. Struct.* 1027, 64-69 (2012)

- Gupta, S.C., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W., Aggarwal, B.B.: *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1295-1322 (2012)
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., Bernhardt, R.: *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 330-344 (2007)
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J.: *J. Nutr. Biochem.* 13, 572-584 (2002)
- Hein, D.W.: *Toxicol. Lett.* 112-113, 349-356 (2000)
- Helsby, N.A., Williams, J., Kerr, D., Gescher, A., Chipman, J.K.: *Xenobiotica* 27, 587-596 (1997)
- Helsby, N.A., Chipman, J.K., Gescher, A., Kerr, D.: *Food Chem. Toxicol* 36, 375-382 (1998)
- Hildebrandt, A., Estabrook, R.W.: *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 66-79 (1971)
- Hong, J., Pan, J., Gonzales, F.J., Gelboin, H.V., Yang, C.S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 1077-1083 (1987)
- Honkakoski, P., Negishi, M.: *Biochem. J.* 347, 321-337 (2000)
- Hou, X.L., Tong, Q., Wang, W.Q., Shi, C.Y., Xiong, W., Chen, J., Liu, X., Fang, J.G.: *J. Nat. Prod.* 78, 1689-1696 (2015)
- Hsia, T.C., Chung, J.G., Lu, H.F., Ho, H.C., Yang, C.C., Lu, K.H., Hung, C.F.: *Food Chem. Toxicol.* 40, 697-703 (2002)
- Huang, Y., Xu, Z., Ye, Q.: *Lat. Am. J. Pharm.* 32, 1570-1574 (2013)
- Hyun, T.K., Eom, E.H., Yu, C.Y., Roitsch, T.: *Planta Med.* 76, 943-949 (2010)
- Chen, C., Yu, R., Owuor, E.D., Kong, A.N.T.: *Arch. Pharm. Res.* 23, 605-612 (2000)
- Chen, G.F., Ronis, M.J.J., Ingelman-Sundberg, M., Badger, T.M.: *Xenobiotica* 29, 437-451 (1999)
- Chen, C.H.: *Activation and Detoxification Enzymes*, Springer New York (2011)
- Chen, Y., Xiao, P., Ou-Yang, D.S., Fan, L., Guo, D., Wang, Y.N., Han, Y., Tu, J.H., Zhou, G., Huang, Y.F., Zhou, H.H.: *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36, 828-833 (2009)
- Ioannides, C.: *Xenobiotica* 29, 109-154 (1999)
- James, M.O., Ambadapadi, S.: *Drug Metab. Rev.* 45, 401-414 (2013)
- Jancova, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E.: *Biomed. Pac. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 154, 103-116 (2010)
- Jayaraj, R., Bhaskar, A.S.B., Prasad, G.B.K.S., Lakshmana-Rao, P.V.: *Environ. Toxicol.* 22, 472-479 (2007)
- Jenne, J.W., Orser, M.: *J. Clin. Invest.* 44, 1992-2002 (1965)
- Kadkhodayan, S., Coulter, E.D., Maryniak, D.M., Bryson, T.A., Dawson, J.H.: *J. Biol. Chem.* 270, 28042-28048 (1995)

- Kawamura, A., Graham, J., Mushtaq, A., Tsiftoglou, S.A., Vath, G.M., Hanna, P.E., Wagner, C.R., Sim, E.: *Biochem. Pharmacol.* 69, 347-359 (2005)
- Khan, R.A., Khan, M.R., Sahreen, S.: *BMC Complement. Altern. Med.* 12, 178-183 (2012)
- Kinzig-Schippers, M., Tomalik-Scharte, D., Jetter, A., Scheidel, B., Jakob, V., Rodamer, M., Cascorbi, I., Doroshyenko, O., Sörgel, F., Fuhr, U.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1733-1738 (2005)
- Klingenberg, M.: *Arch. Biochem.* 75, 376-386, (1958)
- Knežlić, Z., Ruml, T.: *Chem. Listy* 94, 913-918 (2000)
- Kou, X., Chen, N.: *Food Sci. Hu. Wellness* 1, 14-18 (2012)
- Kukongviriyapan, V., Phromsopha, N., Tassaneeyakul, W., Kukongviriyapan, U., Sripa, B., Hahnvajjanawong, V., Bhundhisawasdi, V.: *Xenobiotica* 36, 15-28 (2006)
- Kumar, S.: *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 6, 115-131 (2010)
- Kumar, S., Pandey, A.K.: *Sci. World J.* 2013
- Lamport, D.J., Dye, L., Wightman, J.D., Lawton, C.L.: *Nutr. Aging* 1, 5-25 (2012)
- Lee, S.S.T., Buters, J.T.M., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., Gonzales, F.J.: *J. Biol. Chem.* 271, 12063-12067 (1996)
- Li, C., Lim, S.C., Kim, J., Choi, J.S.: *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 36, 175-182 (2011)
- Liang, J., Olsen, R.W.: *Acta Pharmacol. Sin.* 35, 981-993 (2014)
- Lieber, C.S., Rubin, E., DeCarli, L.M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 858-865 (1970)
- Liu, B., Zhou, W., Chen, X., Xu, F., Chen, Y., Liu, J., Zhang, Q., Bao, N., Li, M., Zhu, R.: *Mol. Med. Rep.* 11, 1609-1614 (2015)
- Lu, Y., Cederbaum, A.I.: *Free Radic. Biol. Med.* 44, 723-738 (2008)
- Lucas, D., Menez, J.F., Berthou, F.: *Methods Enzymol.* 272, 115-123 (1996)
- Ludwig E., Schmid, J., Beschke, K., Ebner, T.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 1-8 (1999)
- Manyike, P.T., Kharasch, E.D., Kalhorn, T.F., Slattery J.T.: *Clin. Pharmacol. Ther.* 67, 257-282 (2000)
- Minchin, R.F., Hanna, P.E., Dupret, J.M., Wagner, C.R., Rodrigues-Lima, F., Butcher, N.J.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1999-2005 (2007)
- Montellano, P.R.O., Correia, M.A.: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry (Second Edition)*, Springer New York (1995)
- Nebert, D.W., Wikvall, K., Miller, W.L.: *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B., Biol. Sci.* 368 (2013)

- Nebert, D.W., Nelson, D.R., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzales, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B.: *DNA* **8**, 1-13 (1989)
- Nelson, D.R., Strobel, H.W.: *J. Biol. Chem.* **263**, 6038-6050 (1988)
- Ogata, J., Kanno, Y., Itoh, Y., Tsugawa, H., Suzuki, M.: *Nature* **435**, 757-758 (2005)
- Omura, T., Sato, R.: *J. Biol. Chem.* **237**, 1375-1376 (1962)
- Ong, K.C., Khoo, H.E.: *Gen. Pharmac.* **29**, 121-126 (1997)
- Peter, R., Böcker, R., Beaune, P.H., Iwasaki, M., Guengerich, F.P., Yang, C.S.: *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 566-573 (1990)
- Pietta, P.G.: *J. Nat. Prod.* **63**, 1035-1042 (2000)
- Porubsky, P.R., Meneely, K.M., Scott, E.E.: *J. Biol. Chem.* **283**, 33698-33707 (2008)
- Rendic, S., Di Carlo, F.J.: *Drug Metab. Rev.* **29**, 413-580 (1997)
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G.: *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 933-956 (1996)
- Riddle, B., Jencks, W.P.: *J. Biol. Chem.* **246**, 3250-3258 (1971)
- Sahu, S.C., Gray, G.C.: *Cancer Lett.* **104**, 193-196 (1996)
- Shen, Y., Lindemeyer, A.K., Gonzales, C., Shao, X.M., Spigelman, I., Olsen, R.W., Liang, J.: *J. Neurosci.* **32**, 390-401 (2012)
- Shi, L., Zhang, T., Zhou, Y., Zeng, X., Ran, L., Zhang, Q., Zhu, J., Mi, M.: *Endocrine.* **50**, 378-389 (2015)
- Shin, J.C., Jung, H.Y., Harikishore, A., Kwon, O.D., Yoon, H.S., Kim, K.T., Choi, B.H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **440**, 312-316 (2013)
- Schroer, K., Kittelmann, M., Lütz, S.: *Biotechnol. Bioeng.* **106**, 699-706 (2010)
- Sim, E., Pinter, K., Mushtaq, A., Upton, A., Sandy, J., Bhakta, S., Noble, M.: *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 615-619 (2003)
- Sim, E., Abuhammad, A., Ryan, A.: *Br. J. Pharmacol.* **171**, 2705-2725 (2014)
- Sim, E., Walters, K., Boukouvala, S.: *Drug Metab. Rev.* **40**, 479-510 (2008)
- Skibola, C.F., Smith, M.T.: *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 375-383 (2000)
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C.: *Anal. Biochem.* **150**, 76-85 (1985)
- Springob, K., Kutchan, T.M.: *Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application*, Springer New York (2009)
- Stark, K., Guengerich, F.P.: *Drug Metab. Rev.* **39**, 627-637 (2007)

- Stevenson, D.E., Hurst, R.D.: *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2900-2916 (2007)
- Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: *Chem. Listy* 93, 229-237 (1999)
- Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J., Martínek, V., Páca, J.: *Chem. Listy* 98, 876-890 (2004)
- Su, D., Huang, J., Yao, M.: *Hunan Agricol. Sci.* 11, (2009)
- Surh, Y.J.: *Chem. Biol. Interact.* 109, 221-235 (1998)
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354 (1979)
- Upton, A., Johnson, N., Sandy, J., Sim, E.: *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 140-146 (2001)
- Walraven, J.M., Doll, M.A., Hein, D.W.: *J. Pharmacol. Expt. Ther.* 319, 369-375 (2006)
- Wang, T., Shankar, K., Ronis, M.J.J., Mehendale, H.M.: *J. Pharmacol. Expt. Ther.* 294, 473-479 (2000)
- Waris, G., Ahsan, H.: *J. Carcinog.* 5, 14 (2006)
- White, R.E., Sligar, S.G., Coon, M.J.: *J. Biol. Chem.* 255, 11108-11111 (1980)
- Winkel-Shirley, B.: *Plant Physiol.* 126, 485-493 (2001)
- Xu, B., Sung, C.K.: *Drug Alcohol Rev.* 24, 525-536 (2005)
- Yang, L., Wu, D., Ceredbaum, A.I.: *J. Biochem. Pharmacol. Res.* 2, 74-90 (2014)
- Yang, X., Yang, Z.: *Chinese Pharmacol. Bull.* 7, (2010)
- Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomás-Barberán, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S.: *Plant Foods Hum. Nutr.* 59, 113-122 (2004)
- Yu, C.S., Yu, F.S., Chuang, Y.C., Lu, H.F., Lin, S.Y., Chiu, T.H., Chung, J.G.: *Anticancer Res.* 25, 127-132 (2005)
- Yue, Q.Y.: *Lancet* 355, 576-577 (2000)
- Zhang, A.L., Changli Xue, C., Fong, HHS: *Herbal Medicine*, 2nd edition, *Taylor and Francis group* (2011)
- Zhang, Q., Liu, J., Liu, B., Xia, J., Chen, N., Chen, X., Cao, Y., Zhang, C., Lu, C., Li, M., Zhu, R.: *Sci. Rep.* 4, 1-11 (2014)
- Zhang, Y., Que, S., Yang, X., Wang, B., Qiao, L., Zhao, Y.: *Magn. Reson. Chem.* 45, 909-916 (2007)
- Zhang, Y.S., Ning, Z.X., Yang, S.Z., Wu, H.: *Yao Xue Xue Bao* 38, 241-244 (2003)
- Zhou, S., Yung Chan, S., Cher Goh, B., Chan E., Duan W., Huang M., McLeod, H.L.: *Clin. Pharmacokinet.* 44, 279-304 (2005)

Zou, D., Chen, K., Liu, P., Chang, H., Zhu, J., Mi, M.: *Med. Sci. Sports Exerc.* **46**, 2077-2084 (2014)

Webové odkazy:

1. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/43510> (13. 8. 2016)
2. <http://www.hindawi.com/journals/abi/2011/506583/fig1/> (13. 8. 2016)
3. <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/> (14. 8. 2016)
4. <https://img1.doubanio.com/lpic/s26340977.jpg> (14.8.2016)
5. <http://www.cnseed.org/wp-content/uploads/Hovenia%20dulcis.jpeg> (14.8.2016)
6. <https://worldwalkermagazine.com/2015/06/26/condition-%EC%BB%A8%EB%94%94%EC%85%98-the-sweet-elixir-of-life-after-soju/> (14.8.2016)
7. http://www.exportimes.com/products/100-natural-Moyeam-tea-health-tea_23727.html (14.8.2016)
8. <https://buy.sobur.co/products/sobur-hangover-cure> (14.8.2016)
9. https://en.wikipedia.org/wiki/Cytochrome_P450#/media/File:P450cycle.svg (14.8.2016)
10. <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/main-table> (14.8.2016)
11. http://nat.mbg.duth.gr/Human%20NAT1%20alleles_2013.htm (14.8.2016)
12. http://nat.mbg.duth.gr/Human%20NAT2%20alleles_2013.htm (14.8.2016)
13. <http://www.ok.cz/dkitt/> (14.8.2016)

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

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka