

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

**MODULACE BIOTRANSFORMAČNÍCH A ANTIOXIDAČNÍCH
ENZYMŮ VYBRANÝMI PŘÍRODNÍMI LÁTKAMI**

Disertační práce

Mgr. Kateřina Lněničková

Vedoucí disertační práce:

prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Hradec Králové, 2017

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením své školitelky). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

Mgr. Kateřina Lněničková

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a především za přátelský přístup po celou dobu mého doktorského studia.

Děkuji svým spolupracovníkům, zejména prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za pomoc a podporu při řešení projektu. Dále děkuji PharmDr. Haně Svobodové, Ph.D., Ing. Petře Matouškové, Ph.D. a doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za pomoc a odborné a přátelské rady.

Děkuji pracovnímu kolektivu Katedry biochemických věd za vytváření příjemné a přátelské atmosféry a ochotu vždy poradit a pomoci.

Za finanční podporu děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy, grant č. 2014/1874214, Grantové agentuře České Republiky, grant č. P303/12/G163. Tato disertační práce vznikla za podpory Specifického vysokoškolského výzkumu č. 260 416.

Velké poděkování patří mé rodině a přátelům za jejich trpělivost a podporu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát:

Mgr. Kateřina LNĚNIČKOVÁ

Školitel:

prof. Ing. Barbora SZOTÁKOVÁ, Ph.D.

Název disertační práce:

MODULACE BIOTRANSFORMAČNÍCH A ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ
VYBRANÝMI PŘÍRODNÍMI LÁTKAMI

V posledních desetiletích významně stoupl zájem o různé doplňky stravy, které obsahují léčivé byliny, rostlinné extrakty či izolované účinné látky. Jejich spotřeba celosvětově roste, a protože jsou obecně považovány za bezpečné, jsou mnohdy konzumovány v nepřiměřeně velkých dávkách. Po vstupu do organismu jsou tyto látky, stejně jako jiná xenobiotika, modifikovány především prostřednictvím biotransformačních enzymů a současně mohou tyto enzymy ovlivňovat. Případná modulace aktivity (indukce nebo inhibice) biotransformačních enzymů může významně ovlivnit farmakokinetiku současně podávaných léčiv. Pro bezpečné užívání přírodních látek je tedy nezbytná znalost jejich možného působení na biotransformační enzymy.

Cílem předkládané disertační práce bylo studovat účinky extraktů vybraných rostlin a jejich obsahových látek s biologickým účinkem na aktivitu a expresi biotransformačních a antioxidačních enzymů. Zaměřili jsme se na studium účinků extraktů a obsahových látek z brusinky velkoplodé (*Vaccinium macrocarpon*, Ericaceae), zeleného čaje (*Camellia sinensis*, Theaceae) a z voskovníku červeného (*Myrica rubra*, Myricaceae) v *in vitro* a *in vivo* modelových systémech. Účinek extraktu ze zeleného čaje a hlavních katechinů na biotransformační enzymy, který byl *in vitro* studován ve střevní nádorové linii Caco-2 v proliferující i diferencované formě (buňky podobné enterocytům), byl jen mírný a neměl by tedy ovlivnit metabolismus současně podávaných léčiv. Naproti tomu seskviterpeny

z voskovníku červeného způsobily významnou inhibici aktivity cytochromů P450 *in vitro* v mikrosomech z lidských i potkaních jater, avšak v následující *in vivo* studii se tento účinek v myších játrech a střevech nepotvrdil. Podání brusinkového extraktu vyvolalo jen mírné zvýšení aktivity biotransformačních enzymů v játrech potkana, zatímco v tenkém střevě zůstaly aktivity těchto enzymů beze změny. Současné podávání brusinkového extraktu by tedy nemělo vyvolat závažné lékové interakce. Navíc by jeho podání mohlo být prospěšné u obézních jedinců, protože při jeho podávání myším s navozenou obezitou došlo k pozitivnímu ovlivnění redoxního statutu a zvýšení aktivity/exprese některých antioxidačních enzymů. Součástí experimentální práce bylo rovněž zhodnotit časovou korelaci mezi změnami v aktivitě enzymu, a jeho proteinové a genové expresi po indukčním podnětu. Intenzita a časový průběh modulace jednotlivých biotransformačních enzymů se na jednotlivých úrovních lišily a jejich vzájemná korelace také. Získané výsledky byly užitečné pro plánování dalších *in vivo* studií.

Výsledky disertační práce pomohly prohloubit znalosti o působení přírodních látek na organismus. Odhalení případných modulačních účinků na aktivitu/expresi biotransformačních enzymů může přispět k bezpečnějšímu užívání současně podávaných léčiv.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate:

Mgr. Kateřina LNĚNIČKOVÁ

Supervisor:

prof. Ing. Barbora SZOTÁKOVÁ, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis:

MODULATION OF BIOTRANSFORMATION AND ANTIOXIDANT ENZYMES BY
SELECTED NATURAL COMPOUNDS

Public interest in various dietary supplements containing herbs, herbal extracts or isolated active compounds has increased significantly over past decades. Consumption of these supplements increases worldwide and they are often consumed in unreasonably high doses, as they are generally considered as safe. Upon the intake to organism, these compounds are, as other xenobiotics, modified mostly by xenobiotic-metabolizing enzymes and they could influence these enzymes at the same time. Potential modulation of xenobiotic-metabolizing enzymes' activity (induction or inhibition) can seriously affect pharmacokinetics of concomitantly administered drugs. Knowledge of the possible impact of natural compounds on the xenobiotic-metabolizing enzymes is essential for their safe use.

The aim of this doctoral thesis was to study the effects of selected herbal extracts and their active chemical constituents on the activity and expression of xenobiotic-metabolizing and antioxidant enzymes. We have focused on the study of effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*, Ericaceae), green tea (*Camellia sinensis*, Theaceae) and Chinese bayberry (*Myrica rubra*, Myricaceae) extracts and their chemical constituents in the *in vitro* and the *in vivo* model systems. Green tea extract and its main catechin epigallocatechin gallate should not influence metabolism of co-administered drugs because their effect on the xenobiotic-metabolizing enzymes, which was studied *in vitro* in the intestinal cancer cell line Caco-2 in proliferative as well as in differentiated form (enterocyte-like cells), was only mild. Contrary, sesquiterpenes of Chinese bayberry caused significant cytochrome P450 inhibition *in vitro* in human and rat liver microsomes, but this effect was not confirmed in subsequent *in vivo* study in mouse liver and intestine. Administration of cranberry extract caused only moderate increase in xenobiotic-metabolizing enzymes' activity in rat liver, while no changes in the

activity of these enzymes were found in small intestine. Concomitant administration of cranberry extract should not cause serious drug interactions. Moreover, administration of cranberry extract to obese individuals could be beneficial, because its administration to mice with obesity positively influenced redox status and increased activity/expression of some antioxidant enzymes. Part of the experimental work was to evaluate time correlation between enzyme activity and its protein and gene expression upon induction. The intensity and time course of individual xenobiotic-metabolizing enzymes' modulation differed on individual levels as well as their correlation. Obtained results were useful for planning of subsequent *in vivo* studies.

The obtained results of this doctoral thesis extend the knowledge about acting of natural compounds on the organism. Revealing of the possible modulation effects of dietary supplements on the activity/expression of xenobiotic-metabolizing enzymes could contribute to the safe use of co-administered drugs.

OBSAH

1 ÚVOD	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 PŘÍRODNÍ LÁTKY	11
2.1.1 Fenolické látky	11
2.1.2 Terpeny a jejich účinky	18
2.2 METABOLISMUS XENOBIOTIK	22
2.2.1 Oxidace	23
2.2.2 Redukce	24
2.2.3 Hydrolýza a hydratace	25
2.2.4 Glukuronidace	25
2.2.5 Sulfonace	25
2.2.6 Konjugace s glutathionem	26
2.2.7 Metylace	26
2.2.8 N-acetylace	27
2.2.9 Konjugace s aminokyselinami	27
2.2.10 Transportní proteiny	28
2.2.11 Modulace biotransformačních enzymů	28
2.3 ANTIOXIDAČNÍ OBRANNÝ SYSTÉM	30
2.3.1 Enzymové antioxidanty	31
2.3.2 Neenzymové antioxidanty	32
2.4 METODIKA	34
2.4.1 Stanovení enzymové aktivity	34
2.4.2 Stanovení koncentrace proteinů	36
2.4.3 Průkaz a semikvantitativní stanovení proteinů	36
2.4.4 Kvantifikace mRNA	37
3 CÍLE PRÁCE	38
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	39
4.1 ČASOVÁ ZÁVISLOST ZMĚN AKTIVITY A PROTEINOVÉ A GENOVÉ EXPRESE BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ	39
4.2 KATECHINY ZELENÉHO ČAJE A AKTIVITA KONJUGAČNÍCH ENZYMŮ IN VITRO	41
4.3 LINEÁRNÍ SESKVITERPENY A AKTIVITA BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ IN VITRO	42
4.4 CYKlické SESKVITERPENY A AKTIVITA BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ IN VITRO	44
4.5 SESKVITERPENY B-KARYOFYLEN OXID A TRANS-NEROLIDOL A BIOTRANSFORMAČNÍ ENZYMY IN VIVO	45

4.6 BRUSINKOVÝ EXTRAKT A AKTIVITA A EXPRESE BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ	46
4.7 BRUSINKOVÝ EXTRAKT A ANTIOXIDAČNÍ OCHRANA U OBÉZNÍCH MYŠÍ	47
5 ZÁVĚR	48
6 PODÍL PŘEDKLADATELKY NA PUBLIKACÍCH ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI	49
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
8 PŘÍLOHY	61
8.1 PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU DISERTAČNÍ PRÁCE	61
8.1.1 Publikace I	63
8.1.2 Publikace II	80
8.1.3 Publikace III	92
8.1.4 Publikace IV	104
8.1.5 Publikace V	121
8.1.6 Publikace VI	147
8.1.7 Publikace VII	161
8.2 PREZENTACE NA KONFERENCÍCH	171
8.3 SEZNAM ZKRATEK	173

1 ÚVOD

Zvýšení zájmu veřejnosti o přírodní látky s pozitivními účinky na lidské zdraví a jejich rozšíření ve formě potravních doplňků vedlo zároveň k jejich důkladnějšímu studiu. Mezi hlavní rizika patří modulace farmakokinetiky současně podávaných léčiv, což může vést k nedostatečné terapii a někdy dokonce i k ohrožení života pacienta. Již je známo mnoho případů, kdy kombinace přírodní látky s léčivem ohrožuje zdraví pacienta. Příkladem toho může být krvácení při současném užívání jinanu dvoulaločného (*Ginkgo biloba*, Ginkgoaceae) a warfarinu (antikoagulancium), nebo serotoninový syndrom navozený kombinací třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*, Hypericaceae) se selektivními inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (antidepresiva) (Fugh-Berman 2000).

Listy čajovníku jsou široce rozšířeny dnes už nejen jako oblíbený nápoj, ale také jako doplňky stravy s obsahem celého extraktu či izolovaných látek. Velice oblíbené jsou také přípravky s extrakty z brusinek, které pacienti užívají nejčastěji k prevenci či potlačení infekce dolních cest močových. Velký potenciál ve farmacii mají také seskviterpeny, mimo jiné taky pro jejich výrazný antioxidační účinek v organismu. Všechny tyto extrakty/látky se staly předmětem našeho zájmu, neboť informace o jejich vlivu na biotransformaci a antioxidační ochranný systém byly nekompletní a naším úmyslem bylo přispět k jejich doplnění.

Ačkoliv je velká pozornost věnována studiu mechanismů biologických účinků přírodních látek, problematika modulace biotransformačních enzymů je často odsunuta do pozadí. Záměrem této disertační práce je proto rozšířit dosavadní poznatky a přinést nové informace o působení přírodních látek na biotransformační enzymy a antioxidační obranný systém buněk. Cílem prováděných experimentů bylo stanovit specifické aktivity a exprese proteinů a mRNA biotransformačních a antioxidačních enzymů a zhodnotit dopad případné modulace přírodními látkami.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 PŘÍRODNÍ LÁTKY

Rostliny syntetizují široké spektrum organických látek, které jsou tradičně klasifikovány jako primární a sekundární metabolity. Primární metabolity jsou látky, které hrají zásadní roli ve fotosyntéze, dýchání, růstu a vývoji rostliny. Patří sem fytoosteroly, nukleotidy, sacharidy, proteiny, lipidy, aminokyseliny a organické kyseliny. Další fytochemické látky, označované jako sekundární metabolity, se mohou akumulovat v rostlinách v překvapivě vysokých koncentracích. Jedná se o strukturně rozmanitou skupinu látek. Některé z nich se vyskytují ve velmi omezeném počtu druhů rostlin a mohou tak sloužit jako chemotaxonomické markery. Jejich funkce v rostlinách jsou stále intenzivně studovány. Doposud bylo prokázáno, že hrají klíčovou roli v ochraně rostliny před býložravci a mikrobiálními infekcemi, slouží jako atraktanty pro opylovače, působí jako alelopatické látky, látky zajišťující UV protekci, nebo signální molekuly při fixaci dusíku v kořenových hlízkách luštěnin (Crozier et al. 2006).

Sekundární metabolity rostlin mohou být na základě jejich biosyntetického původu rozděleny do tří skupin: 1) flavonoidy a příbuzné fenolické a polyfenolické sloučeniny, 2) terpenoidy a 3) alkaloidy a sloučeniny obsahující síru (Crozier et al. 2006).

2.1.1 Fenolické látky

Fenoly jsou charakteristické přítomností aspoň jednoho aromatického kruhu s jednou či více hydroxylovými skupinami. Fenolické sekundární metabolity představují velké množství látek od jednoduchých, nízkomolekulárních s jedním aromatickým jádrem až po komplexní taniny a od nich odvozené polyfenoly. Mohou být klasifikovány podle počtu a uspořádání uhlíkových atomů. Častěji se však používá zjednodušené dělení na flavonoidy a non-flavonoidy (Crozier et al. 2006).

2.1.1.1 Flavonoidy a jejich účinky

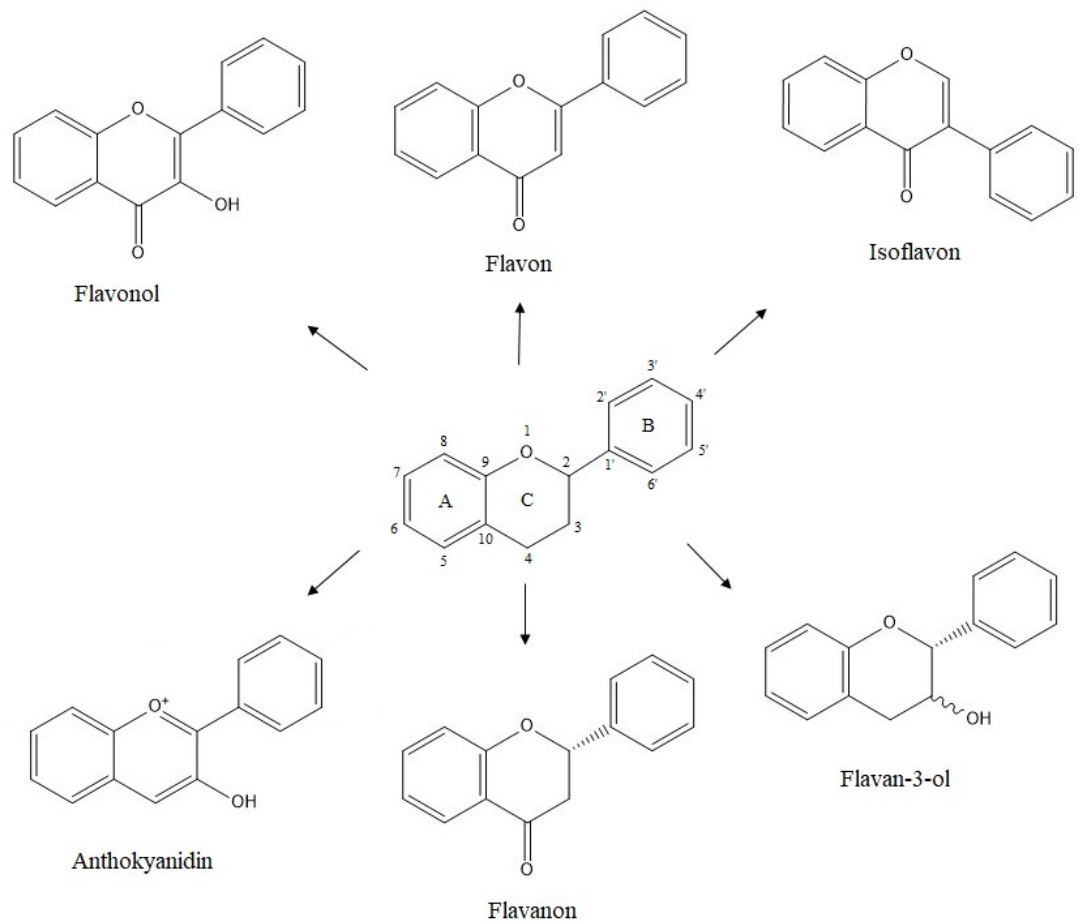
Flavonoidy jsou syntetizovány ve všech částech rostliny. Dodávají barvu, vůni a chuť plodům, květům a semenům, což láká opylovače a živočichy, kteří nestrávené semeno roznáší. Dnes je známo přes 9000 sloučenin řadících se do této skupiny (Mierziak et al. 2014).

V rostlinách se flavonoidy zapojují do UV protekce, pigmentace (červená, modrá, fialová), nebo například stimulace tvorby kořenových hlízek fixujících dusík (Crozier et al. 2006). Flavonoidy pomáhají zprostředkovat symbiotický vztah rostliny s hlízkovými bakteriemi. Nízká koncentrace dusíku v půdě zvyšuje akumulaci flavonoidů, které přitahují

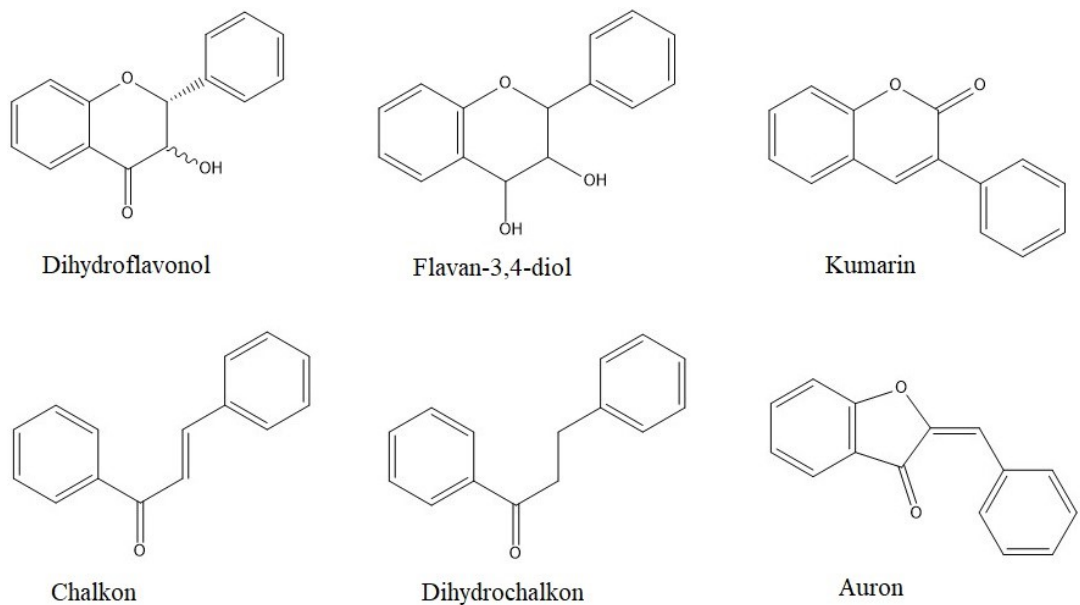
diazotrofní bakterie což vede k transportu dusíku do rostliny. V duchu symbiotického vztahu pak bakterie využívá produktů fotosyntézy rostliny (Mierziak et al. 2014).

Na lidský organismus byl pozorován antioxidační, antiaterosklerotický, protizánětlivý, protinádorový efekt a antimikrobní aktivita (Tapas et al. 2008). Známý je také tzv. Francouzský paradox, který byl poprvé pozorován u obyvatel Francie a následně také v dalších zemích kolem Středozevního moře. Epidemiologická studie odhalila, že strava bohatá na flavonoidy koreluje s prodloužením délky života a s nižší incidencí kardiovaskulárních onemocnění (Prochazkova et al. 2011).

Základní strukturu flavonoidů tvoří dvě aromatická jádra spojená tříuhlíkatým řetězcem, který spolu s kyslíkem může tvořit heterocyklus. Při dělení flavonoidů do jednotlivých skupin se autoři často rozcházejí (Lago et al. 2014; Mierziak et al. 2014; Winkel-Shirley 2001). Podle Crozier et al. (2006) je můžeme dělit na hlavní skupiny (flavony, flavonoly, flavan-3-oly, isoflavony, flavanony a anthokyanidiny) (obr.1) a minoritní skupiny (dihydroflavonoly, flavan-3,4,-dioly, kumariny, chalkony, dihydrochalkony a aurony) (obr.2). Flavonoidy se v přírodě nacházejí převážně ve formě *O*-glykosidů, kde cukernou složku nejčastěji představuje glukóza, galaktóza, arabinóza a rhamnóza (Sangeetha et al. 2016). Mohou se však vyskytovat také jako samotné aglykony. Hydroxylové skupiny flavonoidů mohou být substituované methylovou skupinou nebo isopentenylou jednotkou (prenylované flavonoidy), což zvyšuje jejich lipofilitu (Mierziak et al. 2014).



Obr. 1: Obecná štruktúra hlavných flavonoidů (upraveno podľa Crozier et al. 2006)



Obr. 2: Obecná štruktúra minoritných flavonoidů (upraveno podľa Crozier et al. 2006)

Polyfenoly jsou velice širokou skupinou sekundárních metabolitů. Jejich biosyntéza probíhá dvěma hlavními cestami: šikimátovou a acetátovou cestou (Bravo 1998). Strukturu flavonoidů tvoří tři kruhy (A, C a B) s difenylpropanovým skeletem (C6-C3-C6). Kruh A vzniká cestou kyseliny octové, která přes acetyl-CoA dává vzniknout malonyl-CoA. Kondenzací tří molekul malonyl-CoA vzniká kruh A v molekule flavonoidů. Syntéza kruhů C a B vychází z metabolismu glukózy cestou kyseliny šikimové, která poskytuje kyselinu skořicovou a její redukcí vzniká kumarinová kyselina. Kondenzací vzniklých produktů aktivovaných CoA vzniká chalkon (C15). Následné uzavření kruhu a jeho hydratace dávají vzniknout flavonoidům a stilbenům (Formica a Regelson 1995; Wollgast a Anklam 2000).

Flavonoly

Flavonoly jsou pravděpodobně nejrozšířenější skupinou flavonoidů a jejich distribuce a strukturální různorodost je skutečně veliká. Široce rozšířené flavonoly jako myricetin, kvercetin, isorhamnetin a kampferol se nejčastěji vyskytují ve formě *O*-glykosidu. Konjugace probíhá především v třetí pozici C-kruhu, ale vyskytuje se i v jiných polohách. Velká rozmanitost je také v cukerné části, která je s flavonoly konjugována. Například u kampferolu byla pozorována konjugace až s 200 různými cukernými zbytky (Crozier et al. 2006).

Flavony

Flavony jsou strukturně velice blízké flavonolům, ale nejsou tak široce rozšířeny. Významný obsah flavonů má především celer, petržel a některé byliny. Polymethoxylované flavony, jako jsou nobiletin a tangeretin, můžeme nalézt také v některých citrusech (Crozier et al. 2006).

Isoflavony

Isoflavony jsou charakterizované vazbou vedlejšího aromatického kruhu v poloze C-3 chromanového cyklu místo obvyklé polohy C-2. Vyskytují se téměř výhradně v luštěninách s nejvyšší koncentrací v sóji (*Glycine max*, Fabaceae). Isoflavony genistein a daidzein jsou známé především pro svou silnou fytoestrogenní aktivitu. Struktura těchto látek vykazuje významnou podobnost se steroidním hormonem estradiolem (Crozier et al. 2006).

Flavan-3-oly

Katechiny jsou sekundární metabolity rostlin, které se řadí mezi flavonoidy do skupiny flavan-3-olů. Kromě monomerních katechinů mezi flavan-3-oly patří také oligomerní a polymerní proanthokyanidiny. Na rozdíl od flavonů, flavonolů, isoflavonů a anthokyanidinů, které jsou planární, flavan-3-oly, proanthokyanidiny a flavanony planární nejsou díky saturovanému uhlíku C3 v heterocyklickém C-kruhu (Crozier et al. 2006). Katechiny, stejně jako ostatní flavonoidy, prokázaly schopnost protekce před různými patologickými procesy

jako kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění, rakovina, diabetes mellitus, zánět, virové infekce či obezita (Prochazkova et al. 2011). U katechinů se projevují jak antioxidační, tak i prooxidační aktivity. Antioxidační aktivita, která je zajišťována především mechanismem vychytávání kyslíkových radikálů, může být výrazně snížena glukuronidací katechinů. Dalšími mechanismy jsou chelatace iontů kovů a inhibice inducibilní syntasy oxidu dusnatého (Kim et al. 2010; Lambert et al. 2007). Prooxidační účinek katechinů je navozen zvýšením tvorby hydroxylového radikálu a peroxidu vodíku v přítomnosti Cu(II) a Fe(III) (Sutherland et al. 2006). V případě EGCG je prooxidační efekt navíc spojován s jeho schopností navodit ztrátu membránového potenciálu u mitochondrií což vede k mitochondriální dysfunkci a zvýšení intracelulárních koncentrací reaktivních forem kyslíku (Leon-Gonzalez et al. 2015).

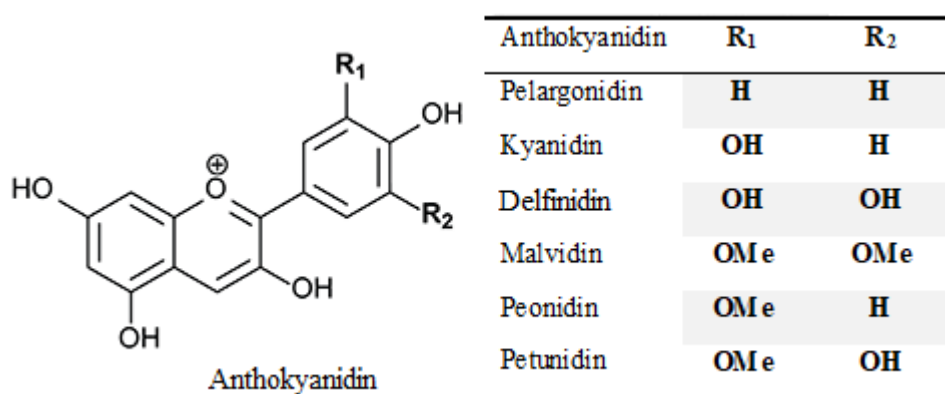
Významným zdrojem katechinů jsou čajovníkové listy (*Camellia sinensis*). Podle způsobu zpracování čaj dělíme na černý (fermentovaný), zelený (bez fermentace) a oolong (částečně fermentovaný). Nejvyšší obsah katechinů je v zeleném čaji, neboť během fermentace je část katechinů přeměněna na theaflaviny a thearubiginy, které jsou zodpovědné za výraznější chuť a tmavou barvu černého čaje (Khan a Mukhtar 2013).

Mezi nejvíce zastoupené katechiny zeleného čaje se řadí (–)-epigallokatechin-3-gallát (EGCG), (–)-epigallokatechin, (–)-epikatechin-3-gallát a (–)-epikatechin. Zároveň jsou v čaji přítomny flavonoly, především kvercetin, kaempferol, myricetin a jejich glykosidy (Khan a Mukhtar 2013). EGCG je nejvíce zastoupeným katechinem v zeleném čaji (50-80% z celkového obsahu katechinů) a je považován za hlavní látku, která je zodpovědná za většinu pozitivních účinků zeleného čaje na lidský organismus (Khan et al. 2006; Misaka et al. 2013).

Katechiny podléhají metylaci, glukuronidaci, sulfonaci a štěpení cyklu. Hlavním metabolitem EGCG je EGCG-4'-*O*-glukuronid, který se v lidském endoplazmatickém retikulu tvoří především pomocí UDP-glukuronosyltransferasy 1A1, 1A8 a 1A9. Během tvorby methylovaných produktů katechinů hraje významnou roli jejich koncentrace. Při nízkých koncentracích EGCG v cytosolu produkuje katechol-*O*-methyltransferasa (COMT) především dimethylované produkty, zatímco při vysokých koncentracích EGCG vznikají převážně monomethylované molekuly EGCG. Sulfonaci katechinů zeleného čaje zajišťuje sulfottransferasa (SULT) 1A1 a ve střevě se na této katalytické reakci podílí i SULT1A3. Štěpení kruhu katechinů je zajišťováno střevní mikroflórou. Aktivní eflux pomocí transportních proteinů je limitujícím faktorem biologické dostupnosti a akumulace mnoha látek v buňkách. Ukázalo se, že multidrug resistance-associated proteins (MRP), ATP dependentní efluxní transportér, brání hromadění EGCG v buňkách (Lambert et al. 2007).

Anthokyany

Anthokyany (Řecky *anthos* = květina a *kyáneos* = modrá) jsou polyfenolické pigmenty patřící mezi flavonoidy, které jsou zodpovědné za červeno-oranžové až modro-fialové zbarvení v rostlinných orgánech jako plody, květy a listy. Anthokyany (glykosylovaná podoba těchto flavonoidů) v přírodě převládají a jejich aglykony (anthokyanidiny) se volně vyskytují jen zřídka. Devadesát procent anthokyanů, které se v přírodě vyskytují, obsahuje ve své struktuře jeden ze šesti základních anthokyanidinů (obr. 3). Zdrojem anthokyanů v naší stravě jsou především bobule, jako jsou borůvky, ostružiny, jahody, brusinky nebo hroznové víno. Anthokyany slouží jako alternativa za syntetická barviva v potravinářství (Wallace a Giusti 2015).



Obr. 3: Přehled základních anthokyanidinů (upraveno podle Lu et al. (2014))

Velké množství důkazů o blahodárných účincích flavonoidů na lidské zdraví vedlo k velké popularitě a rozšíření potravních doplňků s jejich obsahem. Doplňky stravy mají často vysoké koncentrace extraktů přírodních látek nebo jednotlivých účinných látek. Konzumace takovýchto přípravků může vést k ovlivnění farmakokinetiky současně podávaných léčiv (Fugh-Berman 2000), a tak mohou představovat pro pacienta i riziko. Z toho pramení potřeba důkladnějšího poznání těchto potravních doplňků a jejich účinků na organismus.

Účinky flavonoidů a jejich mechanismy

Flavonoidy upoutaly pozornost především svými antioxidačními účinky. Byla u nich však pozorována celá řada dalších pozitivních efektů na lidské zdraví. Mechanismy některých z těchto účinků jsou popsány níže.

Antioxidační účinky

Zvýšené hladiny volných radikálů vedou k nerovnováze v antioxidačních obranných mechanismech a k oxidačnímu stresu. Následná smrt buněk se může projevit jako poškození tkáně. Flavonoidy projevily celou řadu zdraví prospěšných efektů jako antialergický, protizánětlivý, protinádorový a antidiabetický efekt. Velké množství terapeutických účinků

flavonoidů je spojeno s jejich antioxidačními vlastnostmi, které jsou založeny především na vychytávání volných radikálů (Sangeetha et al. 2016).

Účinky na centrální nervový systém

Flavonoidy účinkují na centrální nervový systém několika různými mechanismy. Mohou se vázat na benzodiazepinové místo na GABA(A) receptoru, což vede k uklidnění, anxiolytickému a antikonvulzivnímu efektu. Antidepresivní a antiparkinsonické účinky jsou flavonoidy zprostředkovány inhibicí monoaminoxidasy A nebo B. Bylo také prokázáno, že neuroprotektivní účinky zprostředkovávají flavonoidy mírněním oxidačního stresu a regulací kinasové kaskády a apoptózy neuronálních buněk. Flavonoidy z *Peltiphyllum peltatum* inhibovaly acetylcholinesterasovou aktivitu v léčbě Alzheimerovy choroby a baicalein (izolovaný ze *Scutellaria baicalensis*) brání poškození neuronální tkáně a zlepšuje kognitivně behaviorální projevy (Sangeetha et al. 2016).

Kardiovaskulární systém

Flavonoidy mohou zvyšovat uvolňování oxidu dusnatého v endotelu, což vede k relaxaci cév. Působí tedy jako antihypertensiva (Sangeetha et al. 2016).

Dyslipidémie

V experimentálních modelech byly flavonoidy popsány jako protektiva při hepatosteatóze a dyslipidémii. Snižují syntézu a mohou zvyšovat oxidaci mastných kyselin.

Diabetes

U mnoha flavonoidů byly popsány antidiabetické účinky pro diabetes mellitus 2. typu. Byla u nich prokázána inhibice α -glukosidasy (enzym štěpící glykosidickou vazbu sacharidů ve střevě), glukózových transportérů, glykace proteinů a vzniku AGE částic (advanced glycation end products), které jsou zodpovědné za pozdní komplikace diabetu. Pozitivní účinky flavonoidů byly pozorovány i v případě diabetes mellitus 1. typu (inzulin-dependentní diabetes mellitus) (Nicolle et al. 2011). Flavonoid kvercetin zlepšuje regeneraci Langerhansových ostrůvků pankreatu a tím zvyšuje uvolňování inzulínu.

Protizánětlivé účinky

Na tomto účinku flavonoidů se podílí antioxidační účinky, inhibice enzymů pro tvorbu eikosanoidů a produkci zánětlivých mediátorů. Flavonoidy také mohou regulovat buňky účastnící se zánětlivé reakce jako jsou lymfocyty, monocyty, NK buňky, makrofágy, neutrofilové a žírné buňky (Garcia-Lafuente et al. 2009).

Protinádorové účinky

Různé epidemiologické studie ukázaly, že flavonoidy mají pozitivní účinky proti mnoha druhům nádorů jako například tlustého střeva, prsu, plic, prostaty a slinivky. Na tomto efektu

se podílí větší množství mechanismů. Patří mezi ně inaktivace kancerogenů, zastavení buněčného cyklu, antiproliferativní účinky, indukce apoptózy a inhibice angiogeneze (Ravishankar et al. 2013; Romano et al. 2013).

Účinky na dýchací trakt

Antioxidační, protizánětlivé, protialergické a antispastické účinky přispívají k blahodárnému efektu flavonoidů při onemocnění dýchacích cest. Mnoho flavonoidů, jako například apigenin, silibinin a wogonin, je také popsáno jako modulátory sekrece hlenu v dýchacích cestách, neboť mohou snižovat produkci mucinu (Romano et al. 2013).

Účinky na trávicí trakt

Flavonoidy snižují střevní motilitu a pomáhají při průjemech, tlumí viscerální bolest a zánět v oblasti střev. Také se projevují jako hepatoprotektivum a terapeutický účinek je jim připisován i při žaludečních vředech. Flavonoidy izolované z *Hypericum erectum* dokonce mají schopnost inhibovat růst *Helicobacter pylori*, který se řadí mezi hlavní faktory vzniku žaludečních vředů (Romano et al. 2013).

Estrogenní účinky

V léčbě postmenopauzální osteoporózy se mimo jiné využívají také isoflavony, které jsou známé svými estrogenními účinky. Studie ukazují, že isoflavony zlepšují příznaky menopauzy, a to především díky jejich strukturní a funkční podobnosti se 17 β -estradiolem (Atmaca et al. 2008).

Dermatologické účinky

Flavonoidy jsou v dermatologii používány primárně pro jejich antioxidační, protizánětlivé a zklidňující účinky na pokožku. Příkladem může být hesperidin, který pomáhá při zánětlivých onemocnění kůže navozených UV radiací (Moon a Kim 2012).

Antimikrobní a antiparazitické aktivity

Většina flavonoidů je považována za základní antimikrobní složky, především to platí pro isoflavony a prenylované flavonoidy. Mechanismus není zatím plně osvětlen, ale bylo prokázáno, že flavonoidy extrahované z rostlin jako *Larrea tridentate*, *Erythrina caffra* a *Melampyrum arvense* mají antivirové, antibakteriální a antiprotozoální účinky (Romano et al. 2013).

2.1.2 Terpeny a jejich účinky

Terpeny, nebo také isoprenoidy, jsou širokou skupinou uhlovodíků, které jsou produkovány mnoha rostlinami a některými živočichy. Obecně je jejich nejvyšší koncentrace v rostlinných reprodukčních strukturách a listech v průběhu kvetení a bezprostředně po něm. Terpeny jsou také hlavní složkou rostlinných pryskyřic (Paduch et al. 2007). V rostlinách

ovlivňují chuť a vůni, zastávají funkce hormonů a membránových lipidů, působí jako atraktanty pro opylovače, případně jako repelenty a zasahují také do dýchání a fotosyntézy (Humphrey a Beale 2006). Ve vysoké koncentraci mohou být terpeny toxické a stávají se tak zbraní proti býložravcům a patogenům. Živočišný cholesterol a steroly, stejně jako triterpeny a fytosteroly jsou přímo začleněny do stabilizace buněčné membrány a regulují její permeabilitu. Terpeny mohou existovat jako uhlovodíky nebo jejich struktura obsahuje navíc kyslík ve formě hydroxylové nebo karbonylové (ketonové či aldehydové) skupiny. Látky vzniklé chemickou modifikací terpenů jsou označovány jako terpenoidy (Paduch et al. 2007). Přestože chemická struktura terpenů je velice rozmanitá, stejně jako jejich funkce, sestávají jejich molekuly z jedné základní jednotky, kterou je rozvětvený řetězec pěti uhlíkových atomů (isopren). Podle počtu izoprenových jednotek terpeny dělíme na hemiterpeny (C5), monoterpeny (C10), seskviterpeny (C15), diterpeny (C20), triterpeny (C30), tetraterpeny (C40), polyterpeny (>C40). Prekurzory terpenů isopentenyldifosfát (IPP) a dimethylallyldifosfát (DMAPP) mohou při biosyntéze vznikat dvěma cestami. První z nich je mevalonátová cesta, která probíhá v cytosolu buněk a dochází při ní k syntéze IPP z acetyl-CoA přes mevalonovou kyselinu a vzniklý IPP izomerizuje na DMAPP. Touto cestou vznikají především seskviterpeny a triterpeny. Druhá cesta označovaná jako Rohmerova, pyruvátová či methylethylerythritolfosfátová, probíhá v plastidech, kde dochází především k syntéze monoterpenů, diterpenů a tetraterpenů přes 1-deoxy-D-xyluloso-5-fosfát. V tomto případě nedochází k izomerizaci IPP na DMAPP, ale obě jednotky vznikají odděleně. IPP a DMAPP jsou pomocí enzymu zvaného prenyltransferasa spojovány za vzniku terpenů (Humphrey a Beale 2006; Cheng et al. 2007; Paduch et al. 2007; Tholl 2015). V přírodě se terpeny vyskytují převážně jako alkoholy a jejich glykosidy, ethery, aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny a estery (Breitmaier 2006).

Hemiterpeny

Isopren samotný se ve volné formě v přírodě nevyskytuje, avšak několik pětiuhlíkatých sloučenin s isopentanovou strukturou ano. Jedná se například o isovaleraldehyd, isoamylalkohol, tiglovou kyselinu či angelikovou kyselinu (Briemann 1999).

Monoterpeny

Monoterpeny jsou součástí mnoha rostlinných silic, kterým dodávají chuť a vůni. Své uplatnění nacházejí především v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Běžnými alifatickými monoterpeny jsou myrcen, geraniol a linalool. Mezi další dobře známé zástupce patří mentol, kafr, pinen a limonen (Briemann 1999).

Seskviterpeny

Zástupci seskviterpenů mají strukturu vycházející ze tří izoprenových jednotek a mohou se vyskytovat ve formě acyklické, mono-, bi-, tri-, i tetracyklické. Podobně jako monoterpeny i seskviterpeny jsou považovány především za vonné komponenty rostlinných silic. Důležitým členem této skupiny je farnesol, který ve formě pyrofosfátu je klíčovým článkem při biosyntéze terpenoidů (Briemann 1999). Mnoho seskviterpenů má na lidský organismus zajímavé biologické účinky a díky tomu jsou součástí potravních doplňků. Seskviterpeny jsou často složkou mnoha jídel a tradiční medicíny a znalost jejich osudu v organismu je tedy velice důležitá. Všechny seskviterpeny procházejí v organismu rozsáhlou biotransformací. Podléhají především hydroxylaci, epoxidaci a glukuronidaci (Bartikova et al. 2014).

Seskviterpeny jsou velice lipofilní látky, které mají předpoklady pro modulaci biotransformačních enzymů. U několika seskviterpenů izolovaných z kořenů rostliny *Curcuma aromatica* byla pozorována schopnost inhibovat cytochrom P450. Takovéto ovlivnění významného biotransformačního enzymu může vést k závažným lékovým interakcím (Bartikova et al. 2014). Seskviterpeny ochraňují buňky před oxidačním stresem několika mechanismy: přímé vychytávání RONS, chelatace kovových ionů, upregulace antioxidačního ochranného systému a tlumení zánětu (Bartikova et al. 2014).

Kromě prospěšných antioxidačních vlastností mají seskviterpeny také schopnosti oxidační stres navozovat a chovají se jako prooxidanty nebo mají dvojí roli, antioxidační i prooxidační za jistých fyziologických či patologických podmínek. Navození oxidačního stresu seskviterpeny provádějí generováním reaktivních kyslíkových radikálů nebo inhibicí antioxidačního obranného systému. Naštěstí se tyto účinky projevují především v nádorových buňkách nebo parazitech a v normální tkáni zůstává antioxidační obrana nenarušena, nebo je dokonce posílena. Léčivé rostliny poskytují důležitý zdroj nových potenciálních protinádorových léčiv. U mnoha seskviterpenů izolovaných z rostlin se projevují protinádorové schopnosti jako inhibice proliferace, indukce apoptózy, potlačení angiogeneze, zpomalování metastázi nebo zlepšení účinku chemoterapie (Bartikova et al. 2014).

Diterpeny

Struktura diterpenů je založena na čtyřech izoprenových jednotkách. Mezi jejich zástupce patří cembren a retinal, který je základním chromoforem zahrnutým do přeměny světla na vizuální signál (Paduch et al. 2007).

Triterpeny

Triterpeny jsou tvořeny šesti izoprenovými jednotkami. Významným zástupcem je například lineární triterpen skvalen, který je široce rozšířen v rostlinné i živočišné říši.

V největších koncentracích se vyskytuje v játrech některých ryb, především u žraloka. Své uplatnění našel především v kosmetice (Paduch et al. 2007; Popa et al. 2015).

Tetraterpeny a polyterpeny

Osm izoprenových jednotek tvoří tetraterpeny. Biologicky důležité jsou lykopen (v rajčatech) a karotenoidy, které se hojně vyskytují jako rostlinné pigmenty. Karotenoidy mohou být rozděleny na základě jejich funkčních skupin do dvou skupin. Zástupci skupiny karotenů jsou složeny pouze z atomů uhlíku a vodíku. Druhou skupinou jsou xantofyly, které obsahují aspoň jednu kyslíkovou funkční skupinu (Grassmann 2005; Paduch et al. 2007).

Polyterpeny mají dlouhý řetězec tvořený mnoha izoprenovými jednotkami. Mezi nejvýznamnější zástupce patří přírodní kaučuk (Paduch et al. 2007).

Účinky terpenů

Jak již bylo zmíněno, terpeny a terpenoidy mohou pomáhat v prevenci a léčbě několika nemocí včetně rakoviny. Intenzivně studovaným zástupcem s těmito účinky je monoterpen D-limonen a seskviterpen β -karyofylen oxid. Za hlavní mechanismus, jakým monoterpeny působí v protinádorové léčbě, je považováno ovlivnění post-translační isoprenylace proteinů regulujících buněčný růst, například inhibice post-translační isoprenylace onkoproteinu p21^{ras}, který reguluje přenos signálů a buněčný růst (Paduch et al. 2007). Bylo také prokázáno, že seskviterpeny α -humulen a β -karyofylen inhibují nukleární faktor kappa B (NF- κ B), hlavní regulátor patogeneze zánětlivých onemocnění a rakoviny. Dalšími pozorovanými mechanismy jsou inhibice angiogeneze, metastazování a invaze nádoru do okolí (Medeiros et al. 2007; Salminen et al. 2008).

U mnoha terpenů byla pozorována účinnost proti gramnegativním a grampozitivním bakteriím. Kromě těchto antimikrobních účinků prokázaly i antifungální aktivitu. Mechanismus tohoto účinku je spojen především s jejich lipofilním charakterem. Ovlivňují membránové struktury, zvyšují membránovou fluiditu a permeabilitu, což vede až k narušení dýchacího řetězce. Antivirová aktivita terpenů není ještě plně objasněna, ale například antivirová aktivita isoborneolu je spojována s jeho interakcí s hydroxylovými skupinami lipidů v membráně obalující virovou částici (Paduch et al. 2007).

Antidiabetický účinek terpenů je nejlépe popsán na diterpenu steviolu a jeho glykosidu steviosidu izolovaných z *Stevia rebaudiana*. Jejich antihyperglykemická aktivita je spojena se zvýšenou glykolýzou a potlačením glukoneogeneze. Steviosid má navíc ke svému antihyperglykemickému účinku i schopnost snižovat krevní tlak u potkanů (Chan et al. 1998) i lidí (Hsieh et al. 2003).

Dalším z účinků, pro které jsou terpeny studovány je jejich schopnost usnadňovat transdermální penetraci. Jsou tedy vhodnými kandidáty pro dermální aplikaci léčivých látek a to nejen díky usnadnění vstřebávání, ale i díky tomu, že samy mohou způsobit pouze mírné podráždění kůže a mají nízkou systémovou toxicitu (Bartikova et al. 2014; Paduch et al. 2007).

2.2 METABOLISMUS XENOBIOTIK

Všechny organismy jsou neustále vystavovány cizorodým látkám, neboli xenobiotikům, které zahrnují jak látky vyrobené, tak látky přírodní. Mezi xenobiotika patří léky, průmyslové chemikálie, pesticidy, polutanty, alkaloidy, sekundární rostlinné metabolity a toxiny produkované plísněmi, rostlinami či živočichy. Vlastnosti, které xenobiotikům umožňují absorpci skrz kůži, plíce či zažívací ústrojí (především jejich lipofilita) jsou překážkou v jejich eliminaci, neboť lipofilní látky mohou být snadno reabsorbovány. Eliminace xenobiotik často závisí na jejich přeměně na ve vodě rozpustné látky. Tuto konverzi, katalyzovanou enzymy v játrech a dalších tkáních, známe jako proces biotransformace. Obecně jsou tedy vlastnosti xenobiotik přeměňovány z lipofilních (upřednostňované při absorpci) na hydrofilní (usnadnění exkrece močí a stolicí). Bez biotransformace by lipofilní xenobiotika byla z těla exkretována tak pomalu, že by mohla zaplavit organismus a následně jej usmrtit (Parkinson 2001).

Eliminace xenobiotik není jediným výsledkem biotransformace. Xenobiotika projevují mnoho efektů na biologické systémy, ať už prospěšných či škodlivých. V mnoha případech chemická modifikace xenobiotik v průběhu biotransformace změnila jejich biologický efekt. Velkou důležitost tento princip má ve farmakologii, kde některá léčiva musí projít biotransformací, aby se projevil jejich farmakodynamický efekt. Ovšem ve většině případů biotransformace ukončuje farmakologický účinek léčiv a snižuje toxicitu xenobiotik.

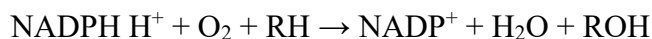
Enzymy metabolizující xenobiotika (XME) hrají klíčovou roli v metabolismu, eliminaci a detoxikaci xenobiotik a léků, kterým je naše tělo vystaveno. Chrání tak tělo před potenciálně škodlivým působením xenobiotik z vnějšího prostředí stejně jako některých eobiotik (Xu et al. 2005). Reakce katalyzované biotransformačními enzymy jsou rozděleny do dvou skupin, první a druhá fáze biotransformace. Reakce 1. fáze biotransformace zahrnují hydrolýzu, redukci a oxidaci. Tyto reakce odhalují nebo zavádějí funkční skupiny do molekuly xenobiotika (-OH, -NH₂, -SH nebo -COOH) a většinou vedou pouze k mírnému zvýšení jejich rozpustnosti ve vodě. 2. fáze biotransformace zahrnuje glukuronidaci, sulfataci, acetylaci, metylaci a konjugační reakce s glutathionem a aminokyselinami (nejčastějšími jsou glycin, taurin a glutamová kyselina). Kofaktory pro tyto reakce reagují s funkčními skupinami původní molekuly xenobiotika nebo s těmi, které byly vytvořeny během 1. fáze biotransformace. 1. fáze

biotransformace tedy nemusí vždy nutně předcházet fázi druhé. Většina reakcí 2. fáze vede k významnému zvýšení rozpustnosti xenobiotika ve vodě a tím je exkrece cizorodé látky z těla usnadněna (Parkinson 2001).

2.2.1 Oxidace

Při oxidaci xenobiotik se nejvíce uplatňují monooxygenasy zahrnující cytochromy P450 (CYP) a flavinové monooxygenasy (FMO). CYP jsou lokalizované především v endoplazmatickém retikulu mnoha tkání, kde se podílí na hydroxylaci alifatického či aromatického uhlíku, epoxidaci dvojně vazby, dealkylaci, oxidativní deaminaci, N-oxidaci, S-oxidaci, dehalogenaci nebo oxidaci alkoholu. Všechny tyto reakce zahrnují počáteční krok inkorporace jednoho atomu kyslíku do struktury substrátu (Gibson a Skett 2001). Jaterní monooxygenázový systém CYP (jinak také mixed function oxidase system – MFO) netvoří pouze cytochrom P450, ale jeho součástí jsou také NADPH cytochrom P450 reduktasa a lipidová složka fosfatidylcholin. Pro CYP je charakteristická přítomnost hemoproteinu b s porfyrinovým skeletem (protoporfyrin IX) s centrálním atomem železa v oxidované podobě. Pátým ligandem tohoto železa je thiolátová síra cysteinu a protilehlým (šestým) ligandem se v průběhu reakce stává molekula kyslíku.

Monooxygenace je základní reakce katalyzovaná CYP. CYP oxidace jsou charakterizovány následující reakcí:



CYP enzymy v játrech katalyzují počáteční krok v biotransformaci xenobiotik včetně většiny léčiv. Katalyzují navázání atomu kyslíku na molekulu substrátu, čímž většinou vzniknou hydroxylované nebo dealkylované metabolity. V lidském organismu je známo více jak padesát CYP isoform a ty jsou dále klasifikovány do 17 rodin a 39 podrodin. Tato klasifikace je založena na podobnosti v sekvenci aminokyselin. Proteiny, které se v aminokyselinové sekvenci shodují ve 40 % a více jsou řazeny do stejné rodiny (značeno číslicí). Při shodě větší jak 55 % jsou řazeny do stejné podrodiny (značeno písmenem). Jednotlivé členy podrodiny charakterizuje třetí znak, kterým je číslice (Anzenbacher a Anzenbacherová 2001).

FMO, vyskytující se především v játrech, ledvinách a plicích, jsou monooxygenasy obsahující flavinadenindinukleotid (FAD). FMO jsou mikrosomální enzymy katalyzující oxidaci nukleofilního heteroatomu dusíku, síry nebo fosforu rozličných xenobiotik. Savčí FMO rodina obsahuje pět isoform (FMO1-5) a každá má odlišnou substrátovou specifitu. Každá FMO isoforma má oblast bohatou na glycin, kde se nekovalentně váže FAD. V blízkosti se nachází aktivní místo, které sousedí s druhou glycin-bohatou oblastí, která váže NADPH.

Na rozdíl od CYP využívají FMO jako kofaktor nejen NADPH, ale i NADH (přesto však NADPH zůstává preferován). Mnoho reakcí katalyzovaných FMO může být také katalyzováno pomocí CYP (Gibson a Skett 2001; Parkinson 2001).

2.2.2 Redukce

Xenobiotika obsahující aldehydovou, ketonovou, disulfidovou, sulfoxidovou, chinonovou, N-oxidovou, alkenovou, azo nebo nitro skupinu jsou často redukovány.

Enzymy redukující karbonylovou skupinu

Redukce aldehydů, ketonů a chinonů je katalyzována enzymy redukujícími karbonylovou skupinu. Karbonylreduktasy jsou NAD(P)H dependentní enzymy přítomné v krvi a v buňkách mnoha tkání (Matsunaga et al. 2006; Parkinson 2001). Tato skupina reduktas s širokou substrátovou specifitou byla rozdělena do tří nadrodin, dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (short-chain dehydrogenase, SDR), dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem a aldo-keto reduktasy (AKR). Členové SDR nadrodiny mají velice nízkou podobnost v sekvenci, avšak jejich trojdimenzionální struktury jsou si velice podobné. Všichni členové mají také zachovánu katalytickou tetradu Asn-Ser-Tyr-Lys (Matsunaga et al. 2006).

Rodina karbonylreduktas patří do nadrodiny SDR a dále se dělí na čtyři typy, CBR1-CBR4. Lidská CBR1 je monomerní NADPH-dependentní enzym, který katalyzuje dvouelektronovou redukci exogenních i endogenních látek. Prostaglandin E2 je příkladem endogenní látky, kterou CBR1 metabolizuje na méně aktivní metabolit. Mezi nejdůležitější substráty z řad léčiv bezesporu patří antracyklinová cytostatika doxorubicin a daunorubicin, jejichž metabolity doxorubicinol a daunorubicinol (vzniká alkoholová skupina na C-13) ztrácí protinádorovou aktivitu a jsou kardiotoxické (Gonzalez-Covarrubias et al. 2007).

AKR nadrodina je rychle se rozrůstající skupinou NADPH-dependentních oxidoreduktas, které metabolizují uhlovodíky, steroidy, prostaglandiny a další aldehydy a ketony xenobiotik i endogenních látek. Řadí se do ní 15 lidských proteinů, které jsou členěny do rodin AKR1, AKR6 a AKR7. Největší skupinou je AKR1, která se dále dělí na aldehyd/aldosa-reduktasy (AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10 a AKR1B15), hydroxysteroiddehydrogenasy (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 a AKR1C4), 5 β -steroidreduktasu (AKR1D1) a testis-specifický protein AKR1E2 (Malatkova a Wsol 2014; Matsunaga et al. 2006).

NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy (NQO) jsou flavoproteiny, které katalyzují dvouelektronovou redukci chinonů na hydrochinony. Vyskytují se v cytosolu a u savců jsou známy dvě isoformy (NQO1 a NQO2). Dvouelektronová redukce katalyzovaná NQO brání jednoelektronové redukci chinonů prostřednictvím jiných chinonových reduktas, která vede

k tvorbě volných kyslíkových radikálů. Obě isoformy jsou indukovány jako součást odpovědi na oxidační stres (Vasiliou et al. 2006).

2.2.3 Hydrolýza a hydratace

Savci mají mnoho hydrolytických enzymů, které hydrolyzují xenobiotika obsahující funkční skupiny jako estery, amidy, thioestery, epoxidy, hydrazidy a karbamáty (Gibson a Skett 2001; Parkinson 2001). Molekula vody může být vázána na substrát za současného rozštěpení jeho molekuly (hydrolýza), nebo produktem zůstává jedna molekula (hydratace) (Testa a Mayer 2003).

2.2.4 Glukuronidace

Glukuronidace je nejrozšířenější z konjugačních reakcí u lidí a většiny savců. Glukuronidace vyžaduje kofaktor uridindifosfát-glukuronovou kyselinu (UDP-glukuronovou kyselinu) a enzym UDP-glukuronosyltransferasu (UGT), která konjugaci katalyzuje. Místem glukuronidace je obvykle nukleofilní heteroatom (O, N nebo S) a výslednými produkty jsou UDP a glukuronid. UGT je zakotvena v membráně endoplazmatického retikula jater a mnoha dalších tkání (Parkinson 2001).

Lidská UGT nadrodina je členěna do čtyř rodin (UGT1, UGT2, UGT3 a UGT8), přičemž členové jednotlivých rodin vykazují minimálně 40% homologii v jejich DNA sekvenci (Jancova et al. 2010).

Velikost produktu glukuronidace určuje cestu jeho eliminace. V případě metabolitů větších než 400 daltonů jsou vylučovány žlučí, a pokud je jejich velikost menší, jsou přednostně vylučovány močí. Vysokomolekulární látky, které jsou vylučovány žlučí a následně se dostávají do střeva, se mohou stát substrátem pro β -glukuronidasu, která hydrolyzuje glukuronid za vzniku parentní látky, která může být reabsorbována. Tento koloběh je označován jako enterohepatální oběh a vede k prodloužení biologické dostupnosti léčiv (Gibson a Skett 2001).

2.2.5 Sulfonace

Sulfonace je hlavní konjugační drahou pro fenoly, ale často probíhá i u alkoholů, aminů a v menší míře u thiolů (Gibson a Skett 2001). Sulfotransferasy (SULT) jsou nadrodinou enzymů, které katalyzují přenos sulfonové skupiny $-SO_3$ z donoru (většinou 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát, PAPS) na xenobiotika a endogenní substráty. Syntézu PAPS katalyzují dva enzymy, ATP sulfurylasa a adenosin-5'-fosfosulfátkinasa (ATP kinasa), které jsou vysoce konzervativní napříč všemi organismy a jejich delece by byla letální (Chapman et al. 2004).

Sulfotransferasy jsou lokalizované především v cytosolu jater a dále v ledvinách, střevě, plicích, krevních destičkách a mozku. Vzniklé sulfáty jsou velmi polární, a tedy snadno eliminovatelné (především močí). Metabolity, které jsou vylučovány žlučí, mohou být ve střevě hydrolyzovány sulfatasami a podobně jako u glukuronidů se mohou dostat do enterohepatálního oběhu (Chapman et al. 2004; Parkinson 2001).

2.2.6 Konjugace s glutathionem

Glutathion (GSH) je znám jako protektivní látka, která tělo chrání před potenciálně toxickými elektrofilními látkami. Mnoho léčiv je metabolizováno enzymy první fáze na silné elektrofilní a ty mohou reagovat s GSH na netoxické konjugáty. Seznam látek konjugovaných s GSH zahrnuje epoxidy, alkeny, halo- a nitro- uhlovodíky, isokyanáty, α,β -nenasycené ketony a další (Gibson a Skett 2001). GSH je tripeptid složený z glycinu, cysteinu a glutamové kyseliny a na substrát se váže přes silně nukleofilní thiolovou skupinu cysteinu. Vzniklé GSH konjugáty mohou být vyloučeny žlučí, nebo jsou dále přeměňovány na deriváty kyseliny merkapturové a následně jsou vyloučeny močí (Jancova et al. 2010).

Konjugaci xenobiotika (případně endogenní látky) s glutathionem katalyzuje glutathion-S-transferasa (GST). Tento enzym je jedním z hlavních detoxikačních enzymů 2. fáze biotransformace a zároveň hraje důležitou roli v ochraně buněk před oxidačním stresem. GST jsou v buňkách jater, ledvin, střeva a dalších tkání (Jancova et al. 2010).

Rozlišujeme dvě základní nadrodiny GST. Do první řadíme rozpustné dimerní enzymy a druhou tvoří pravděpodobně trimerní struktury, které jsou membránově vázané (MAPEG, membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) (Gibson a Skett 2001; Jancova et al. 2010). Nadrodina rozpustných GST je rozdělena do osmi rodin značených jako alfa, kapa, mí, omega, pí, sigma, theta a zeta. V lidském organismu najdeme pouze alfa, mí, pí, kapa a theta. Vyskytují se především v cytoplazmě, ale přítomny jsou také v jádru, mitochondriích a peroxisomech (Jancova et al. 2010).

2.2.7 Metylace

Metylace je méně běžnou cestou metabolizace xenobiotik. Na rozdíl od ostatních reakcí 2. fáze biotransformace obecně snižuje rozpustnost xenobiotik ve vodě a maskuje funkční skupiny. Výjimkou v tomto pravidle je N-metylace xenobiotik obsahujících pyridin (například nikotin), kdy dojde k vytvoření kvartení amoniové soli a tím i ke zvýšení rozpustnosti ve vodě (Parkinson 2001).

Metylační reakce jsou katalyzovány methyltransferasami, které jako kofaktor využívají S-adenosylmethionin (SAM). L-methioninadenosyltransferasa katalyzuje syntézu tohoto kofaktoru z L-methioninu a ATP (Gibson a Skett 2001).

Katechol-*O*-methyltransferasa (COMT) je zodpovědná za přenos methylové skupiny ze SAM na katecholaminy. Tento enzym hraje klíčovou roli v modulaci funkcí, jakými jsou kognitivní funkce, kardiovaskulární funkce a vnímání bolesti. Substráty pro COMT nezahrnují pouze neurotransmitery jako noradrenalin, adrenalin a dopamin, ale také léčiva užívaná při léčbě hypertenze, astmatu a Parkinsonovy choroby (Jancova et al. 2010). COMT je přítomná v savčích buňkách ve dvou formách: rozpustná forma v cytoplasmě (S-COMT) a membránově vázaná (MB-COMT) v endoplazmatickém retikulu. S-COMT se vyskytuje převážně v játrech, střevě a ledvinách, zatímco MB-COMT je nejvíce exprimována v oblasti centrálního nervového systému (Jancova et al. 2010; Lachman et al. 1996).

2.2.8 N-acetylace

N-acetylace je hlavní cestou biotransformace xenobiotik obsahujících aromatický amin nebo hydrazinovou skupinu. Xenobiotika obsahující alifatické aminy jsou substráty pro N-acetylaci jen vzácně. Podobně jako v případě methylace, N-acetylace maskuje aminy a snižuje tak jejich rozpustnost ve vodě. N-acetylace xenobiotik je katalyzována N-acetyltransferasou v přítomnosti acetyl-koenzymu A jako kofaktoru. N-acetyltransferasa se vyskytuje v cytoplasmě mnoha tkání, především však v játrech, gastrointestinálním traktu, ledvinách a plicích (Parkinson 2001).

2.2.9 Konjugace s aminokyselinami

Existují dvě základní cesty, které vedou ke konjugaci xenobiotik s aminokyselinami. První a častější z nich zahrnuje konjugaci xenobiotik obsahujících karboxylovou skupinu s aminoskupinou aminokyseliny jako jsou glutamin, glycin a taurin. V tomto případě je nejdříve potřebná konjugace xenobiotika s koenzymem A (katalyzováno acyl-CoA syntetase). Vzniklý produkt pak reaguje s endogenními aminy aminokyseliny za vzniku konjugátů (katalyzováno N-acyltransferasou). Druhou cestou je konjugace xenobiotik s aromatickou hydroxyaminovou skupinou s karboxylovou skupinou aminokyseliny jako serin nebo prolin. Tato cesta zahrnuje aktivaci aminokyseliny pomocí aminoacyl-tRNA-synthetasy, která reaguje s aromatickým hydroxylaminem za vzniku N-esteru (Parkinson 2001).

Konjugace s aminokyselinami je speciální formou N-acylace, kde je aktivováno léčivo místo endogenního kofaktoru (Gibson a Skett 2001).

2.2.10 Transportní proteiny

Xenobiotika jsou během první a druhé fáze biotransformace přeměňována v méně toxické a ve vodě více rozpustné metabolity. Transportéry pak přenášejí vzniklé látky přes plazmatickou membránu, stejně jako přes intracelulární membrány endoplazmatického retikula, peroxisomů a mitochondrií a jsou tedy nezbytnou součástí detoxikačního procesu. K nejvíce studovaným patří P-glykoprotein, MRP transportéry (multidrug resistance associated protein) nebo BCRP (breast cancer resistance protein). Vyskytují se v mnoha tkáních, například v játrech, střevě, ledvinách a mozku, kde vytváří bariéru a hrají klíčovou roli v absorpci, distribuci a exkreci léčiv. P-glykoprotein, MRP transportéry i BCRP využívají k transportu substrátu energii získanou z hydrolýzy ATP a řadí se tak mezi ABC transportéry (ATP binding cassette). ABC transportéry jsou schopny přenášet přes lipidové membrány velké množství substrátů, jako jsou aminokyseliny, kovové iony, cukry, lipidy či xenobiotika (Dean et al. 2001; Xu et al. 2005).

2.2.11 Modulace biotransformačních enzymů

Délka a intenzita farmakologického účinku podávaných léčiv je především dána rychlostí jejich metabolizace, a proto případné indukce či inhibice biotransformačních enzymů mohou vést k závažným komplikacím terapie (Gibson a Skett 2001).

Indukce aktivity biotransformačních enzymů vede k urychlení eliminace látek, které jsou těmito enzymy metabolizovány a podobně jako eflux látek z buňky pomocí transportérových proteinů, je důležitým ochranným mechanismem před toxickými látkami a jejich kumulací v organismu (Handschin a Meyer 2003). K indukci vede zvýšení genové exprese a/nebo snížení degradace hotových enzymů, případně stabilizace jejich mRNA (tzv. transkripční a netranskripční mechanismy indukce). Nejdůležitějším mechanismem regulace genové exprese je aktivace pomocí nukleárních receptorů. Po navázání ligandu na tyto receptory dochází ke spuštění kaskády, která vede ke zvýšení exprese daných genů. Receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR), orphan (sirotčí) receptory a glukokortikoidní receptor jsou hlavními receptory transkripční regulace biotransformačních enzymů a transportérů a hrají důležitou roli v mnoha biologických procesech (Shi 2007; Xu et al. 2005).

AhR je intenzivně studovaným nukleárním receptorem, který je řazen do bHLH-PAS (basic helix–loop–helix/Per-Arnt-Sim) nadrodiny. Inaktivovaný AhR se vyskytuje v cytoplasmě v komplexu s chaperonovými proteiny (HSP90, XAP2, p23). Jakmile se ligand naváže na receptor, celý komplex se přesune do jádra, kde se na něj naváže ARNT (AhR nuclear translocator) protein. Chaperony jsou z komplexu uvolněny a heterodimer AhR/ARNT se váže na XRE (xenobiotics responsive element) sekvenci a zvyšuje transkripci cílových genů. AhR

reguluje geny, které jsou zapojeny do velkého množství biochemických procesů zahrnujících energetický metabolismus, syntézu lipidů a cholesterolu, metabolismus xenobiotik a různé transportéry. Mezi AhR agonisty se řadí polycyklické aromatické uhlovodíky, halogenované polycyklické uhlovodíky nebo některé flavonoidy (např. kvercetin, apigenin a kamferol) (Murray et al. 2014). Katechiny zeleného čaje jsou příkladem AhR antagonistů. EGCG se váže na chaperonové proteiny HSP90, stabilizuje komplex s AhR a brání tak vazbě na DNA (Palermo et al. 2005).

Orphan nukleární receptory byly objeveny na základě prohledávání cDNA knihoven a hledání podobností s úseky DNA již známých nukleárních receptorů. Orphan receptory byly tedy objeveny bez znalosti jejich fyziologických ligandů, avšak označení „orphan“ přetrvávalo i po identifikaci těchto specifických ligandů (Giguere 1999). Mezi orphan receptory řadíme například konstitutivní androstanový receptor (CAR), pregnanový nukleární receptor X (PXR), retinoidní X receptor (RXR), receptory aktivované proliferátory peroxisomů, jaterní X receptory (LXR), nebo farnesoidní X receptor (FXR). V inaktivované formě se orphan nukleární receptor nachází v cytoplasmě v komplexu s chaperonovými proteiny a po navázání ligandu se přemísť do jádra, kde vytvoří heterodimer s RXR, naváže se na promotorové oblasti cílových genů a spouští jejich transkripci. Některé nukleární receptory (nejen ze zástupců orphan receptorů) se na DNA mohou vázat jako monomery nebo homodimery (Giguere 1999).

PXR patří spolu s CAR mezi orphan receptory, které váží ligandy se steroidní strukturou (Xu et al. 2005). PXR je exprimován hlavně v játrech a tenkém i tlustém střevě. Je důležitým regulátorem biologických bariér, kde reguluje expresi biotransformačních enzymů (např. CYP3A, CYP2C, UGT1A1, SULT) a transportérů (např. P-glykoprotein a MRP2) (Gao a Xie 2010; Satsu et al. 2008). Známými aktivátory PXR z řad přírodních látek jsou například hyperforin z třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*) (Moore et al. 2000) a diterpeny obsažené v jinanu dvoulaločném (*Ginkgo biloba*) (Satsu et al. 2008). Vzhledem k tomu, že při aktivaci PXR se indukuje exprese CYP3A4, enzym katalyzující přeměnu mnoha léčiv, jsou při terapii danými léčivy zmíněné přírodní látky kontraindikovány (Moore et al. 2000).

CAR je exprimován především v játrech a v menší míře i ve střevě. Reguluje expresi enzymů první fáze biotransformace (především CYP2B6, CYP3A4, CYP2C, CYP2A6, CYP1A1, CYP1A2), konjugačních enzymů (např. UGT1A1, UGT1A6, UGT1A9, GST a SULT) a transportérů (MRP, MDR1 a OATP1) (Yang a Wang 2014).

Dalším mechanismem, stojícím za lékovými interakcemi, je inhibice biotransformačních enzymů. Nejčastěji se jedná o vzájemné působení současně podávaných léčiv, která jsou substrátem téhož enzymu - jedno léčivo enzym inhibuje a tím se sníží

biotransformace druhého léčiva. V řadě zdokumentovaných případů jsou ale danými inhibitory přírodní látky, ať už flavonoidy, seskviterpeny nebo jiné.

Příkladem je flavonoid likochalkon A (hlavní účinná látka lékořice), který silně inhibuje některé CYP isoformy. Většinou je typ inhibice působené likochalkonem A smíšený, ale v případě CYP3A4 jde o kompetitivní inhibici (He et al. 2015). Při kompetitivní inhibici se jak substrát, tak inhibitor váží do aktivního místa enzymu. Inhibitor toto aktivní místo blokuje a nedochází k tvorbě produktu. Kompetitivní inhibitory jsou látky strukturně podobné substrátu a často se od nich liší v afinitě k danému enzymu.

Triterpen pristimerin (hlavní účinná látka rodu *Celastrus*) kompetitivně inhibuje aktivitu CYP1A2 a CYP2C9, avšak aktivita CYP3A4 je tímto triterpenem inhibována nekompetitivně (Hao et al. 2017). Nekompetitivní inhibitory se váží na jiné místo než substrát, ale znemožňují jeho vazbu na enzym změnou konformace ve vazebném místě.

Cílem inhibitorů nejsou pouze enzymy, ale také transportéry. Příkladem toho je inhibice efluxního transportéru z řad ABC transportérů, P-glykoproteinu. Akompetitivně je inhibován působením demethoxycurcuminu, což je polyfenol obsažený v kurkumě (*Curcuma longa*) (Teng et al. 2015).

2.3 ANTIOXIDAČNÍ OBRANNÝ SYSTÉM

Reaktivní formy kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species) jsou živými organismy produkovány jako výsledek normálního buněčného metabolismu. Vykazují širokou škálu biologických účinků od fyziologických funkcí (nejčastěji v nízkých koncentracích) po poškozování buněčných komponent jako jsou lipidy, proteiny a DNA (při vysoké koncentraci ROS). Při posunu rovnováhy oxidanty/antioxidanty ve prospěch oxidantů vzniká tzv. oxidační stres, který se podílí na rozvoji mnoha patologických stavů včetně rakoviny, neurologického poškození, aterosklerózy, hypertenze, diabetu a astmatu. Kvůli reaktivní povaze ROS potřebují živé organismy ochranné mechanismy, aby si udržely redoxní homeostázu (Birben et al. 2012; Michiels et al. 1994; Yang a Lee 2015).

Mechanismy antioxidační obrany organismu působí na několika úrovních. Primární antioxidanty zasahují na úrovni tvorby volných radikálů. Proti vzniku ROS se uplatňují např. transportní proteiny a chelátory iontů přechodných kovů, které stabilizují ionty kovů v redoxně inaktivním stavu, a tím zabraňují těmto prvkům katalyzovat radikálové reakce. Sekundární antioxidanty obstarávají odstranění již vzniklých volných radikálů. Mezi sekundární antioxidanty jsou řazeny enzymové antioxidanty a nízkomolekulární redukující látky (neenzymové antioxidanty). Terciární antioxidanty jsou zaměřeny na opravy a eliminaci

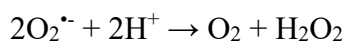
molekul poškozených volnými radikály. Do této skupiny patří např. enzymy opravující DNA a proteolytické enzymy. Jedním z nejčastějších systémů klasifikace antioxidantů je rozdělení na enzymové a neenzymové antioxidanty (Birben et al. 2012).

2.3.1 Enzymové antioxidanty

Součástí první linie obrany proti ROS jsou detoxikační enzymy, především superoxiddismutasa (SOD), glutathionperoxidasa (GPx) a katalasa (CAT) (Birben et al. 2012).

2.3.1.1 Superoxiddismutasa

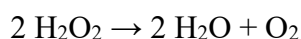
Superoxiddismutasa je jedním z hlavních antioxidačních enzymů. Katalyzuje přeměnu reaktivního superoxidu na peroxid vodíku a kyslík:



Superoxidový anion radikál má redukční i oxidační vlastnosti, takže při dismutaci jedna jeho molekula poskytuje elektron té druhé. U lidí existují tři formy: cytosolická Cu/Zn-SOD, mitochondriální Mn-SOD a extracelulární SOD (EC-SOD). SOD přeměňuje $\text{O}_2^{\cdot-}$ oxidací a redukcí tranzitního kovového iontu v aktivním místě ping-pongovým mechanismem (Mates et al. 1999).

2.3.1.2 Katalasa

Peroxid vodíku je produkován působením SOD nebo oxidasami, například xanthinoxidasou. Přeměnu peroxidu vodíku na vodu a molekulární kyslík katalyzuje katalasa (CAT) či různé peroxidasy. Hlavní rolí katalasy je ochrana buněk před vysokými koncentracemi peroxidu vodíku. CAT je tetramerní enzym tvořený čtyřmi stejnými podjednotkami s hemovým jádrem v aktivním místě (Birben et al. 2012). CAT je přítomná v peroxisomech, kde katalyzuje následující reakci:



2.3.1.3 Glutathionperoxidasa

Glutathionperoxidasy (GPx) tvoří rodinu enzymů, které katalyzují redukcí peroxidu vodíku a lipidových hydroperoxidů (vznikají při peroxidaci membránových lipidů) v přítomnosti redukovaného glutathionu jako donoru elektronů. U savců byly nalezeny čtyři hlavní selen-dependentní isoformy GPx. GPx1 (cytosolická forma, metabolizuje H_2O_2) a GPx4 (katalyzuje přeměnu fosfolipidových hydroperoxidů) se vyskytují ve většině tkání. GPx2 se nachází na povrchu epitelálních buněk trávicího traktu, kde redukuje peroxidy v potravě. GPx3

je jediným členem GPx secernovaným do plasmy a je považována za nejdůležitější savčí extracelulární antioxidantní enzym (Birben et al. 2012). Dále byly v savčích buňkách identifikovány ještě další dvě isoformy, GPx5 a GPx6. Na rozdíl od ostatních isoform postrádá GPx5 ve svém aktivním místě selenocystein a je exprimována v buňkách nadvarlete. GPx6 je selen-dependentní a vyskytuje se pouze během embryonálního vývoje a v epitelu čichových buněk dospělých jedinců (Margis et al. 2008). GPx1, 2, 3 a 6 jsou homotetramery, které obsahují seleno-cysteinový zbytek v každé ze svých čtyř podjednotek. GPx4 je monomerní forma obsahující rovněž selenocystein v aktivním centru, zatímco GPx5 je homodimer s molekulou cysteinu v aktivním místě obou podjednotek (Brigelius-Flohe a Maiorino 2013).



Oxidovaný glutathion (GSSG), který při reakci vzniká, je redukován zpět na GSH pomocí glutathionreduktasy (GR). Tím je v buňkách udržován fyziologický poměr GSH/GSSG (Mates et al. 1999). GR je homodimerní flavoprotein, který k redukcí GSSG využívá jako kofaktor NADPH (Couto et al. 2016).

2.3.1.4 Další enzymové antioxidanty

S likvidací H_2O_2 je spojováno i několik thiol-obsahujících enzymů jako jsou thioredoxinreduktasy (TrxR) nebo thioredoxinperoxidasy (Birben et al. 2012).

Do antioxidantní obrany organismu se zapojuje i GST. Tento konjugací enzym katalyzuje metabolismus xenobiotik, především nenasycených aldehydů, epoxidů a hydroperoxidů (Birben et al. 2012). Podrobněji je tento enzym popsán v kapitole Konjugace s glutathionem.

2.3.2 Neenzymové antioxidanty

2.3.2.1 Nízkomolekulární antioxidanty

Nízkomolekulární látky patří mezi neenzymové antioxidanty, příkladem takových látek jsou vitamíny (vitamín C a E), β -karoten, kyselina močová a GSH. Tyto látky můžeme podle rozpustnosti ve vodě rozdělit na hydrofilní, lipofilní a amfifilní; podle původu potom na endogenní a exogenní.

Vitamín C (kyselina L-askorbová) zajišťuje intracelulární a extracelulární vychytávání a redukcí volných kyslíkových radikálů. Askorbát také regeneruje oxidovaný tokoferolový radikál zpět na tokoferol (vitamín E) a tím se nepřímou podílí na vychytávání lipofilních radikálů. Vitamín C je kromě antioxidantní aktivity důležitý pro vstřebávání železa, biosyntézu kolagenu a účastní se též syntézy katecholaminů. Vitamín E (α -tokoferol) se řadí mezi vitamíny

rozpuštěné v tucích a je zapojen především do obrany před oxidačním poškozením membrán. Vitamín E také pomáhá stabilizovat atherosklerotické pláty.

GSH se vyskytuje ve všech buněčných kompartmentech a je hlavním ve vodě rozpustným antioxidantem. Do antioxidantní ochrany se navíc zapojuje jako kofaktor enzymových antioxidantů, účastní se přenosu aminokyselin přes buněčnou membránu a je schopen redukovat tokoferolový radikál (podobně jako vitamín C).

Lipofilní antioxidant β -karoten (patří mezi rostlinné pigmenty) je schopen reagovat s peroxylovými (ROO•), hydroxylovými (•OH) a superoxidovými ($O_2^{\cdot-}$) radikály. Chrání kůži před poškozením, které způsobuje UV záření, neboť zhasí singletový kyslík, který působením tohoto záření vzniká.

Na vylučování volných radikálů se podílí i fenolické látky rostlinného původu, např. deriváty stilbenu (*trans-resveratrol*), fenolické kyseliny (deriváty kyseliny benzoové a skořicové), nebo flavonoidy.

Kyselina močová a bilirubin jsou endogenními nízkomolekulárními antioxidanty. Bilirubin se účastní ochrany lipidové membrány před peroxidací a pomocí biliverdinreduktasy a NADPH je vzniklý oxidovaný biliverdin redukován zpět na bilirubin. Mezi nízkomolekulárními antioxidanty se řadí mnoho dalších látek, např. ubichinon (koenzym Q₁₀), kyselina α -lipoová, nebo melatonin (Birben et al. 2012; Pisoschi a Pop 2015).

2.3.2.2 Vysokomolekulární antioxidanty

Na udržení redoxní homeostázy a prevenci vzniku volných radikálů se podílejí endogenní proteiny, které váží přechodné kovy v komplexu. Volné Fe(II) a Cu(I) ionty mohou reagovat s peroxidem vodíku za vzniku vysoce reaktivního hydroxylového radikálu (Fentonova reakce). Ceruloplasmin je protein, který zajišťuje oxidaci Fe(II) na Fe(III), které je následně inaktivováno vazbou na některý ze specifických proteinů. Fe(III) je takto vylučováno a přenášeno prostřednictvím transferinu (v plasmě), feritinu (ve střevní sliznici a kostní dřeni) a laktoferinu (v leukocytech). Vysokomolekulárními antioxidanty jsou i proteiny, které vylučují a váží hemoglobin (haptoglobin) a hem (hemopexin), neboť funkční forma železa v nich vázaná má prooxidační vlastnosti. Dalším příkladem jsou metalothioneiny, což je skupina proteinů bohatých na cystein, které chelatují ionty kovů (Vasak 2005). Albumin je dalším příkladem proteinu, který se vylučováním iontů kovů podílí na antioxidantní ochraně organismu.

2.4 METODIKA

Základními metodami použitými k analýze vzorků byly: stanovení enzymové aktivity, detekce specifických proteinů a stanovení exprese mRNA vybraných genů.

2.4.1 Stanovení enzymové aktivity

Aktivity vybraných biotransformačních a antioxidačních enzymů byly stanoveny v subcelulárních frakcích prostřednictvím specifických substrátů v přítomnosti potřebných kofaktorů spektrofotometricky, spektrofluorometricky nebo pomocí HPLC analýzy. Výsledky byly vyjádřeny jako specifická aktivita, tedy aktivita vztažená na hmotnost (mg) celkového proteinu ve vzorku.

2.4.1.1 Enzymy první fáze biotransformace

Metoda stanovení aktivity jednotlivých isoform CYP je založena na přidání substrátu, relativně specifického pro danou isoformu, tj. ethoxyresorufinu (CYP1A1, částečně CYP1A2), methoxyresorufinu (CYP1A2, částečně 1A1), pentoxyresorufinu (CYP2B) a benzyloxyresorufinu (CYP3A a CYP2B). V mikrosomální frakci je po reakci detekován fluoreskující produkt resorufin. Metoda byla upravena podle Price et al. (2000). Další metodou pro stanovení aktivity CYP3A je HPLC detekce hydroxylovaného midazolamu (Elbarbry et al. 2009). Aktivita isoformy CYP2C9 byla stanovena spektrofluorimetrickou detekcí 7-hydroxy-4-trifluormethylkumarinu, produktu vznikajícího z relativně specifického substrátu 7-methoxy-4-trifluoromethylkumarinu (Price et al. 2000).

Stanovení aktivity AKR probíhalo na základě práce Ohara et al. (1995). Sledován byl úbytek (AKR1A1), případně přírůstek (AKR1C) koncentrace koenzymu NADPH (absorbance při 340 nm). Při stanovení AKR1A1 byl součástí reakční směsi relativně specifický substrát DL-glyceraldehyd a NADPH. V případě AKR1C reakční směs obsahovala acenaftenol a NADP⁺.

Součástí reakční směsi pro stanovení aktivity CBR1 je menadion (substrát) a koenzym NADPH. Podobně jako v případě AKR1A1 byl spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm sledován úbytek NADPH. Tato metoda vychází z publikace Mate et al. (2008).

Aktivita NQO1 byla stanovena na základě spektrofotometrického měření redukce cytochromu c při vlnové délce 550 nm a v přítomnosti NADH. Tato metoda byla popsána v publikaci Cullen et al. (2003).

2.4.1.2 Enzymy druhé fáze biotransformace

Stanovení GST je založeno na metodě podle Ye a Zhang (2001). K cytosolu byl přidán GSH (konjugační činidlo) a 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (substrát). Tvorba S-2,4-dinitrofenylglutathionu (vzniklý konjugát) byla sledována jako přírůstek absorbance při vlnové délce 340 nm.

UGT aktivita byla stanovena po 20 minutách inkubace mikrosomální frakce (po předchozí preinkubaci s detergentem) s p-nitrofenolem, UDP-glukuronovou kyselinou a chloridem hořečnatým. Slepé vzorky byly inkubovány bez přítomnosti UDP-glukuronové kyseliny. Reakce byla zastavena trichloroctovou kyselinou a po neutralizaci pomocí hydroxidu sodného byla změřena absorbance při 405 nm. Tato metoda vychází z publikace Letelier et al. (2005).

Za účelem stanovení aktivity SULT byla použita mírně upravená metoda podle Frame et al. (2000). Měření bylo založeno na tvorbě p-nitrofenolu z p-nitrofenylsulfátu. Součástí reakční směsi je chlorid hořečnatý, 3'-fosfoadenosin-5'-fosfát, p-nitrofenylsulfát a 2-naftol. Absorbance vzniklého produktu byla měřena při 405 nm.

Stanovení aktivity COMT je založeno na HPLC detekci methylovaného norepinefrinu. Tato metoda je podrobně popsána v práci Aoyama et al. (2005).

Metody pro stanovení enzymové aktivity SULT a COMT nebyly na našem pracovišti prováděny a byly zavedeny až v rámci této disertační práce.

2.4.1.3 Antioxidační enzymy

Aktivita peroxidasy byla stanovena pomocí dvojice substrátů pyrokatechol-anilin, která sloužila jako vodíkový donor pro stanovení aktivity peroxidasy. Anilin-pyrokatechol je přeměňován na růžově zbarvený produkt [4-(fenylamino)benzen-1,2-diol], jehož přírůstek byl zaznamenáván spektrofotometricky při vlnové délce 510 nm (Rad et al. 2007).

Stanovení aktivity GR je založeno na přeměně oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovaný glutathion (GSH) za současné oxidace koenzymu NADPH (Bonilla et al. 2008; Carlberg a Mannervik 1985). Spotřeba NADPH je detekována jako úbytek absorbance při vlnové délce 340 nm

Metoda stanovení aktivity GPx vychází z metody pro GR. V průběhu reakce katalyzované GPx je GSH přeměňován na GSSG. Vzniklý GSSG je průběžně redukován zpět na GSH pomocí GR. Tuto reakci doprovází oxidace NADPH, což je monitorováno spektrofotometricky poklesem absorbance při vlnové délce 340 nm (Flohe a Gunzler 1984; Handy et al. 2009).

Pro stanovení aktivity katalasy byl použit molybdenan amonný, který tvoří s H₂O₂ žlutý komplex. Aktivita katalasy pak byla stanovena na základě poklesu absorbance při vlnové délce 405 nm (Goth 1991).

Stanovení TrxR aktivity je založeno na přeměně 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny na 5'-thionitrobenzoovou kyselinu (TNB) za současné oxidace NADPH (Kuntz et al. 2007). Množství vznikajícího TNB je zaznamenáváno pomocí detekce přírůstku absorbance při vlnové délce 412 nm.

Aktivita SOD byla stanovena pomocí SOD Assay Kit-WST (Dojindo Laboratories, Tabaru, Japan) podle manuálu výrobce.

2.4.2 Stanovení koncentrace proteinů

Za účelem stanovení koncentrace proteinů byly používány dvě metody. První z nich je tzv. BCA metoda, která je založena na reakci měďnatých iontů s proteiny v alkalickém prostředí. Měďnaté ionty přecházejí na měďné, které v prostředí s pH 10 tvoří stabilní barevné komplexy s bicinchoninovou kyselinou (BCA). Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci bílkovin a ve vzorku je stanovena jako absorbance při vlnové délce 562 nm (Smith et al. 1985).

Druhou metodou bylo stanovení podle Bradfordové, které je založeno na vlastnosti kyselého roztoku barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 změnit po navázání bílkoviny své absorpční maximum ze 465 nm na 595 nm. Intenzita zbarvení je pak přímo úměrná koncentraci bílkoviny (Compton a Jones 1985).

2.4.3 Průkaz a semikvantitativní stanovení proteinů

Prvním krokem pro stanovení exprese proteinů ve vzorku bylo jejich rozdělení pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Zahříváním vzorku došlo k denaturaci proteinů a navázání molekul dodecylsulfátu sodného, který proteinu udělil záporný náboj přímo úměrný jeho molekulové hmotnosti. Po nanesení na polyakrylamidový gel a jeho zapojení do elektrického pole byly molekuly rozděleny podle velikosti jejich záporného náboje, tj. podle jejich molekulové hmotnosti.

Dalším krokem byl Western blot, kdy byly separované proteiny přeneseny na nitrocelulózuovou membránu pomocí Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad). Metoda byla upravena podle Towbin et al. (1979). Membrána s navázanými proteiny byla následně inkubována s roztokem primární protilátky (specifická pro sledovaný protein) a po omytí proběhla další inkubace s roztokem sekundární protilátky (konjugovaná s peroxidasou). K detekci signálu byl použit chemiluminiscenční kit (Amersham Bio-sciences, USA). Koncentrace jednotlivých proteinů byla standardizována na β-aktin.

2.4.4 Kvantifikace mRNA

RNA byla izolována pomocí TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, USA), což je specifická směs fenolu a guanidin isothiokyanátu, která umožňuje selektivní izolaci celkové RNA (tRNA, mRNA, rRNA, microRNA) z malého množství tkání či buněk. Po homogenizaci tkáně (případně buněk) byl do vzniklého homogenátu přidán chloroform. Následné stočení rozdělilo směs na vodnou a organickou fázi, přičemž RNA zůstávala výhradně v horní vodné fázi. Přidáním isopropanolu došlo k selektivnímu vysrážení čisté RNA. Koncentrace a čistota RNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí NanoDrop ND-1000 UV-Vis spektrofotometru (Thermo Scientific, Waltham, USA). Jednořetězcová cDNA (complementary DNA) byla syntetizována z 1 µg celkové RNA pomocí ProtoScript II reversní transkriptasy (NEB, Ipswich, UK) a náhodných hexamerů. qPCR analýza byla provedena na QuantStudio 6 termocykléru (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) za použití qPCR Core kitu pro Syber Green I (Eurogentec, Seraing, Belgium) a ručně navržených primerů. Kalkulace byly založeny na “Delta-Delta Ct metodě” (Livak a Schmittgen 2001).

3 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem mého doktorského studia bylo sledování účinku vybraných přírodních látek na aktivitu a proteinovou i genovou expresi vybraných biotransformačních a antioxidantních enzymů v různých modelových systémech.

Mezi dílčí cíle patřilo:

- Sledovat časovou závislost změny jednotlivých parametrů (aktivita, proteinová a genová exprese) stanovovaných při indukčních studiích a určit jejich vzájemnou korelaci.
- Studovat modulační účinky jednotlivých katechinů a extraktu zeleného čaje na biotransformační enzymy v buněčné linii Caco-2.
- Studovat modulační účinky vybraných seskviterpenů na aktivitu a genovou expresi biotransformačních enzymů *in vitro* a *in vivo*.
- Studovat modulační účinky brusinkového extraktu na aktivitu a proteinovou expresi biotransformačních enzymů u potkana *in vivo*.
- Studovat účinky brusinkového extraktu na antioxidantní enzymy *in vivo* u normálních myší a myší s navozenou obezitou.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 ČASOVÁ ZÁVISLOST ZMĚN AKTIVITY A PROTEINOVÉ A GENOVÉ EXPRESE BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ

Studium modulačního účinku léčiv či jiných xenobiotik na biotransformační enzymy je bezpochyby velice důležité především pro možnost vzájemných interakcí. U mnoha studií prováděných za tímto účelem je pouze jeden inkubační interval, což je také v doporučeních úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro indukční studie (Huang a Stifano 2006). Největší výpovědní hodnotu z pohledu farmakologických a toxikologických studií má současné sledování aktivity a hladin mRNA a proteinu daného enzymu. Přesto však z metodických a ekonomických důvodů převládají studie sledující pouze jeden, případně dva z těchto parametrů (Richert et al. 2009).

V naší studii jsme stanovili specifickou aktivitu a proteinovou a genovou expresi tří biotransformačních enzymů regulovaných přes AhR a sledovali jsme průběh indukce navozené modelovým induktorem β -naftoflavonem (BNF) ve třech (v případě mRNA čtyřech) časových intervalech. Modelovým systémem byly izolované potkaní hepatocyty ovlivněné BNF v koncentraci 10 μ M. Inkubace byla ukončena po 4, 12 a 24 hodinách, v případě stanovení exprese mRNA byl přidán interval 2 hodiny. Sledovanými enzymy byl cytochrom P450 (CYP1A1/2), glutathion-S-transferasa alfa (GSTA) a NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1).

V případě CYP1A1/2 byl u všech parametrů dobře patrný pozvolný nárůst získaných hodnot. Hladina mRNA se zvýšila z 11 násobku (po 2 hodinách) na 103 násobek (po 24 hodinách) kontroly. Koncentrace proteinu CYP1A1 byla po 24 hodinách osminásobná a proteinu CYP1A2 pětinasobná. Aktivita CYP1A1/2 byla mírně zvýšená již po 4 hodinách a dále rostla, přestože v dalších časových intervalech nebyla v kontrolních vzorcích již detekována. Z výsledků je patrné, že CYP1A induktory jsou snáze odhalitelné, neboť stačí sledovat jeden parametr a jeden časový interval v rozmezí 4-24 hodin pro jejich detekci.

NQO1 specifická aktivita s časem postupně narůstala, avšak hladina mRNA byla nejvyšší po dvou hodinách inkubace s BNF (16 násobek kontroly) a v dalších časových intervalech došlo k její postupné degradaci až na pětinasobek kontroly (po 24 hodinách). NQO1 protein byl po 4 hodinách mírně zvýšen (180 % kontroly) působením BNF a jeho koncentrace se významně neměnila po celou dobu trvání experimentu.

Odezvou GSTA aktivity na BNF po 4 hodinách bylo její snížení na 65 % aktivity kontroly. V průběhu experimentu došlo k jejímu pomalému zvyšování až na 76 % aktivity

kontroly po 24 hodinách. Po 2 hodinách byla hladina mRNA GSTA zvýšena, avšak v dalších časových intervalech byla srovnatelná s kontrolními hodnotami. Množství GSTA proteinu v ovlivněných hepatocytech se od kontrolních významně nelišilo v žádném z časových intervalů. Inhibiční reakce GST na působení BNF není tak překvapivá vzhledem k tomu, že se na regulaci GST podílí více mechanismů (Higgins a Hayes 2011) a byla již pozorována v buněčné linii HepaRG (Brauze et al. 2017).

U každého ze sledovaných enzymů byla pozorována odlišná odezva na působení BNF a překvapivě i rozdílný vztah mezi aktivitou a proteinovou a genovou expresí, přestože jsou všechny enzymy regulovány přes AhR. Získané výsledky jasně ukazují, že použití pouze jednoho časového intervalu a/nebo pouze jednoho z parametrů může vést k nesprávné interpretaci výsledků.

Podrobnosti jsou uvedeny v příloze I.

4.2 KATECHINY ZELENÉHO ČAJE A AKTIVITA KONJUGAČNÍCH ENZYMŮ *IN VITRO*

Katechiny zeleného čaje, podobně jako mnoho dalších přírodních látek, se díky svým pozitivním účinkům na lidské zdraví vyskytují v mnoha doplňcích stravy. Avšak jejich konzumace ve vysokých dávkách může vést k modulaci aktivity biotransformačních enzymů a následně k farmakologickým komplikacím. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli ke zhodnocení jejich vlivu na hlavní konjugační enzymy.

Caco-2 buněčná linie (odvozená od lidského epiteliálního kolorektálního adenokarcinomu) byla použita jako střevní model nádorových buněk (proliferující forma) a model enterocytům podobných buněk (diferencovaná forma). Pomocí MTT testu a testu s neutrální červení byla stanovena viabilita buněk po inkubaci s extraktem ze zeleného čaje (GTE) a jeho hlavním katechinem EGCG v koncentračním rozmezí 0-12,5 µg/ml. Na základě získaných výsledků byly buňky inkubovány 24 a 96 hodin s EGCG a GTE v netoxických koncentracích 1 a 5 µg/ml. V získaných vzorcích byla stanovena aktivita a exprese mRNA GST, UGT, SULT a COMT.

GTE ani EGCG neovlivnily v Caco-2 buněčné linii mRNA hladiny žádného z vybraných konjugačních enzymů. SULT aktivita nebyla inkubací s katechiny signifikantně ovlivněna a aktivita UGT nebyla v mikrosomálních frakcích detekována vůbec. Aktivita GST byla vybranými látkami v obou koncentracích zvýšena přibližně o 30 % po 96 hodinové inkubaci s diferencovanými buňkami. Tento efekt byl již pozorován v jiných modelových systémech (Kanwal et al. 2014; Maliakal et al. 2001; Matoušková et al. 2014; Pandey et al. 2010) a je považován za jeden z mechanismů, kterými katechiny chrání buňky před jejich oxidativním poškozením (Chow et al. 2007). EGCG a GTE naopak snižovaly aktivitu COMT v diferencovaných Caco-2 buňkách po 24 hodinách. Tento efekt však není považován za žádoucí v enterocytům podobných buňkách, vzhledem k tomu, že COMT chrání buňky před toxicitou chinonů, které z katecholů jinak vznikají. Výjimkou je terapie Parkinsonovy choroby, kdy inhibice COMT aktivity zvyšuje biologickou dostupnost levodopy, která je jinak tímto enzymem metabolizována (Chen et al. 2005).

Podrobněji jsou podmínky studie a získané výsledky popsány v příloze II.

4.3 LINEÁRNÍ SESKVITERPENY A AKTIVITA BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ *IN VITRO*

Seskviterpeny jsou sekundárními metabolity rostlin, které se ve stravě objevují, ale především jsou přijímány prostřednictvím potravních doplňků nebo v tradiční medicíně. Cílem této *in vitro* studie bylo porovnání potencionálních modulačních účinků vybraných acyklických seskviterpenů: *trans*-nerolidolu (TNER), *cis*-nerolidolu (CNER) a farnesolu (FAR) na aktivity hlavních biotransformačních enzymů v lidských a potkaních játrech.

Aktivity byly stanoveny v subcelulárních frakcích prostřednictvím specifických substrátů v přítomnosti potřebných kofaktorů spektrofotometricky, spektrofluorometricky a pomocí HPLC analýzy. Nejdříve proběhlo ověření možného inhibičního vlivu CNER, TNER a FAR (v koncentraci 100 μ M) na aktivity vybraných karbonyl-redukujících enzymů (AKR1A1, AKR1C, CBR1, NQO1), konjugačních enzymů (SULT, GST, UGT) a cytochromů P450. Následně byla provedena inhibiční studie vybraných isoform CYP v přítomnosti specifického substrátu a seskviterpenů v koncentračním rozmezí 0-100 μ M.

Ze všech testovaných enzymů, byla inhibice aktivity pozorována pouze u CYP1A (substrát ethoxyresorufin) a CYP2B/3A (substrát benzyloxyresorufin). Inhibice se projevila v lidských i potkaních jaterních mikrosomech a to působením všech tří studovaných seskviterpenů. V případě inhibice CYP2B/3A byly získané hodnoty IC_{50} sledovaných seskviterpenů podobné, avšak v lidských mikrosomech byly mírně nižší (1,3-2,4 μ M) než v potkaních (4,4-6,4 μ M). Inhibiční efekt seskviterpenů byl dokonce ještě silnější než inhibice navozená ketokonazolem (modelový inhibitor CYP3A4). Kinetickou studií, provedenou s TNER, bylo zjištěno, že inhibice CYP2B/3A byla jak v lidských, tak i potkaních mikrosomech nekompetitivní. Vzhledem k tomu, že CYP3A4 je jedním z hlavních enzymů metabolizujících léčiva, může současné podávání seskviterpenů vést k nebezpečným interakcím.

Inhibiční účinek seskviterpenů na CYP1A nebyl tak vyrovnaný jako v případě CYP2B/3A a nebyl ani tak silný jako v případě modelového inhibitoru α -naftoflavonu. Lidská CYP1A byla působením TNER inhibována kompetitivně, zatímco u potkaní CYP1A byla inhibice nekompetitivní. Pozorovaná inhibice CYP1A představuje pozitivní efekt, neboť za katalýzy CYP1A dochází k tvorbě toxických a kancerogenních metabolitů z enviromentálních polutantů (Ma a Lu 2007).

Podle výsledků inhibiční studie byly vybrány pro stanovení hodnoty IC_{50} i další isoformy CYP člověka (CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4/5). Pozorovaná inhibice však byla velmi slabá, nebo se neprojevila vůbec.

Překvapivá byla především slabá inhibice v případě CYP3A4/5 při použití midazolamu a testosteronu jako substrátu, neboť jsou oba relativně specifické pro CYP3A4.

Na základě výsledků této studie můžeme říci, že citlivost biotransformačních enzymů na seskviterpeny je podobná v potkaních i lidských játrech a potkani by tedy mohli být vhodným modelem pro hodnocení interakce léčivo-seskviterpen *in vivo*.

Bližší informace jsou obsaženy v příloze III.

4.4 CYKLIČKÉ SESKVITERPENY A AKTIVITA BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ *IN VITRO*

Seskviterpeny, hlavní obsahové látky rostlinných silic, jsou často užívány v tradiční medicíně a jako potravní doplňky. V naší studii jsme se zaměřili na cyklické, široce rozšířené seskviterpeny β -karyofylen (CAP), jeho isomer α -humulen (HUM) a β -karyofylen oxid (CAO). Cílem bylo stanovit případné inhibiční účinky těchto tří látek na aktivity hlavních enzymů metabolizujících xenobiotika. Zvoleným *in vitro* modelem byly lidské a potkaní subcelulární frakce, které byly inkubovány s CAP, CAO nebo HUM v přítomnosti specifických substrátů a kofaktorů sledovaných enzymů.

V první fázi experimentu proběhlo ověření inhibičního účinku na vybrané CYP isoformy, karbonyl-redukující enzymy a konjugační enzymy. Použitá koncentrace seskviterpenů byla 100 μ M. Vliv seskviterpenů byl pozorován pouze u CYP1A (substrát ethoxyresorufin) a CYP2B/3A (substrát benzyloxyresorufin).

S ohledem na výsledky inhibiční studie byla stanovena hodnota IC_{50} pro inhibované formy CYP. Inhibice CYP1A zprostředkovaná CAP, CAO i HUM se ukázala jako pouze mírná, avšak inhibice CYP2B/3A byla velmi silná s IC_{50} v rozmezí přibližně 2-5 μ M. V lidských hepatocytech byla aktivita CYP2B/3A působením CAO inhibována se stejnou intenzitou jako modelovým inhibitorem ketokonazolem.

Mechanismus, kterým CAO inhibuje enzymovou aktivitu, byl stanoven pro CYP1A a CYP2B/3A v lidské i potkaní mikrosomální frakci. Kinetická studie ukázala, že v případě lidské CYP1A je inhibice navozená CAO kompetitivní, zatímco potkaní CYP1A CAO inhibuje nekompetitivně. Nekompetitivní inhibice byla pozorována i v případě potkaní a lidské CYP2B/3A.

Silný inhibiční účinek seskviterpenů byl podnětem pro stanovení hodnot IC_{50} i pro další významné lidské isoformy CYP (CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4/5). Nejsilnější inhibice (IC_{50} 20 μ M) byla pozorována při použití midazolamu jako substrátu (CYP3A4) a CAO jako inhibitoru.

Metabolismus mnoha léčiv probíhá přes CYP3A4. S ohledem na tento fakt je inhibice tohoto enzymu navozená seskviterpeny určitým rizikem a mohla by vést k ovlivnění farmakokinetiky současně užívaných léčiv. Při pohledu na výsledky získané z lidských a potkaních subcelulárních frakcí, můžeme potkany označit za vhodný *in vivo* model pro další testování případných interakcí seskviterpenů s léčivy.

Podrobnosti jsou obsahem přílohy IV.

4.5 SESKVITERPENY B-KARYOFYLEN OXID A *TRANS*-NEROLIDOL A BIOTRANSFORMAČNÍ ENZYMY *IN VIVO*

Součástí rostlinných silic jsou seskviterpeny, populární bioaktivní látky s pozitivním efektem na lidské zdraví. Zvýšený zájem o konzumaci potravních doplňků s těmito látkami zvyšuje potřebu poznání jejich případných modulačních účinků na biotransformační enzymy. Za účelem získání komplexních dat jsme provedli *in vivo* studii, ve které byla myším podána dávka CAO nebo TNER v koncentraci 50 mg/kg. Myši byly usmrceny po 6 a 24 hodinách a byla jim odebrána játra a střevo, kde byla stanovena aktivita a mRNA exprese vybraných enzymů první a druhé fáze biotransformace xenobiotik. Aktivity byly stanoveny spektrofotometricky, případně spektrofluorometricky prostřednictvím specifických substrátů a kofaktorů a hladiny mRNA byly stanoveny metodou kvantitativní real-time PCR. Mezi sledované enzymy patřily cytochromy P450 isoformy CYP1A1, CYP1A2, CYP2B, CYP3A, CYP2C9, dále karbonyl-redukující (CBR1/3, NQO1, AKR1A1 a AKR1C) a konjugační (GST, UGT a SULT) enzymy. Hladiny mRNA byly stanoveny pouze v případě detekce změny v enzymové aktivitě.

Oba seskviterpeny zvýšily aktivitu CYP v jaterních i střevních mikrosomech. Aktivity CYP2B a CYP3A byly v játrech oběma seskviterpeny zvýšeny více než dvojnásobně a aktivity CYP1A1 a CYP2C byly zvýšeny pouze mírně. Ve střevě byla nejvíce indukována aktivita CYP2C a aktivita CYP1A1 a CYP1A2 nebyly detekovány vůbec. Ve střevě i v játrech byly hladiny mRNA vybraných isoform CYP zvýšeny, což koreluje s výsledky získanými stanovením aktivit. Vzhledem k indukci CYP aktivity, mohou v podmínkách *in vivo* CAO a TNER ovlivnit biodostupnost, toxicitu a účinek současně podaných léčiv či jiných xenobiotik. Účinek CAO a TNER na enzymy redukující karbonyl a chinon v myším střevě byl pozorován pouze u NQO1, jehož aktivita byla inhibována po 6 i 24 hodinách od podání seskviterpenů. Ve střevě stanovená hladina mRNA NQO1 se ovšem v ovlivněných vzorcích nelišila od hladin kontrolních. V játrech bylo snížení NQO1 aktivity patrné pouze po 6 hodinách po podání CAO. V játrech se po 24 hodinách projevilo mírné zvýšení aktivity AKR1C a CBR1/3. Aktivita vybraných konjugačních enzymů (GST, SULT, UGT) nebyla ovlivněna. Pouze SULT byla v játrech mírně zvýšena po podání TNER.

Ze získaných výsledků je patrné, že navzdory obecné představě o bezpečnosti přírodních látek, mohou být tyto látky biologicky aktivní a jejich konzumace může přinášet jistá rizika.

Detailněji je celá studie popsána v příloze V.

4.6 BRUSINKOVÝ EXTRAKT A AKTIVITA A EXPRESE BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ

Potravní doplňky a džusy z brusinky velkoplodé (*Vaccinium macrocarpon*) jsou v dnešní době široce rozšířené a často konzumované díky jejich pozitivnímu dopadu na lidské zdraví, především jako podpora terapie infekce dolních cest močových, dále pro jejich protinádorové a antioxidační účinky. Plody brusinek obsahují vedle vitamínu C, také vysoké koncentrace anthokyaninů, flavonolů a proanthokyanidinů (Dao et al. 2012).

V naší *in vivo* studii byl potkanům p. o. podáván standardizovaný brusinkový extrakt CystiCran[®] (1,6 mg anthokyanidinů a 36 mg proanthokyanidinů v jedné tabletě) ve dvou schématech. První skupině potkanů bylo podáváno 14 dní 0,5 mg proanthokyanidinů/kg/den (což u lidí odpovídá jedné tabletě denně) a druhá skupina dostala jednorázově 1,5 mg proanthokyanidinů/kg/den (což u lidí odpovídá třem tabletám). V jaterní tkáni a mukóze tenkého střeva byla stanovena aktivita a exprese vybraných biotransformačních enzymů: cytochrom P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B and CYP3A), CBR1, GST a UGT.

V mikrosomální jaterní frakci bylo po 14-ti denním podávání brusinkového extraktu pozorováno zvýšení aktivity 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylasy (EROD; CYP1A) a 7-benzyloxyresorufin-*O*-dearylasy (BROD; CYP2B/3A). Jednorázové podání brusinkového extraktu nemělo na aktivitu CYP statisticky významný efekt. Ve střevní mukóze nebyla aktivita CYP detekována ani v kontrolních vzorcích.

Brusinkový extrakt v obou dávkovacích schématech zvýšil specifickou aktivitu CBR1 v játrech a tenkém střevě potkana, ačkoliv pouze změny v cytosolu jater byly statisticky významné. Specifické aktivity konjugačních enzymů UGT a GST v játrech potkana byly zvýšeny jednorázovým i dlouhodobým podáváním brusinkového extraktu, přičemž nárůst aktivity UGT byl výraznější (přibližně o 50 %). V tenkém střevě nebyla UGT detekována a aktivita GST zůstala nezměněna. V případě změny aktivity enzymu, byl odpovídající protein kvantifikován pomocí metody Western blot. V hladině proteinů žádného z enzymů nebyla pozorována statisticky významná změna vůči kontrole.

Vzhledem k pouze mírnému ovlivnění aktivit biotransformačních enzymů, se riziko interakcí při současném podávání léčiv nejví jako závažné.

Podrobněji je tato *in vivo* studie popsána v příloze VI.

4.7 BRUSINKOVÝ EXTRAKT A ANTIOXIDAČNÍ OCHRANA U OBÉZNÍCH MYŠÍ

Plody brusinky (*Vaccinium macrocarpon*, Ericaceae) reprezentují bohatý zdroj vitamínu C a fenolických antioxidantů (především flavonoidů), které se podílejí na pozitivních účincích na lidské zdraví. Ve stravě jsou nejčastěji přijímány ve formě džusu, sušených plodů či jako potravní doplňky. Některé z pozitivních účinků brusinek byly popsány u obézních jedinců, u kterých brusinkový extrakt pomohl zredukovat váhu a zmírnit oxidační stres (Anhe et al. 2015).

Cílem této *in vivo* studie bylo zhodnocení vlivu brusinkového extraktu na antioxidační enzymy v játrech, střevě, plazmě a erytrocytech obézních a normálních myší. Za tímto účelem byly myši hned po narození rozděleny do dvou skupin a u jedné z nich byla navozena obezita glutamátem sodným. Po sedmi měsících byly obézní i normální myši rozděleny do dvou skupin, kdy jedna byla kontrolní se standartní stravou a druhé byla podávána strava obsahující 2 % brusinkového extraktu, která jim byla podávána 28 dní.

V plazmě byla stanovena celková hladina thiolových skupin, která byla zvýšena u obézních i normálních myší dostávajících brusinkový extrakt a hladina malondialdehydu, která se od hodnot naměřených u kontrolních myší nelišila. V erytrocytech pak byly stanoveny aktivity CAT, GPx, GR, GST, SOD a koncentrace GSH. Specifická aktivita GST v erytrocytech byla signifikantně zvýšena u obézních i normálních myší, které měly stravu obohacenou brusinkovým extraktem. V játrech a tenkém střevě byly sledovány aktivity CAT, SOD, GR, GPx, GST, NQO1, peroxidasy (Px) a TrxR. V játrech byla ovlivněna pouze aktivita NQO1, která byla působením brusinkového extraktu zvýšena u obézních i normálních myší. Na základě těchto výsledků byla stanovena proteinová a genová exprese NQO1. Zvýšení NQO1 na úrovni mRNA hladin bylo pozorováno u myší s navozenou obezitou. Toto zjištění je pro konzumenty brusinek a potravních doplňků s nimi příznivé, neboť se tím zvýší detoxikace chinonů a také ochrana před peroxidací lipidů. V tenkém střevě byla významně zvýšena aktivita CAT u obézních myší, kterým byl podáván extrakt z brusinek. Avšak žádná změna se neprojevila ani v koncentraci proteinu CAT, a ani hladina CAT mRNA nebyla ovlivněna.

Účinek brusinkového extraktu na aktivitu antioxidačních enzymů a redoxní rovnováhu byl výraznější u myší s navozenou obezitou.

Detaily o provedení a výsledcích studie jsou obsaženy v příloze VII.

5 ZÁVĚR

Předkládaná disertační práce byla zaměřena na studium účinků vybraných přírodních látek na biotransformační a antioxidační aparát buňky. Na základě vytyčených cílů mohou být dosažené výsledky shrnuty do následujících bodů:

- V modelovém systému izolovaných potkaních hepatocytů byla sledována časová závislost změny tří parametrů (aktivita, proteinová a genová exprese) tří biotransformačních enzymů. U jednotlivých parametrů byla odhalena velká variabilita v odezvě na působení induktoru i v jejím časovém průběhu.
- Účinky EGCG a extraktu zeleného čaje na aktivity biotransformačních enzymů byly studovány v proliferujících i diferencovaných Caco-2 buňkách. Mírná modulace byla pozorována pouze v případě GST (zvýšení aktivity) a COMT (snížení aktivity).
- Vybrané lineární a cyklické seskviterpeny výrazně snižovaly aktivitu CYP *in vitro* v lidských a potkaních mikrosomech. Nejvíce byly inhibovány isoformy CYP1A a CYP2B/3A, u kterých byla stanovena hodnota IC₅₀ a typ inhibice. V *in vivo* studii prováděné na myších byl pozorován účinek právě opačný, v jaterní i střevní tkáni byly zvýšeny nejen aktivity stanovovaných isoform CYP, ale i hladiny jejich mRNA.
- V další *in vivo* studii byly sledovány změny v aktivitě biotransformačních enzymů po jednorázovém podání vysoké dávky a po pravidelném podávání nižší dávky standardizovaného brusinkového extraktu potkanům. Zvýšení aktivity bylo pozorováno u CYP1A, CYP2B/3A, CBR1, UGT a GST. Ze získaných dat se však nedá předpokládat významná interakce se současně podanými léčivy.
- Z antioxidačních enzymů sledovaných u obézních a normálních myší po podání brusinkového extraktu byla ovlivněna pouze aktivita GST, NQO1 a CAT. Výraznější odezva pak byla zaznamenána u myší s navozenou obezitou.

6 PODÍL PŘEDKLADATELKY NA PUBLIKACÍCH ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI

- I. **Lněničková K.**, Skálová L., Stuchlíková Raisová L., Szotáková B., Matoušková P. The induction of xenobiotic-metabolizing enzymes in hepatocytes by beta-naphthoflavone: time-dependent changes in activities, protein and mRNA levels (Submitted in *Acta Pharmaceutica*)
- Příprava subcelulárních frakcí, stanovení enzymových aktivit, detekce proteinů metodou Western blot a stanovení hladin mRNA metodou kvantitativní RT PCR
 - Analýza dat
 - Podíl na přípravě publikace
- II. **Lněničková K.**, Procházková E., Skálová L., Matoušková P., Bártíková H., Souček P., Szotáková B. (2016): Catechins variously affect activities of conjugation enzymes in proliferating and differentiated Caco-2 cells. *Molecules*, 21 (9). DOI: 10.3390/molecules21091186. IF₂₀₁₆ = 2.861
- Příprava subcelulárních frakcí, stanovení enzymových aktivit, detekce proteinů metodou Western blot a stanovení hladin mRNA metodou kvantitativní RT PCR
 - Analýza dat
 - Zpracování publikace
- III. Špičáková A., Szotáková B., Dimunová D., Myslivečková Z., Kubíček V., Ambrož M., **Lněničková K.**, Krasulová K., Anzenbacher P., Skálová L. (2017): Nerolidol and farnesol inhibit some cytochrome P450 activities but did not affect other xenobiotic-metabolizing enzymes in rat and human hepatic subcellular fractions. *Molecules*. 22(4). DOI: 10.3390/molecules22040509. IF₂₀₁₆ = 2.861
- Podíl na stanovení enzymových aktivit
 - Podíl na analýze dat

- IV. Nguyen L. T., Szotáková B., Myslivečková Z., Špičáková A., **Lněničková K.**, Ambrož M., Kubíček V., Krasulová K., Anzenbacher P., Skálová L. The inhibitory effects of β -caryophyllene, β -caryophyllene oxide and α -humulene on the activities of the main drug-metabolizing enzymes in rat and human liver *in vitro* (submitted in *Chemico-Biological Interactions*)
- Podíl na stanovení enzymových aktivit
 - Podíl na analýze dat
- V. **Lněničková K.**, Svobodová H., Skálová L., Ambrož M., Novák F., Matoušková P. The impact of sesquiterpenes β -caryophyllene oxide and *trans*-nerolidol on biotransformation enzymes in mice *in vivo* (submitted in *Xenobiotica*)
- Podíl na stanovení enzymových aktivit, detekce proteinů metodou Western blot a stanovení hladin mRNA metodou kvantitativní RT PCR
 - Podíl na analýze dat
 - Podíl na přípravě publikace
- VI. Bártíková H., Boušová I., Jedličková P., **Lněničková K.**, Skálová L., Szotáková B. (2014): Effect of standardized cranberry extract on the activity and expression of selected biotransformation enzymes in rat liver and intestine. *Molecules*. 19, 14948-60. DOI: 10.3390/molecules190914948. IF₂₀₁₄ = 2.416
- Podíl na stanovení enzymových aktivit
 - Podíl na přípravě publikace
- VII. Boušová I., Bártíková H., Matoušková P., **Lněničková K.**, Zappe L., Valentová K., Szotáková B., Martin J., Skálová L. (2015): Cranberry extract-enriched diets increase NAD(P)H:quinone oxidoreductase and catalase activities in obese but not in nonobese mice. *Nutr Res*. 35, 901-9. DOI: 10.1016/j.nutres.2015.08.002. IF₂₀₁₅ = 2.523
- Podíl na přípravě publikace

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Anhe F. F., Roy D., Pilon G., Dudonne S., Matamoros S., Varin T. V., Garofalo C., Moine Q., Desjardins Y., Levy E., Marette A. (2015): A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*. **64**, 872-883.
- Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci*. **58**, 737-747.
- Aoyama N., Tsunoda M., Imai K. (2005): Improved assay for catechol-O-methyltransferase activity utilizing norepinephrine as an enzymatic substrate and reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A*. **1074**, 47-51.
- Atmaca A., Kleerekoper M., Bayraktar M., Kucuk O. (2008): Soy isoflavones in the management of postmenopausal osteoporosis. *Menopause*. **15**, 748-757.
- Bankova V., Boudourova-Krasteva G., Sforcin J. M., Frete X., Kujungiev A., Maimoni-Rodella R., Popov S. (1999): Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from Sao Paulo state. *Z Naturforsch C*. **54**, 401-405.
- Bartikova H., Hanusova V., Skalova L., Ambroz M., Bousova I. (2014): Antioxidant, Pro-Oxidant and Other Biological Activities of Sesquiterpenes. *Curr Top Med Chem*. **14**, 2478-2494.
- Birben E., Sahiner U. M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012): Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. **5**, 9-19.
- Bonilla M., Denicola A., Novoselov S. V., Turanov A. A., Protasio A., Izmendi D., Gladyshev V. N., Salinas G. (2008): Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. *Journal of Biological Chemistry*. **283**, 17898-17907.
- Brauze D., Zawierucha P., Kiwerska K., Bednarek K., Oleszak M., Rydzanicz M., Jarmuz-Szymczak M. (2017): Induction of expression of aryl hydrocarbon receptor-dependent genes in human HepaRG cell line modified by shRNA and treated with beta-naphthoflavone. *Mol Cell Biochem*. **425**, 59-75.
- Bravo L. (1998): Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. **56**, 317-333.

- Breitmaier E. (2006): Terpenes: Importance, General Structure, and Biosynthesis. In: *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Briellmann H. L. (1999): Phytochemicals: the chemical components of plants. In: *Natural Products of Plants*. Kaufman PB, Cseke LJ, Warber S, Duke JA, Briellmann HL, eds. New York: CRC Press. 1-36.
- Brigelius-Flohe R., Maiorino M. (2013): Glutathione peroxidases. *Bba-Gen Subjects*. **1830**, 3289-3303.
- Carlberg I., Mannervik B. (1985): Glutathione-Reductase. *Methods in Enzymology*. **113**, 484-490.
- Compton S. J., Jones C. G. (1985): Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem*. **151**, 369-374.
- Couto N., Wood J., Barber J. (2016): The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med*. **95**, 27-42.
- Crozier A., Clifford M. N., Jaganath I. B. (2006): Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. In: *Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Crozier A, Clifford MN, Ashihara H, eds. Singapore: Blackwell Publishing Ltd. 1-24.
- Cullen J. J., Hinkhouse M. M., Grady M., Gaut A. W., Liu J., Zhang Y. P., Weydert C. J., Domann F. E., Oberley L. W. (2003): Dicumarol inhibition of NADPH:quinone oxidoreductase induces growth inhibition of pancreatic cancer via a superoxide-mediated mechanism. *Cancer Research*. **63**, 5513-5520.
- Dao C. A., Patel K. D., Neto C. C. (2012): Phytochemicals from the Fruit and Foliage of Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) - Potential Benefits for Human Health. *Emerging Trends in Dietary Components for Preventing and Combating Disease*. **1093**, 79-+.
- Dean M., Hamon Y., Chimini G. (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*. **42**, 1007-1017.
- Elbarbry F., Attia A., Shoker A. (2009): Validation of a new HPLC method for determination of midazolam and its metabolites: Application to determine its pharmacokinetics in human and measure hepatic CYP3A activity in rabbits. *J Pharmaceut Biomed*. **50**, 987-993.
- Flohe L., Gunzler W. A. (1984): Assays of Glutathione-Peroxidase. *Methods in Enzymology*. **105**, 114-121.

- Formica J. V., Regelson W. (1995): Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* **33**, 1061-1080.
- Frame L. T., Ozawa S., Nowell S. A., Chou H. C., DeLongchamp R. R., Doerge D. R., Lang N. P., Kadlubar F. F. (2000): A simple colorimetric assay for phenotyping the major human thermostable phenol sulfotransferase (SULT1A1) using platelet cytosols. *Drug Metab Dispos.* **28**, 1063-1068.
- Fugh-Berman A. (2000): Herb-drug interactions. *Lancet.* **355**, 134-138.
- Gao J., Xie W. (2010): Pregnane X receptor and constitutive androstane receptor at the crossroads of drug metabolism and energy metabolism. *Drug Metab Dispos.* **38**, 2091-2095.
- Garcia-Lafuente A., Guillamon E., Villares A., Rostagno M. A., Martinez J. A. (2009): Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res.* **58**, 537-552.
- Gibson G. G., Skett P. (2001). Introduction to Drug Metabolism. United Kingdom: Nelson Thornes Publishers.
- Giguere V. (1999): Orphan nuclear receptors: From gene to function. *Endocr Rev.* **20**, 689-725.
- Gonzalez-Covarrubias V., Ghosh D., Lakhman S. S., Pendyala L., Blanco J. G. (2007): A functional genetic polymorphism on human carbonyl reductase 1 (CBR1 V88I) impacts on catalytic activity and NADPH binding affinity. *Drug Metab Dispos.* **35**, 973-980.
- Goth L. (1991): A Simple Method for Determination of Serum Catalase Activity and Revision of Reference Range. *Clin Chim Acta.* **196**, 143-151.
- Grassmann J. (2005): Terpenoids as plant antioxidants. *Vitam Horm.* **72**, 505-535.
- Handschin C., Meyer U. A. (2003): Induction of drug metabolism: The role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* **55**, 649-673.
- Handy D. E., Lubos E., Yang Y., Galbraith J. D., Kelly N., Zhang Y. Y., Leopold J. A., Loscalzo J. (2009): Glutathione Peroxidase-1 Regulates Mitochondrial Function to Modulate Redox-dependent Cellular Responses. *Journal of Biological Chemistry.* **284**, 11913-11921.
- Hao X., Yuan J., Xu Y., Wang Z., Hou J., Hu T. (2017): In vitro inhibitory effects of pristimerin on human liver cytochrome P450 enzymes. *Xenobiotica.* 1-16.

- He W., Wu J. J., Ning J., Hou J., Xin H., He Y. Q., Ge G. B., Xu W. (2015): Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by licochalcone A, a naturally occurring constituent of licorice. *Toxicology in Vitro*. **29**, 1569-1576.
- Higgins L. G., Hayes J. D. (2011): Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. *Drug Metabolism Reviews*. **43**, 92-137.
- Hsieh M. H., Chan P., Sue Y. M., Liu J. C., Liang T. H., Huang T. Y., Tomlinson B., Sum M. S., Kao P. F., Chen Y. J. (2003): Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with mild essential hypertension: A two-year, randomized, placebo-controlled study. *Clin Ther*. **25**, 2797-2808.
- Huang S.-M., Stifano T. (2006): Guidance for Industry: Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling. *Draft Guidance*.
- Humphrey A. J., Beale M. H. (2006): Terpenes. In: *Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Crozier A, Clifford MN, Ashihara H, eds. Singapore: Blackwell Publishing Ltd. 47-101.
- Chan P., Xu D. Y., Liu J. C., Chen Y. J., Tomlinson B., Huang W. P., Cheng J. T. (1998): The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*. **63**, 1679-1684.
- Chapman E., Best M. D., Hanson S. R., Wong C. H. (2004): Sulfotransferases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew Chem Int Ed Engl*. **43**, 3526-3548.
- Chen D., Wang C. Y., Lambert J. D., Ai N., Welsh W. J., Yang C. S. (2005): Inhibition of human liver catechol-O-methyltransferase by tea catechins and their metabolites: structure-activity relationship and molecular-modeling studies. *Biochem Pharmacol*. **69**, 1523-1531.
- Cheng A. X., Lou Y. G., Mao Y. B., Lu S., Wang L. J., Chen X. Y. (2007): Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. *J Integr Plant Biol*. **49**, 179-186.
- Chow H. H., Hakim I. A., Vining D. R., Crowell J. A., Tome M. E., Ranger-Moore J., Cordova C. A., Mikhael D. M., Briehl M. M., Alberts D. S. (2007): Modulation of human glutathione s-transferases by polyphenon e intervention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **16**, 1662-1666.
- Jancova P., Anzenbacher P., Anzenbacherova E. (2010): Phase II Drug Metabolizing Enzymes. *Biomed Pap*. **154**, 103-116.

- Kanwal R., Pandey M., Bhaskaran N., Maclennan G. T., Fu P., Ponsky L. E., Gupta S. (2014): Protection against oxidative DNA damage and stress in human prostate by glutathione S-transferase P1. *Mol Carcinog.* **53**, 8-18.
- Khan N., Afaq F., Saleem M., Ahmad N., Mukhtar H. (2006): Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res.* **66**, 2500-2505.
- Khan N., Mukhtar H. (2013): Tea and health: studies in humans. *Curr Pharm Des.* **19**, 6141-6147.
- Kim J. S., Kim J. M., O J. J., Jeon B. S. (2010): Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression and cell death by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a green tea catechin, in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *J Clin Neurosci.* **17**, 1165-1168.
- Kuntz A. N., Davioud-Charvet E., Sayed A. A., Califf L. L., Dessolin J., Arner E. S. J., Williams D. L. (2007): Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: An essential parasite enzyme and a key drug target (vol 4, art no e206, 2007). *Plos Med.* **4**, 1418-1418.
- Lago J. H., Toledo-Arruda A. C., Mernak M., Barrosa K. H., Martins M. A., Tiberio I. F., Prado C. M. (2014): Structure-activity association of flavonoids in lung diseases. *Molecules.* **19**, 3570-3595.
- Lachman H. M., Papolos D. F., Saito T., Yu Y. M., Szumlanski C. L., Weinshilboum R. M. (1996): Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: Description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics.* **6**, 243-250.
- Lambert J. D., Sang S., Yang C. S. (2007): Biotransformation of green tea polyphenols and the biological activities of those metabolites. *Mol Pharm.* **4**, 819-825.
- Leon-Gonzalez A. J., Auger C., Schini-Kerth V. B. (2015): Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem Pharmacol.* **98**, 371-380.
- Letelier M. E., Pimentel A., Pino P., Lepe A. M., Faundez M., Aracena P., Speisky H. (2005): Microsomal UDP-glucuronyltransferase in rat liver: oxidative activation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **96**, 480-486.
- Livak K. J., Schmittgen T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* **25**, 402-408.

- Lu L. L., Qiang M., Li F. L., Zhang H. J., Zhang S. W. (2014): Theoretical investigation on the antioxidative activity of anthocyanidins: A DFT/B3LYP study. *Dyes Pigments*. **103**, 175-182.
- Ma Q., Lu A. Y. (2007): CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug Metab Dispos*. **35**, 1009-1016.
- Malatkova P., Wsol V. (2014): Carbonyl reduction pathways in drug metabolism. *Drug Metab Rev*. **46**, 96-123.
- Maliakal P. P., Coville P. F., Wanwimolruk S. (2001): Tea consumption modulates hepatic drug metabolizing enzymes in Wistar rats. *J Pharm Pharmacol*. **53**, 569-577.
- Margis R., Dunand C., Teixeira F. K., Margis-Pinheiro M. (2008): Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *Febs J*. **275**, 3959-3970.
- Mate L., Virkel G., Lifschitz A., Ballent M., Lanusse C. (2008): Hepatic and extra-hepatic metabolic pathways involved in flubendazole biotransformation in sheep. *Biochem Pharmacol*. **76**, 773-783.
- Mates J. M., Perez-Gomez C., De Castro I. N. (1999): Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. **32**, 595-603.
- Matoušková P., Bártíková H., Boušová I., Szotáková B., Martin J., Skorkovská J., Hanušová V., Tománková V., Anzenbacherová E., Lišková B., Anzenbacher P., Skálová L. (2014): Effect of defined green tea extract in various dosage schemes on drug-metabolizing enzymes in mice in vivo. [10.1016/j.jff.2014.06.026](https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.06.026). *J Funct Foods*. **10**, 327-335.
- Matsunaga T., Shintani S., Hara A. (2006): Multiplicity of mammalian Reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug Metab Pharmacok*. **21**, 1-18.
- Medeiros R., Passos G. F., Vitor C. E., Koepp J., Mazzuco T. L., Pianowski L. F., Campos M. M., Calixto J. B. (2007): Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *Br J Pharmacol*. **151**, 618-627.
- Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. (2014): Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*. **19**, 16240-16265.
- Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J. (1994): Importance of Se-Glutathione Peroxidase, Catalase, and Cu/Zn-Sod for Cell-Survival against Oxidative Stress. *Free Radical Bio Med*. **17**, 235-248.

- Misaka S., Kawabe K., Onoue S., Werba J. P., Giroli M., Tamaki S., Kan T., Kimura J., Watanabe H., Yamada S. (2013): Effects of Green Tea Catechins on Cytochrome P450 2B6, 2C8, 2C19, 2D6 and 3A Activities in Human Liver and Intestinal Microsomes. *Drug Metab Pharmacok.* **28**, 244-249.
- Moon P. D., Kim H. M. (2012): Antiinflammatory Effects of Traditional Korean Medicine, JinPi-tang and Its Active Ingredient, Hesperidin in HaCaT cells. *Phytotherapy Research.* **26**, 657-662.
- Moore L. B., Goodwin B., Jones S. A., Wisely G. B., Serabjit-Singh C. J., Willson T. M., Collins J. L., Kliewer S. A. (2000): St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 7500-7502.
- Murray I. A., Patterson A. D., Perdew G. H. (2014): Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat Rev Cancer.* **14**, 801-814.
- Nicolle E., Souard F., Faure P., Boumendjel A. (2011): Flavonoids as Promising Lead Compounds in Type 2 Diabetes Mellitus: Molecules of Interest and Structure-Activity Relationship. *Curr Med Chem.* **18**, 2661-2672.
- Ohara H., Miyabe Y., Deyashiki Y., Matsuura K., Hara A. (1995): Reduction of Drug Ketones by Dihydrodiol Dehydrogenases, Carbonyl Reductase and Aldehyde Reductase of Human Liver. *Biochemical Pharmacology.* **50**, 221-227.
- Paduch R., Kandefer-Szerszen M., Trytek M., Fiedurek J. (2007): Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch Immunol Ther Ex.* **55**, 315-327.
- Palermo C. M., Westlake C. A., Gasiewicz T. A. (2005): Epigallocatechin gallate inhibits aryl hydrocarbon receptor gene transcription through an indirect mechanism involving binding to a 90 kDa heat shock protein. *Biochemistry-US.* **44**, 5041-5052.
- Pandey M., Shukla S., Gupta S. (2010): Promoter demethylation and chromatin remodeling by green tea polyphenols leads to re-expression of GSTP1 in human prostate cancer cells. *Int J Cancer.* **126**, 2520-2533.
- Parkinson A., (2001): Biotransformation of xenobiotics. In: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. Klaassen CD, ed. New York: McGraw-Hill. 133-224.
- Pisoschi A. M., Pop A. (2015): The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry.* **97**, 55-74.
- Popa O., Babeanu N. E., Popa I., Nita S., Dinu-Parvu C. E. (2015): Methods for obtaining and determination of squalene from natural sources. *Biomed Res Int.* **2015**, 367202.

- Price R. J., Surry D., Renwick A. B., Meneses-Lorente G., Lake B. G., Evans D. C. (2000): CYP isoform induction screening in 96-well plates: use of 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin as a substrate for studies with rat hepatocytes. *Xenobiotica*. **30**, 781-795.
- Prochazkova D., Bousova I., Wilhelmova N. (2011): Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. **82**, 513-523.
- Rad A. M., Ghourchian H., Moosavi-Movahedi A. A., Hong J., Nazari K. (2007): Spectrophotometric assay for horseradish peroxidase activity based on pyrocatechol-aniline coupling hydrogen donor. *Anal Biochem*. **362**, 38-43.
- Ravishankar D., Rajora A. K., Greco F., Osborn H. M. (2013): Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. **45**, 2821-2831.
- Richert L., Tuschl G., Abadie C., Blanchard N., Pekthong D., Manton G., Weber J. C., Mueller S. O. (2009): Use of mRNA expression to detect the induction of drug metabolising enzymes in rat and human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **235**, 86-96.
- Romano B., Pagano E., Montanaro V., Fortunato A. L., Milic N., Borrelli F. (2013): Novel insights into the pharmacology of flavonoids. *Phytother Res*. **27**, 1588-1596.
- Salminen A., Lehtonen M., Suuronen T., Kaarniranta K., Huuskonen J. (2008): Terpenoids: natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell Mol Life Sci*. **65**, 2979-2999.
- Sangeetha K. S. S., Umamaheswari S., Reddy C. U. M., Kalkura S. N. (2016): Flavonoids: Therapeutic Potential of Natural Pharmacological Agents. *Int J Pharm Sci Res*. **7**, 3924-3930.
- Satsu H., Hiura Y., Mochizuki K., Hamada M., Shimizu M. (2008): Activation of pregnane X receptor and induction of MDR1 by dietary phytochemicals. *J Agric Food Chem*. **56**, 5366-5373.
- Shi Y. (2007): Orphan nuclear receptors in drug discovery. *Drug Discov Today*. **12**, 440-445.
- 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. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. **150**, 76-85.
- Sutherland B. A., Rahman R. M., Appleton I. (2006): Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *J Nutr Biochem*. **17**, 291-306.

- Tapas A. R., Sakarkar D. M., Kakde R. B. (2008): Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop J Pharm Res.* **7**, 1089-1099.
- Teng Y. N., Hsieh Y. W., Hung C. C., Lin H. Y. (2015): Demethoxycurcumin modulates human P-glycoprotein function via uncompetitive inhibition of ATPase hydrolysis activity. *J Agric Food Chem.* **63**, 847-855.
- Testa B., Mayer J. M., (2003). Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism — Chemistry, Biochemistry and Enzymology. Zurich: Wiley-VHCA.
- Tholl D. (2015): Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* **148**, 63-106.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979): Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. *P Natl Acad Sci USA.* **76**, 4350-4354.
- Vasak M. (2005): Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Bio.* **19**, 13-17.
- Vasiliou V., Ross D., Nebert D. W. (2006): Update of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO) gene family. *Hum Genomics.* **2**, 329-335.
- Wallace T. C., Giusti M. M. (2015): Anthocyanins. *Adv Nutr.* **6**, 620-622.
- Winkel-Shirley B. (2001): Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* **126**, 485-493.
- Wollgast J., Anklam E. (2000): Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res Int.* **33**, 423-447.
- Xu C. J., Li C. Y. T., Kong A. N. T. (2005): Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res.* **28**, 249-268.
- Yang H., Wang H. (2014): Signaling control of the constitutive androstane receptor (CAR). *Protein Cell.* **5**, 113-123.
- Yang H. Y., Lee T. H. (2015): Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review. *Bmb Rep.* **48**, 200-208.

Ye L., Zhang Y. (2001): Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis*. **22**, 1987-1992.

8 PŘÍLOHY

8.1 PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU DISERTAČNÍ PRÁCE

- I. **Lněničková K.**, Skálová L., Stuchlíková Raisová L., Szotáková B., Matoušková P. The induction of xenobiotic-metabolizing enzymes in hepatocytes by beta-naphthoflavone: time-dependent changes in activities, protein and mRNA levels (Submitted in Acta Pharmaceutica)
- II. **Lněničková K.**, Procházková E., Skálová L., Matoušková P., Bártíková H., Souček P., Szotáková B. (2016): Catechins Variously Affect Activities of Conjugation Enzymes in Proliferating and Differentiated Caco-2 Cells. *Molecules*, 21 (9). DOI: 10.3390/molecules21091186. IF₂₀₁₆ = 2.861
- III. Špičáková A., Szotáková B., Dimunová D., Myslivečková Z., Kubíček V., Ambrož M., **Lněničková K.**, Krasulová K., Anzenbacher P., Skálová L. (2017): Nerolidol and Farnesol Inhibit Some Cytochrome P450 Activities but Did Not Affect Other Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Rat and Human Hepatic Subcellular Fractions. *Molecules*. 22(4). DOI: 10.3390/molecules22040509. IF₂₀₁₆ = 2.861
- IV. Nguyen L. T., Szotáková B., Myslivečková Z., Špičáková A., **Lněničková K.**, Ambrož M., Kubíček V., Krasulová K., Anzenbacher P., Skálová L. The inhibitory effects of β -caryophyllene, β -caryophyllene oxide and α -humulene on the activities of the main drug-metabolizing enzymes in rat and human liver *in vitro* (submitted in Chemico-Biological Interactions)
- V. **Lněničková K.**, Svobodová H., Skálová L., Ambrož M., Novák F., Matoušková P. The impact of sesquiterpenes β -caryophyllene oxide and *trans*-nerolidol on biotransformation enzymes in mice *in vivo* (submitted in Xenobiotica)
- VI. Bártíková H., Boušová I., Jedličková P., **Lněničková K.**, Skálová L., Szotáková B. (2014): Effect of standardized cranberry extract on the activity and expression of selected biotransformation enzymes in rat liver and intestine. *Molecules*. 19, 14948-60. DOI: 10.3390/molecules190914948. IF₂₀₁₄ = 2.416

- VII. Boušová I., Bártíková H., Matoušková P., **Lněničková K.**, Zappe L., Valentová K., Szotáková B., Martin J., Skálová L. (2015): Cranberry extract-enriched diets increase NAD(P)H:quinone oxidoreductase and catalase activities in obese but not in nonobese mice. *Nutr Res.* 35, 901-9. DOI: 10.1016/j.nutres.2015.08.002. IF₂₀₁₅ = 2.523

8.1.1 **Publikace I**

- I. **Lněničková K.**, Skálová L., Stuchlíková Raisová L., Szotáková B., Matoušková P. The induction of xenobiotic-metabolizing enzymes in hepatocytes by beta-naphthoflavone: time-dependent changes in activities, protein and mRNA levels (Submitted in Acta Pharmaceutica)

8.1.2 Publikace II

- II. **Lněničková K.**, Procházková E., Skálová L., Matoušková P., Bártíková H., Souček P., Szotáková B. (2016): Catechins variously affect activities of conjugation enzymes in proliferating and differentiated Caco-2 cells. *Molecules*, 21 (9). DOI: 10.3390/molecules21091186. IF₂₀₁₆ = 2.861

8.1.3 Publikace III

- III. Špičáková A., Szotáková B., Dimunová D., Myslivečková Z., Kubíček V., Ambrož M., **Lněničková K.**, Krasulová K., Anzenbacher P., Skálová L. (2017): Nerolidol and farnesol inhibit some cytochrome P450 activities but did not affect other xenobiotic-metabolizing enzymes in rat and human hepatic subcellular fractions. *Molecules*. 22(4). DOI: 10.3390/molecules22040509. IF₂₀₁₆ = 2.861

8.1.4 Publikace IV

- IV. Nguyen L. T., Szotáková B., Myslivečková Z., Špičáková A., **Lněničková K.**, Ambrož M., Kubíček V., Krasulová K., Anzenbacher P., Skálová L. The inhibitory effects of β -caryophyllene, β -caryophyllene oxide and α -humulene on the activities of the main drug-metabolizing enzymes in rat and human liver *in vitro* (submitted in Chemico-Biological Interactions)

8.1.5 Publikace V

- V. **Lněničková K.**, Svobodová H., Skálová L., Ambrož M., Novák F., Matoušková P. The impact of sesquiterpenes β -caryophyllene oxide and *trans*-nerolidol on biotransformation enzymes in mice *in vivo* (submitted in *Xenobiotica*)

8.1.6 Publikace VI

- VI. Bártíková H., Boušová I., Jedličková P., **Lněničková K.**, Skálová L., Szotáková B. (2014): Effect of standardized cranberry extract on the activity and expression of selected biotransformation enzymes in rat liver and intestine. *Molecules*. 19, 14948-60. DOI: 10.3390/molecules190914948. IF₂₀₁₄ = 2.416

8.1.7 **Publikace VII**

- VII. Boušová I., Bártíková H., Matoušková P., **Lněničková K.**, Zappe L., Valentová K., Szotáková B., Martin J., Skálová L. (2015): Cranberry extract-enriched diets increase NAD(P)H:quinone oxidoreductase and catalase activities in obese but not in nonobese mice. *Nutr Res.* 35, 901-9. DOI: 10.1016/j.nutres.2015.08.002. IF₂₀₁₅ = 2.523

8.2 PREZENTACE NA KONFERENCÍCH

Lněničková K., Pokorná P., Szotáková B., *In vitro* effect of anthocyanins and catechins on activity of selected biotransformation enzymes in intestinal cell lines. 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX Meeting 19.-23.10.2014 San Francisco, Californie, USA; sborník abstraktů str. 79

Lněničková K., Skálová L., Bártíková H., Matoušková P., Szotáková B., Effect of prenylated flavonoids on biotransformation enzymes in Caco-2 cell line., Bioactive Natural Products: Translating Promise into Practice, 11.-13.7.2016 St. Catherine College, Oxford, UK; P10

Lněničková K., Szotáková B., Skálová L., Bártíková H., Pakostová A., The activities of conjugation enzymes in proliferating and differentiated Caco-2 cell line., XXVIII. Xenobiochemické symposium, 17. - 19.6.2015 Kremnica, Slovenská republika, sborník abstraktů str. 33

Lněničková K., Matoušková P., Skálová L., Szotáková B., Srovnání vlivu β -naftoflavonu na aktivitu, koncentraci proteinů a hladinu mRNA biotransformačních enzymů., XXV. Biochemický sjezd, 13. – 16. 9. 2016 Praha, Česká republika, sborník abstraktů str. 211

Lněničková K., Svobodová H., Skálová L., Ambrož M., Matoušková P., Szotáková B., β -caryophyllene oxide and *trans*-nerolidol induce cytochrome P450 in mouse small intestine *in vivo*. XXIX. Xenobiochemické symposium, 24.-26.5.2017 Telč, Česká republika, sborník abstraktů str. 42

Lněničková K., Szotáková B., The effect of catechins on selected biotransformation enzymes. 5. Postgraduální a 3. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, 3. a 4. 2. 2015, Hradec Králové, Česká republika

Lněničková K., Matoušková P., Skálová L., Szotáková B., Beta-naphthoflavone induction: activities, protein and RNA levels of drug metabolizing enzymes. 6.

Postgraduální a 4. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, 9. a 10. 2. 2016, Hradec Králové, Česká republika, sborník abstraktů str. 85

Lněničková K., Matoušková P., Skálová L., Bártíková H., Szotáková B., Modulation of activity and RNA levels of conjugation enzymes by prenylated flavonoids. 7. Postgraduální a 5. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, 7. a 8. 2. 2017, Hradec Králové, Česká republika, sborník abstraktů str. 94

8.3 SEZNAM ZKRATEK

ABC transportéry	„ATP-binding cassette transporters“
AGE částice	„advanced glycation end products“
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky
AKR	aldo-ketoreduktasy
ARNT	„AhR nuclear translocator“
ATP	adenosintrifosfát
BROD	benzyloxyresorufin <i>O</i> -dearylasa
BCA	bicinchoninová kyselina
BNF	β -naftoflavon
Caco-2	buněčná linie odvozená od lidského epiteliálního kolorektálního adenokarcinomu
CAO	β -karyofylen oxid
CAP	β -karyofylen
CAT	katalasa
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CBR	karbonylreduktasa
CNER	<i>cis</i> -nerolidol
CoA	koenzym A
COMT	katechol- <i>O</i> -methyltransferasa
CYP	cytochrom P450
S-COMT	cytoplasmatická katechol- <i>O</i> -methyltransferasa
DMAPP	dimethylallyldifosfát
EC-SOD	extracelulární superoxiddismutasa
EGCG	(-)-epigallokatechin-3-gallát
EROD	7-ethoxyresorufin <i>O</i> -deethylasa
FAD	flavinadenindinukleotid
FAR	farnesol
FDA	„Food and Drug Administration“, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FMO	flavinové monooxygenasy
FXR	farnesoidní X receptor
GABA	kyselina γ -aminomáselná

GPx	glutathionperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
GST	glutathion-S-transferasa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSP90	„heat shock protein“, proteiny teplotního šoku s molekulovou hmotností 90 kDa
HUM	α -humulen
IC ₅₀	koncentrace inhibitoru, která způsobí 50%-ní pokles aktivity enzymu
IPP	isopentenyldifosfát
LXR	játerní X receptor
MB-COMT	membránově vázaná katechol- <i>O</i> -methyltransferasa
MDR	„multidrug resistance protein“
MRP	„multidrug resistance associated protein“
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
M-SOD	mitochondriální superoxiddismutasa
NADH	nikotinamidadeninukleotid
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NK buňky	buňky označované jako přirození zabíječi („nature killer“)
NQO1	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1
OATP1	polypeptid transportující organické aniony 1
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PCR	„Polymerase Chain Reaction“; polymerázová řetězová reakce
PPAR	receptor aktivovaný proliferátory peroxisomů
Px	peroxidasy
PXR	pregnanový X receptor
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
RXR	retinoidní X receptor
SAM	S-adenosylmethionin
SDR	reduktasy/dehydrogenasy s krátkým řetězcem

SOD	superoxiddismutasa
SULT	sulfotransferasa
TNB	5'-thionitrobenzoová kyselina
TNER	<i>trans</i> -nerolidol
TrxR	thioredoxinreduktasa
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa
UV	„Ultraviolet“; ultrafialové záření
XAP2	„X-associated protein 2“
XME	enzymy metabolizující xenobiotika
XRE	xenobiotický responsivní element