

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vliv palmatinu na expresi cytochromů P450 1A

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Denisa Gerhardová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Vrba, Ph.D.
Rok:	2014

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne.....

.....

Bc. Denisa Gerhardová

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce Mgr. Jiřímu Vrbovi, Ph.D. za odborné vedení práce, rady i připomínky během celého jejího zpracování.

Zaměstnancům Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP Olomouc děkuji za poskytnutí izolovaných lidských hepatocytů.

Vznik diplomové práce byl finančně podpořen Vnitřním grantem Univerzity Palackého č. LF_2013_008 „Biologická aktivita přírodních látek – molekulární cíle“.

Poděkování patří také mé rodině a příteli za trpělivost a morální i finanční podporu během studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Denisa Gerhardová
Název práce	Vliv palmatinu na expresi cytochromů P450 1A
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Vrba, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014

Abstrakt

Palmatin je kvartérní protoberberinový alkaloid, který se vyskytuje např. v rostlinách *Coptis chinensis* a *Corydalis yanhusuo*, používaných v tradiční čínské medicíně zejména díky svým hepatoprotektivním, antidiabetickým a analgetickým vlastnostem. Tato práce se zabývá studiem vlivu palmatinu na aktivitu aryluhlovodíkového receptoru (AhR) a expresi cytochromů P450 1A1 a 1A2 (CYP1A1 a CYP1A2) v lidské hepatomové linii HepG2 a primárních kulturách lidských hepatocytů. Kolorimetrickým testem MTT bylo ověřeno, že palmatin není cytotoxický k buňkám HepG2 ani k lidským hepatocytům. Pouze při nejvyšší testované koncentraci palmatinu $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ byl zaznamenán pokles viability buněk HepG2 na 92 %. Prostřednictvím exprese reportérového genu bylo zjištěno, že palmatin aktivuje AhR a zvyšuje aktivitu promotoru genu *CYP1A1* v transfekovaných buňkách HepG2. V buňkách HepG2 byla po inkubaci s palmatinem detekována zvýšená hladina mRNA CYP1A1 i aktivita enzymu CYP1A1 ve srovnání s kontrolou. Zvýšení však nebylo tak výrazné jako u 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinu, nejsilnějšího aktivátoru AhR. V lidských hepatocytech palmatin způsobil pouze slabé zvýšení hladin mRNA CYP1A1 a CYP1A2, přičemž neovlivnil aktivitu enzymů CYP1A. Z provedené studie vyplývá, že palmatin v netoxických koncentracích aktivuje signální dráhu AhR, která vede ke zvýšené expresi CYP1A1 v buňkách HepG2, zatímco v primárních kulturách lidských hepatocytů je vliv palmatinu zanedbatelný.

Klíčová slova	palmatin, protoberberinové alkaloidy, aryluhlovodíkový receptor, cytochrom P40, CYP1A1, CYP1A2
Počet stran	67
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and Denisa Gerhardová

Surname

Title Effect of palmatine on the expression of cytochromes
P450 1A

Type of thesis Diploma

Department Department of medical chemistry and biochemistry,
LF UP Olomouc

Supervisor Mgr. Jiří Vrba, Ph.D.

The year of presentation 2014

Abstract

Palmatine is a quaternary protoberberine alkaloid, occurring in plants such as *Coptis chinensis* and *Corydalis yanhusuo* that are used in traditional Chinese medicine mainly due to its hepatoprotective, antidiabetic and analgesic properties. The aim of this thesis was to examine the effect of palmatine on the activity of aryl hydrocarbon receptor (AhR) and on the expression of cytochromes P450 1A1 and 1A2 (CYP1A1 and CYP1A2) in the human hepatoma HepG2 cells and primary cultures of human hepatocytes. The colorimetric MTT test confirmed that palmatine is non-cytotoxic to HepG2 cells and human hepatocytes. Only in concentration $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ palmatine caused decrease in viability of HepG2 cells to 92 %. Using the gene reporter assays we found that palmatine activates AhR and enhances promoter activity of *CYP1A1* gene in transfected HepG2 cells. In HepG2 cells, palmatine also significantly increased mRNA levels of CYP1A1 and activity of CYP1A1. However, the effect of palmatine was weaker than effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine, the most potent activator of AhR. In human hepatocytes palmatine caused only weak increase in CYP1A1 and CYP1A2 mRNA levels, while the enzyme activity of CYP1A1 remained unchanged. This study shows that palmatine at nontoxic concentrations activates AhR signaling pathway leading to an increased expression of CYP1A1 in HepG2 cells, whereas this effect is negligible in primary cultures of human

hepatocytes.

Keywords	palmatine, protoberberine alkaloids, aryl hydrocarbon receptor, cytochrome P450, CYP1A1, CYP1A2
Number of pages	67
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	Úvod	1
2	Alkaloidy	4
2.1	Protoberberinové alkaloidy	5
2.2	Biosyntéza protoberberinových alkaloidů	7
3	Zástupci protoberberinových alkaloidů	9
3.1	Palmatin	9
3.1.1	Biologická aktivita palmatinu	9
3.1.2	Absorpce a distribuce palmatinu	12
3.2	Berberin	13
3.3	Koptisin	14
3.4	Jatrorrhizin	15
3.5	Koralyn	16
3.6	Farmakologické využití protoberberinových alkaloidů	17
4	Cytochromy P450	20
4.1	Názvosloví cytochromů P450	21
4.2	Cytochromy P450 jako monooxygenasy	21
4.3	Biotransformace xenobiotik	22
4.4	Aryluhlovodíkový receptor	25
4.5	Cytochromy P450 1A	27
4.5.1	CYP1A1	27
4.5.2	CYP1A2	29
5	Materiál a chemikálie	32
5.1	Chemikálie	32
5.2	Roztoky	33
5.3	Přístroje	33
5.4	Studované látky	34
5.5	Biologický materiál	35
5.5.1	Buňky HepG2	35
5.5.2	Primární kultury lidských hepatocytů	35

6	Metody	36
6.1	Kultivace buněk HepG2	36
6.2	Kultivace lidských hepatocytů	36
6.3	MTT test	37
6.4	Exprese reportérového genu	38
6.5	Izolace celkové RNA ze vzorků	38
6.6	Stanovení koncentrace RNA	39
6.7	Reverzní transkripce (RT)	39
6.8	Kvantitativní real-time PCR	40
6.9	Gelová elektroforéza (SDS-PAGE), Western blot	40
6.10	EROD test	42
7	Výsledky	44
7.1	Vliv palmatinu na viabilitu buněk HepG2 a primárních kultur lidských hepatocytů	44
7.2	Vliv palmatinu na aktivitu AhR a transkripci CYP1A1 v transformovaných buňkách HepG245	
7.3	Vliv palmatinu na hladinu mRNA CYP1A u buněk HepG2 a primárních kultur lidských hepatocytů	46
7.4	Vliv palmatinu na enzymovou aktivitu a množství proteinu CYP1A v buňkách HepG2 a primárních kulturách lidských hepatocytů	53
8	Diskuze	56
9	Závěr	59
10	Literatura	60
11	Seznam použitých zkratk	66

Cíle práce

- 1) Vypracování přehledu informací o biologických účincích palmatinu
- 2) Porovnání cytotoxicity palmatinu v buňkách HepG2 a v primárních kulturách lidských hepatocytů
- 3) Studium vlivu palmatinu na expresi cytochromů P450 1A v buňkách HepG2
- 4) Studium vlivu palmatinu na expresi cytochromů P450 1A v primárních kulturách lidských hepatocytů

1 Úvod

Tato diplomová práce se zabývá studiem vlivu protoberberinového alkaloidu palmatinu na expresi cytochromů P450 1A (CYP1A). Palmatin a další protoberberinové alkaloidy, představují hlavní bioaktivní složky v extraktech z některých rostlin využívaných v tradiční čínské medicíně, např. *Coptis chinensis* a *Corydalis yanhusuo*. Produkty z těchto rostlin jsou dostupné bez lékařského předpisu a lidé je mohou kombinovat s jinými léky bez předchozí porady s lékařem (Khan *et al.*, 2013). Je tedy nutné studovat možné interakce (indukce či inhibice) přírodních látek s jinými léčivy a s enzymy metabolizujícími xenobiotika, zejména s cytochromy P450. Vliv palmatinu na aryluhlovodíkový receptor dosud nebyl zkoumán v lidských hepatomových buňkách ani v lidských hepatocytech. Jelikož berberin, alkaloid strukturně velmi podobný palmatinu, způsobuje aktivaci aryluhlovodíkového receptoru (AhR) v lidských hepatomových buňkách (Vrzal *et al.*, 2005), rozhodli jsme testovat, zda i palmatin způsobuje aktivaci AhR a ovlivňuje expresi CYP1A.

Cytochromy P450 (CYP) jsou monooxygenasy zapojené do metabolismu endogenních látek i xenobiotik, jako jsou léčiva nebo environmentální kontaminanty. Některé cytochromy P450 jsou zodpovědné za bioaktivaci určitých xenobiotik na mutagenní či karcinogenní látky způsobující chemickou karcinogenesi. Nejvýznamějšími enzymy zapojenými do chemické karcinogenese jsou CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1. Genová exprese cytochromů P450 1A je řízena prostřednictvím AhR. Jedná se o ligand-dependentní transkripční faktor zapojený v signální dráze metabolické aktivace prokarcinogenů na karcinogeny. Z toho důvodu může zvýšená exprese cytochromů P450 1A představovat rizikový faktor pro chemicky indukovanou karcinogenezi (Vrzal *et al.*, 2004). Mezi typické induktory AhR jsou řazeny polychlorované bifenyly (PCB), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a dioxiny (Veldhoen *et al.*, 2008).

Expese cytochromů P450 1A je studována ve dvou biologických systémech. Jedná se o lidskou hepatomovou linii HepG2 a primární kultury lidských hepatocytů. Jelikož by mohl být palmatin pro buňky cytotoxický, je testován jeho vliv na viabilitu buněk, a to v buněčné linii HepG2 a v primárních kulturách lidských hepatocytů pomocí MTT testu. Vliv palmatinu na aktivaci AhR a aktivaci genu *CYP1A1* je ověřován expresí reportérového genu v transfekovaných buňkách HepG2. Prostřednictvím real-time PCR

je sledována exprese CYP1A1 a CYP1A2 na úrovni mRNA. Pomocí western blotu je sledována exprese těchto enzymů na úrovni proteinu. Enzymatická aktivita CYP1A1 a CYP1A2 je měřena metodou EROD.

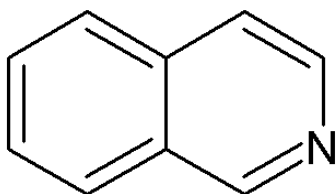
Teoretická část

2 Alkaloidy

Alkaloidy představují velmi rozsáhlou skupinu rostlinných sekundárních metabolitů s rozmanitou strukturou, biologickými vlastnostmi a distribucí v přírodě (Roberts a Wink, 1998). Zaujímají také významné místo v medicíně (Maiti a Kumar, 2007). Obecná definice alkaloidu byla navržena takto: „Alkaloid je cyklická sloučenina obsahující dusík v negativním oxidačním stavu, jehož distribuce je v živém organismu omezena.“ Tato definice zahrnuje jak alkaloidy obsahující dusík jako součást heterocyklického systému, tak alkaloidy obsahující exocyklický dusík (Roberts a Wink, 1998).

V rostlinách vytvářejí alkaloidy obranný systém proti patogenům a býložravcům, slouží jako atraktanty organismů užitečných pro rostlinu (např. opylovači), mají protektivní účinky vůči abiotickému stresu (UV záření) a regulují hospodaření s vodou a minerálními živinami. Člověkem jsou využívány v různých aplikacích jako barviva, vůně, koření, ochucovadla a léčiva (Briskin, 2000).

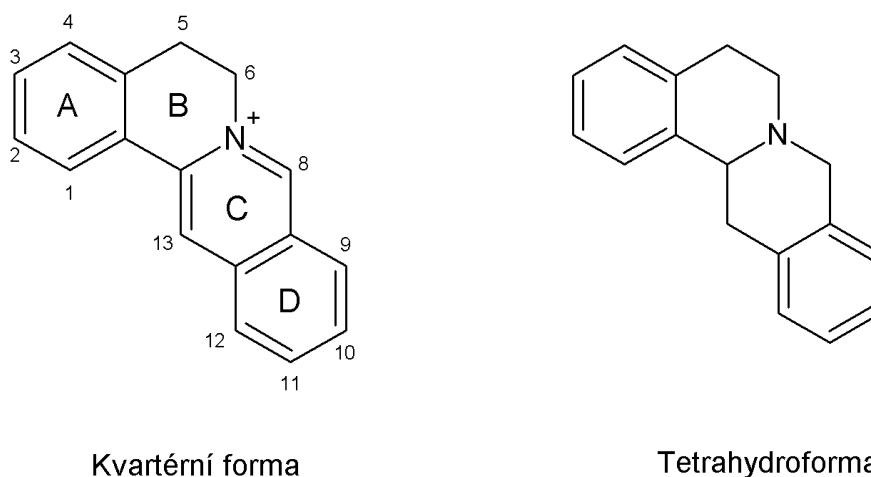
Jednu z největších a nejrozmanitějších skupin alkaloidů tvoří isochinolinové alkaloidy. Biogeneticky jsou odvozeny od aminokyseliny tyrosinu a mají přibližně 2500 definovaných struktur, jejichž společným znakem je heterocyklický isochinolinový skelet (Obr. 1) (Sato a Yamada, 2008). Isochinolinová kostra tvoří základní stavební prvek pro protoberberinové, benzyloisochinolinové, benzofenanthridinové, protopinové a mnohé další alkaloidy (Grycová *et al.*, 2007).



Obr. 1 Isochinolinový skelet, který tvoří základní kostru protoberberinových, benzyloisochinolinových, benzofenanthridinových a dalších alkaloidů.

2.1 Protoberberinové alkaloidy

Protoberberinové alkaloidy zaujímají relativně početnou skupinu alkaloidů s terapeutickým potenciálem, vyskytujících se ve dvou strukturních variantách, buď jako kvartérní sůl nebo jako tetrahydroforma (Obr. 2) (Grýcová et al., 2007). Chemicky představují třídu organických kationtů, jejichž reaktivita je dána citlivostí polární iminiové vazby $C=N^+$ k nukleofilnímu ataku, následovanému tvorbou aduktů se substituenty na uhlíku v poloze C-8 (Grycová *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2005).

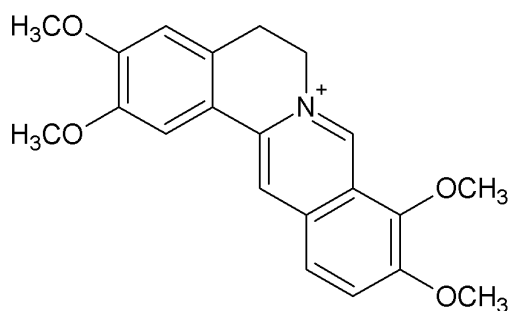


Obr. 2 Dvě strukturní varianty protoberberinových alkaloidů – kvartérní forma a tetrahydroforma.

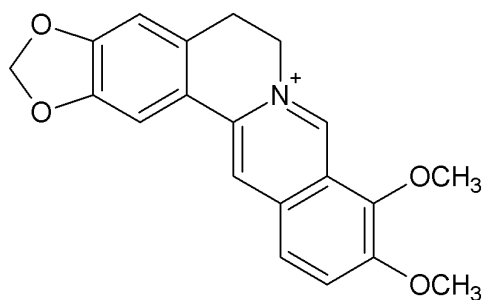
Mezi nejvýznamější protoberberinové alkaloidy je řazen berberin, palmatin a koptisin (Obr. 3). Strukturně jsou si tyto alkaloidy velmi podobné, mají tetracyklickou strukturu, liší se pouze v charakteru substituentů na benzenových jádrech. Palmatin je tetrasubstituovaný alkaloid se čtyřmi methoxy skupinami navázanými v poloze C-2, C-3, C-9 a C-10. Berberin má v poloze C-9 a C-10 také navázané methoxy skupiny, na benzenovém jádře A má však dioxolový kruh. Koptisin obsahuje ve své struktuře dva dioxolové kruhy navázané na benzenovém jádře A a D. Jelikož je ve struktuře palmatinu, berberinu i koptisinu benzenové jádro B částečně saturováno, dochází k mírné deformaci těchto molekul (Giri *et al.*, 2006a). Kvartérní amoniový kation a téměř planární struktura umožňují protoberberinovým alkaloidům vazbu k nukleofilním a anionickým skupinám aminokyselin v biomolekulách, enzimech a receptorech. Tyto

alkaloidy se mohou vázat např. k mikrotubulům, mohou inhibovat různé enzymy a interkalovat se do DNA (Schmeller *et al.*, 1997).

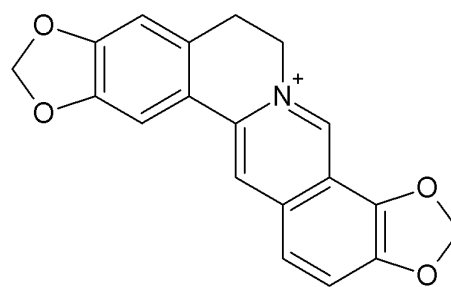
Vyskytují se v mnoha rostlinných čeledích, například *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Rutaceae* a *Berberidaceae* (Gao *et al.*, 2005) a vykazují celou řadu biologických a farmakologických účinků. Berberin má např. antimikrobiální, protizánětlivé a protirakovinné účinky, palmatin působí jako analgetikum a má antiarytmické, antimalarické a sedativní účinky (Shin *et al.*, 2000). Díky schopnosti interkalovat se do DNA byla u palmatinu i berberinu potvrzena cytotoxická aktivita proti řadě nádorových buněčných linií (Kettmann *et al.*, 2004).



Palmatin



Berberin



Koptisin

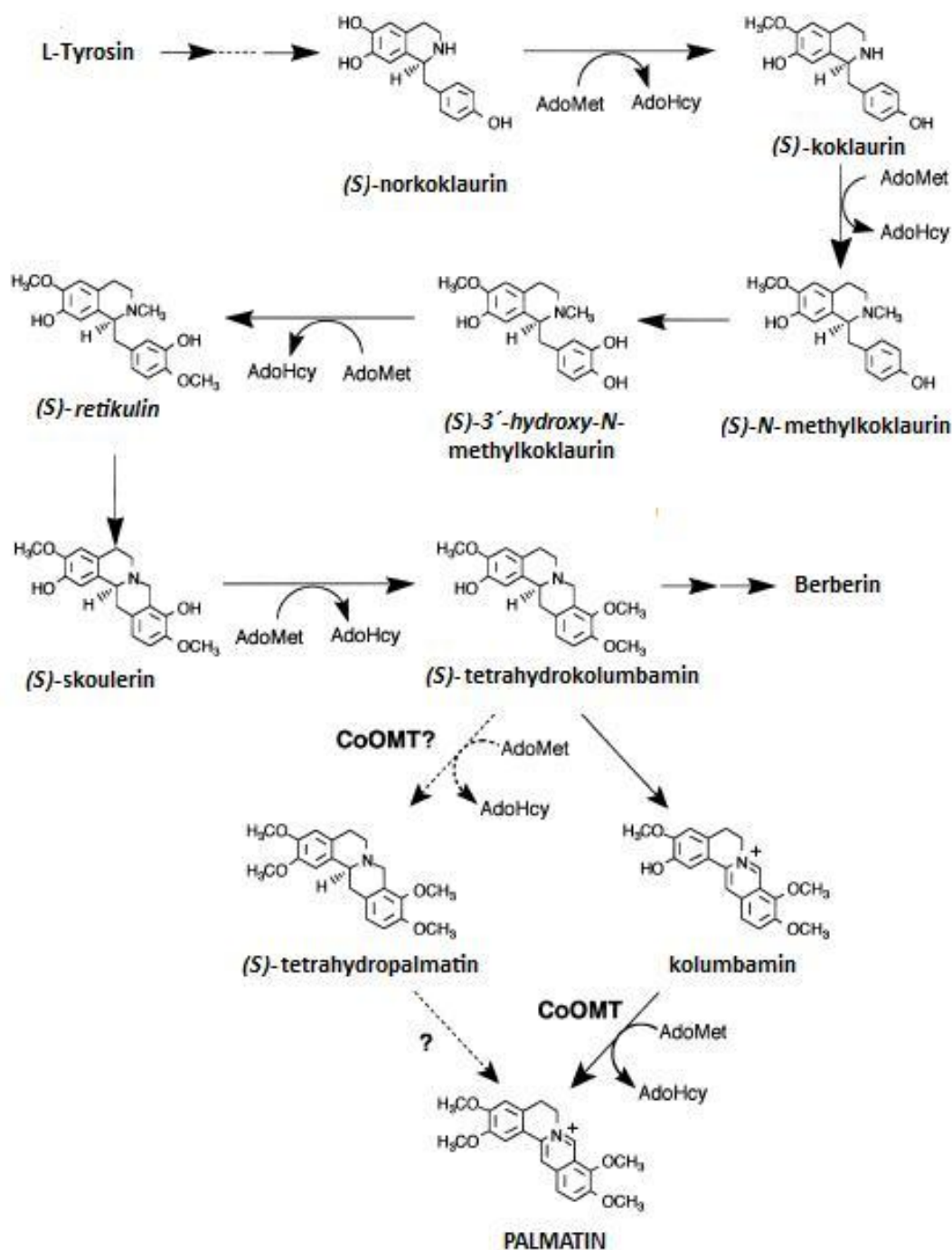
Obr. 3 Chemická struktura tří nejvýznamnější protoberberinových alkaloidů.

2.2 Biosyntéza protoberberinových alkaloidů

Biosyntéza isochinolinových alkaloidů začíná oxidací tyrosinu enzymem tyrosinhydroxylasou na dihydroxyfenylalanin. Tyrosin a dihydroxyfenylalanin jsou konvertovány na příslušné aminy – tyramin a dopamin (Facchini a De Luca, 1995). Následně dochází ke kondenzaci těchto dvou meziproductů enzymem norkoklaurinsynthasa za vzniku (*S*)-norkoklaurinu, centrálního prekursoru pro syntézu všech benzylisochinolinových alkaloidů (Samani a Facchini, 2002). Norkoklaurin je konvertován na koklaurin prostřednictvím enzymu (*S*)-adenosylmethionin:norkoklaurin-6-*O*-methyltransferasy. Přeměnou koklaurinu (*S*)-adenosylmethionin:koklaurin-*N*-methyltransferasou vzniká *N*-methylkoklaurin (Choi et al., 2002), který je transformován na 3'-hydroxy-*N*-methylkoklaurin enzymem hydroxylasa a nakonec na (*S*)-retikulin za katalytického působení (*S*)-adenosylmethionin:3'-hydroxy-*N*-methylkoklaurin-4'-*O*-methyltransferasy (Morishige et al., 2002). (*S*)-retikulin je centrálním meziproductem, který je dále výchozím krokem k syntéze mnoha druhů isochinolinových alkaloidů, jako jsou protoberberinové (palmatin, berberin), benzofenanthridinové (sanguinarin) nebo morfinanové alkaloidy (morfin, thebain).

Biosyntéza berberinu z (*S*)-retikulinu zahrnuje konverzi jeho *N*-methylové skupiny na methylenové můstky spojené s (*S*)-skoulerinem skrze působení enzymu retikulinoxidasa (Dittrich a Kuchan, 1991). Následuje přeměna (*S*)-skoulerinu na (*S*)-tetrahydrokolumbamin enzymem (*S*)-adenosylmethionin:skoulerin-9-*O*-methyltransferasa. (*S*)-tetrahydrokolumbamin je přeměňován enzymem P450:kanadinsynthetasa na tetrahydroberberin. Finalním krokem biosyntézy berberinu je přeměna tetrahydroberberinu na berberin enzymem (*S*)-tetrahydroberberinoxidasa (Sato a Kumagai, 2013).

Biosyntéza palmatinu (Obr. 4) se liší od biosyntézy berberinu ve způsobu přeměny meziproductu (*S*)-tetrahydrokolumbaminu. Tento krok může mít dvě cesty biosyntézy. První cestou dochází k syntéze kolumbaminu. Kolumbamin je biosyntetizován na palmatin enzymem (*S*)-adenosylmethionin:kolumbamin-*O*-methyltransferasou (CoOMT), který katalyzuje přenos *S*-methylové skupiny (*S*)-adenosylmethioninu na 2-hydroxylovou skupinu kolumbaminu za konečného vzniku palmatinu. Druhá cesta vede ke vzniku (*S*)-tetrahydropalmatinu. Mechanismus této dráhy však ještě není zcela objasněn (Morishige et al., 2002).



Obr. 4 Biosyntetická dráha palmatinu z aminokyseliny L-tyrosinu. L-tyrosin je řadou dílčích reakcí přeměňován na centrální meziprodukt *S*-tetrahydrokolumbamin, který je přeměňován na kolumbamin. Na kolumbamin je následně přenášena 2-hydroxylová skupina (*S*-adenosylmethioninu za katalytického působení enzymu (*S*-adenosylmethionin:kolumbamin-*O*-methyltransferasa (CoOMT) a vzniku palmatinu. Mechanismus biosyntetické dráhy palmatinu přes (*S*-tetrahydropalmatin není zcela objasněn (Převzato a upraveno podle Morishige *et al.*, 2002).

3 Zástupci protoberberinových alkaloidů

3.1 Palmatin

Palmatin ($C_{12}H_{22}O_4N^+$; 7,8,13,13a-tetrahydro-2,3,9,10-tetramethoxyberberinium) je kvartérní protoberberinový alkaloid, jehož krystaly mají sytě žluté zbarvení, je rozpustný ve vodě a jeho bod tání je roven hodnotě 221 °C (Bhadra a Kumar, 2011).

3.1.1 Biologická aktivita palmatinu

Již od pradávna je palmatin využíván v tradiční čínské, indické a korejské medicíně jako hlavní bioaktivní složka léčivých preparátů, např. *Rhizoma Coptidis*, *Rhizoma Corydalis*, *Radix Tinosporae* a *Cortex Phellodendri*. Časté užití je dáno jeho antipyretickým, antifotooxidativním, antivirálním, antibakteriálním, antimykotickým, ale hlavně analgetickým, antidiabetickým, protizánětlivým a hepatoprotektivním účinkem (Khan *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2010; Ma a Ma, 2013). Kromě výše zmiňovaných vlastností, díky kterým nachází palmatin využití v medicíně, bývá také používán jako fluorescenční sonda DNA, RNA a enzymů v biochemickém výzkumu (Ou-Yang *et al.*, 2012).

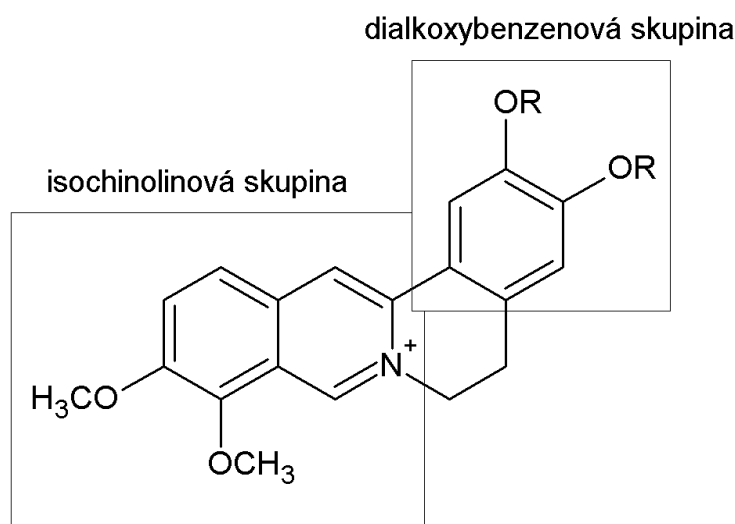
Charakteristickou vlastností palmatinu je jeho schopnost reagovat s nukleovými kyselinami. DNA je cílem mnoha molekul s terapeutickým indexem (Bhadra a Kumar, 2011). Látky s ní reagují prostřednictvím nekovalentních modifikací, jako je interkalace, vazba do zářezu nebo ji modifikují kovalentně formou alkylace, cross-linku a modifikace bazí (Giri *et al.*, 2006a; Maiti a Kumar, 2007). Palmatin se váže na DNA mechanismem interkalace k homo- a heteropolymerům bazí AT prostřednictvím elektrostatických interakcí. Ve struktuře palmatinu se interkalace účastní pouze benzenová jádra C a D, benzenová jádra A a B se nacházejí mimo rozsah malého zářezu šroubovice DNA (Bhadra a Kumar, 2011). Molekuly RNA hrají důležitou roli v biologických procesech, mají schopnost vytvářet rozmanité struktury, konformace, a proto se stejně jako molekuly DNA, stávají hojným cílem a receptorem pro interakci s léčivou (Giri *et al.*, 2006a; Giri *et al.*, 2006b). S molekulami RNA palmatin reaguje

prostřednictvím vazby k poly(A) konci mRNA. Na jednovláknové molekuly RNA se palmatin váže k poly(I) a poly(G), na dvouvláknové struktury RNA se palmatin váže specificky k poly(A) a poly(U). V případě t-RNA byly po vazbě palmatinu pozorovány její konformační změny, tepelná stabilizace a indukce optické aktivity. Síla vazby palmatinu je ovlivněna polohou a typem substituentů na jeho skeletu. Příkladem je demetylovaný derivát palmatinu, palmatrubin, který má na uhlíku C-9 navázanou OH-skupinu a je vázán k nukleovým kyselinám silněji než samotný palmatin (Islam et al., 2007; Islam a Kumar, 2008; Islam *et al.*, 2009).

Bylo prokázáno, že palmatin uplatňuje své cytotoxické účinky vůči rakovinným buněčným liniím. Například vykazuje cytotoxicitu vůči lidským leukemickým buňkám HL-60 (Giri *et al.*, 2006b; Kuo *et al.*, 1995). Toxicita palmatinu souvisí s jeho schopností vytvářet ternární komplex s DNA topoisomerasou I nádorových buněk a tím zabraňovat enzymu vykonávat správnou funkci. DNA topoisomerasy jsou jaderné enzymy schopné narušit a opět uzavřít cukr-fosfátovou kostru DNA, čímž zabraňují jejímu překroucení. Eukaryotická DNA topoisomerasa II katalyzuje uvolnění pozitivního a negativního nadšroubovicového vinutí a má schopnost štěpit obě vlákna DNA (Kim *et al.*, 1998). DNA topoisomerasa I má schopnost rozštěpit pouze jedno vlákno DNA (Kettmann *et al.*, 2004).

Palmatin vykazuje fototoxické vlastnosti vůči keratinocytům HaCaT. Spolu s berberinem a hydrastinem představují hlavní účinnou složku preparátů ze sušeného kořene nebo oddénku *Hydrastis canadensis* L, které se používají zejména k léčbě kožních onemocnění a očních infekcí. Při lokální aplikaci však může dojít k nežádoucí fototoxické reakci mezi obsaženým alkaloidem a světlem. Inbaraj *et al.* (2001) zjistili, že berberin a palmatin v kombinaci s UVA zářením způsobuje pokles viability keratinocytů HaCaT porušením jejich membrány. Oba alkaloidy totiž v těchto podmínkách produkují reaktivní kyslíkové formy (ROS) jako je superoxidový radikál, hydroxylový radikál a singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). Jejich cytotoxicita vůči HaCaT keratinocytům je ovlivněna koncentrací příslušných alkaloidů, přítomností světla a prostředím. Pokud jsou buňky vystaveny palmatinu a berberinu o koncentracích do $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a reakce se odehrává bez účasti světla, nedochází k poškození keratinocytů. Ve vodném roztoku palmatin ani berberin nevykazují fototoxické účinky, v ethanolu a dichlormethanu však produkují ROS. Reakce se účastní dialkoxybenzenová skupina a isochinolinová skupina (Obr. 5) (Inbaraj *et al.*, 2001; Inbaraj *et al.*, 2006; Hirakawa a Hirano 2008). Fototoxická vlastnost palmatinu i berberinu může být využita proti

buněčným liniím lidských nádorových buněk. Jejich vazba k DNA nádorových buněk, prostřednictvím elektrostatických sil, vede k tvorbě fluorescenčního intramolekulárního komplexu a způsobuje oxidační stres skrz světlem indukovanou produkci $^1\text{O}_2$. Kritickými místy této produkce jsou lipidové a mitochondriální membrány.



Obr. 5 Funkční skupiny účastnící se fototoxické reakce palmatinu (Převzato a upraveno podle Hirakawa a Hirano, 2008).

Palmatin spolu s berberinem vykazuje kompetitivní inhibici hovězí tyrosinhydroxylasy účastnící se biosyntézy katecholaminu dopaminu. Z tohoto hlediska jsou využívány jako sedativum (Shin *et al.*, 2000).

Kromě biologických účinků *in vitro* podmínkách, vykazuje palmatin také biologickou aktivitu *in vivo*, např. se účastní regulace metabolických procesů v hepatocytech potkanů blokací K^+ kanálků, což má za následek pokles koncentrace extracelulárních K^+ iontů. K nebezpečnému nárůstu koncentrace extracelulárních K^+ iontů dochází např. při hypoxii a ischemii, což vede k hyperpolarizaci membrány jaterních buněk a následně může tento jev vyústit až v buněčnou smrt. Modulace aktivity K^+ kanálků prostřednictvím palmatinu tedy vede k oddálení buněčné smrti (Wang *et al.*, 2003). Ovlivnění K^+ kanálků palmatinem se dá také využít k vyvolání apoptosy palmatinu v lidských hepatomových buňkách (Nietsch *et al.*, 2000). Kromě regulace K^+ kanálků, reguluje palmatin také Ca^{2+} kanálky v lidských hepatocytech. Tyto

kanálky prostřednictvím hormonů a růstových faktorů hrají významnou roli v regulaci metabolismu léčiv, transportu žlučových kyselin, anorganických inotů, buněčného růstu a diferenciace. Ca^{2+} kanálky jsou aktivovány poklesem koncentrace Ca^{2+} v lumen endoplasmatického retikula iniciovaného odtokem Ca^{2+} iontů a nazývají se I_{CRAC} (z angl. výrazu Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current). Palmatin efektivně inhibuje I_{CRAC} a tím chrání hepatocyty před nadměrným odtokem Ca^{2+} iontů iniciovaným poškozením hepatocytů látkami jako je např. tetrachlormethan (Bhadra a Kumar, 2011; Rychkov *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003).

Je známo, že palmatin inhibuje sekreci Cl^- iontů distálního tlustého střeva potkanů, aktivovanou jak Ca^{2+} , tak prostřednictvím cAMP. Inhibice sekrece Cl^- je zprostředkována zásahem palmatinu do sekrečních drah Ca^{2+} a cAMP a jeho ovlivněním signální dráhy těchto signálních molekul. Transport Cl^- přes střevní epitel hraje klíčovou roli v regulaci vylučování vody a je přísně regulován hormonálními, parakrinními a nervovými mediátory. Právě zvýšení sekrece Cl^- má za následek nadměrný transport vody z krve do lumenu střeva doprovázený těžkými průjmy (Wu *et al.*, 2008).

3.1.2 Absorpce a distribuce palmatinu

Po orálním podání podléhá palmatin rychlé pasivní absorpci především v horní části gastrointestinálního traktu včetně dutiny ústní, jícnu a žaludku. Pokud se nachází v extraktu *Rhizoma Coptidis*, vykazuje menší toxické účinky než palmatin izolovaný v čisté formě z tohoto extraktu (Ma a Ma, 2013).

V důsledku působení elektrostatických interakcí způsobených přítomností benzenového jádra, na kterém se nacházejí dvě sousední methoxy skupiny, dochází po absorpci palmatinu k jeho vazbě na sérový albumin, který je zodpovědný za transport exogenních i endogenních ligandů k cílovým molekulám (Zhang *et al.*, 2011). V této formě je následně distribuován do žaludku, jater, slinivky, sleziny, střev, ledvin, mozku, srdce, varlat a dělohy. Ve tkáních je koncentrace palmatinu mnohem vyšší než v krevním oběhu (Ma *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010). Tento fakt naznačuje, že v absorpci alkaloidů jsou zapojeny mechanismy aktivního transportu (Ma a Ma, 2013). Jelikož je palmatin také substrátem transportéru P-glykoproteinu, který pumpuje léčiva ven

z tkání, musí mít tyto mechanismy aktivního transportu vysokou účinnost (Wang *et al.*, 2005).

3.2 Berberin

Berberin ($C_{20}H_{18}O_4N^+$; 7,8,13,13a-tetrahydro-9,10-dimethoxy-2,3-methylenedioxyberberinium) patří mezi nejvíce rozšířené alkaloidy v rostlinné říši, jeho krystaly jsou žlutě zbarveny a je rozpustný ve vodě (Bhadra a Kumar, 2011). Představuje polycyklický systém s mírně deformovaným tvarem molekuly. Jeho charakteristické absorpční maximum reprezentují čtyři vlnové délky 230, 267, 344 a 420 nm. Jedná se o velmi stabilní molekulu, jelikož ani při značném kolísání pH nebo teploty nedochází k ovlivnění jeho absorpčního spektra (Maiti a Kumar, 2006). Vyskytuje se především v kořenu, oddenku a kůře mnoha rostlinných druhů, které se nacházejí v devíti botanických čeledích (*Papaveraceae*, *Berberidaceae*, *Rutaceae*, *Rununculaceae*, *Menispermaceae*, *Rubiaceae*, *Rhamnaceae*, *Magnoliaceae*, *Annonaceae*) (Vannerstrom a Klayman, 1988; Zuo *et al.*, 2006). Nejvíce je zastoupen v rostlinách *Berberis asristata* DC, *Berberis vulgaris* L a *Hydrastis canadensis* L (Vrzal *et al.*, 2005).

Díky své antimikrobiální a antisekreční aktivitě byl berberin již od pradávna používán v tradiční čínské medicíně k léčbě průjmů, zánětů gastrointestinálního traktu a jako antibiotikum. V posledních desetiletích je také zkoumán jako látka působící cytotoxicky vůči rakovinným buněčným liniím (Kuo *et al.*, 1995). Berberin, stejně jako palmatin, reaguje s molekulami DNA prostřednictvím parciální interkalace s bázemi AT (Bhadra *et al.*, 2008). Berberin má schopnost inhibovat aktivitu enzymu cyklooxygenasa 2 (COX-2). Tato inhibice není způsobena přímou blokadou syntézy COX-2, ale je dána právě schopností berberinu interagovat s DNA a inhibovat tak aktivitu promotoru COX-2. COX-2 je inducibilní isoformou enzymu cyklooxygenasa, tzn., že se nevyskytuje v buňkách za fyziologických podmínek, ale je exprimována při zánětlivých stavech. Zvýšená exprese COX-2 je pozorována u buněk rakoviny tlustého střeva a výsledná nadprodukce prostaglandinů způsobuje rozvoj a progresi rakoviny tlustého střeva. Sloučeniny, které vykazují schopnost inhibovat transkripční aktivitu COX-2, mají chemopreventivní vlastnost proti vzniku nádoru tlustého střeva (Fukuda *et al.*, 1999). Berberin vykazuje schopnost indukovat apoptosu u buněk lidské

promyleocytární leukemie (HL-60). U těchto buněk berberin potlačuje proliferaci, což vede k buněčné smrti indukci apoptosy. Tento efekt závisí na schopnosti berberinu interkalovat se do DNA nádorových buněk. Interakce způsobuje konformační změny ve struktuře DNA a změny ve struktuře chromatinu (Kuo *et al.*, 1995). V klinické praxi se nejčastěji používá berberin ve formě chloridu nebo sulfátu (Ye *et al.*, 2009).

Koncentrace berberinu v plasmě je velmi nízká, jeho biologická dostupnost činí pouze 1 %. Berberin je obtížně vstřebatelný díky malé míře absorpce střevní stěnou. Po perorálním podání je polovina dávky přímo vyloučena stolicí, zatímco druhá polovina podléhá eliminačním reakcím (Liu *et al.*, 2010). Qiu *et al.* (2008) zjistili, že v gastrointestinálním traktu je berberin relativně stabilní poněvadž ani 4 hodiny po perorálním podání zde nejsou detekovány jeho metabolity. Při podání berberinu intraperitoneální injekcí byly detekovány stejné metabolity jako při podání *per os*, což znamená, že jeho metabolity jsou tvořeny spíše po absorpci (Liu *et al.*, 2010). Z charakteru metabolitů detekovaných v moči potkanů a lidí je zřejmé, že berberin je metabolizován zejména štěpením dioxolového kruhu nebo demethylací. Redukčními produkty berberinu jsou tetrahydroberberin a dihydroberberin, které nejsou již dále metabolizovány, dalšími produkty jsou jatrorrhizin-3-sulfát, demethylenberberin-2-sulfát a thalifendin-10-sulfát (Zuo *et al.*, 2006).

Berberin je účinnou látkou v léčbě sekrečních průjmů, protože brání sekreci epiteliálních elektrolytů ve střevním traktu potkanů a králíků (Wu *et al.*, 2008). Berberin má také sedativní a vasodilatační (hypotensní) efekt. Tento efekt je velmi podobný s účinkami agonistů α -adrenoreceptoru a je dán jeho schopností zvyšovat hypotensní účinky acetylcholinu. V případě testování na králících bylo zjištěno, že berberin způsobuje hypotensi blokadou α -adrenoreceptorů, avšak při testování na psech zahrnuje tento účinek přímé působení na cévy nezávislé na adrenergických, histaminergních a cholinergních receptorech (Jang, 1953; Shin *et al.*, 2000).

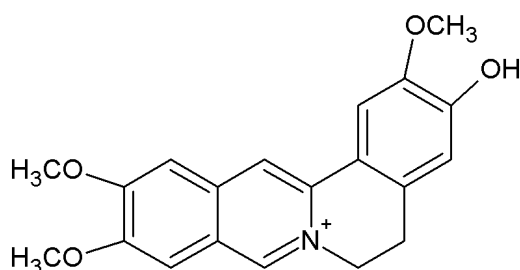
3.3 Koptisin

Koptisin ($C_{19}H_{14}O_4N^+$; 6,7 dihydro-bis(1,3)benzodioxolo (5,6-*a*: 4'5'-*g*) chinolizinium) je alkaloid nacházející se v mnoha rostlinných druzích, nejčastěji je ale izolován z kořene *Coptis japonica* nebo *Chelidonia majus* (Tanabe *et al.*, 2005). Stejně jako

strukturně příbuzný palmatin a berberin, vykazuje koptisin celou řadu biologických účinků. Působí antibakteriálně proti střevním bakteriím, vykazuje protizánětlivé, antipyretické a antifotooxidativní účinky *in vitro* i *in vivo* (Lee *et al.*, 2012). Inhibuje aktivitu acetylcholinesterasy a H^+ , K^+ -ATPasy. Nejvýznamnější aktivitou je jeho vliv na buňky cév hladkého svalstva. Koptisin inhibuje jejich proliferaci mnohem účinněji než berberin nebo palmatin (Suzuki *et al.*, 2010). Proliferace těchto buněk hraje důležitou roli v patologii hypertenze, aterosklerózy a restenózy po angioplastice. Svou antiproliferativní aktivitu vykonává koptisin zastavením buněčného cyklu v G0/G1 a G2/M fázi. Potlačuje indukci cyklinu D1v buňkách stimulovaných sérem urychlením jeho proteolýzy, což vede k zastavení buněčného cyklu v G0/G1 fázi. Kromě toho také zabraňuje progresi buněk v G2/M fázi inhibicí polymerizace tubulinu v nižší koncentraci než, která je potřebná pro zastavení buněk v G0/G1 fázi buněčného cyklu (Tanabe *et al.*, 2005).

3.4 Jatrorrhizin

Jatrorrhizin ($C_{20}H_{20}NO_4^+$; 2,9,10-trimethoxy-5,6-dyhydroisochinolino[2,1-*b*]-bisochinolin-7-ium-3-ol) (Obr. 6) má oranžově zbarvené krystaly a je rozpustný ve vodě (Bhadra a Kumar, 2011). Strukturně se liší od palmatinu, berberinu a koptisinu tím, že ve své struktuře má navázanou hydroxylovou skupinu. Jeho biologické účinky souvisí např. se schopností blokovat aktivitu α -adrenoreceptorů, čímž zprostředkovává své hypotenzní a antiarytmické účinky. Výraznou vlastností je jeho působení proti téměř všem druhům plísní a v nedávné době byla zjištěna i jeho antimikrobiální aktivita a hypoglykemický efekt (Han a Fang, 1989; Vollekova *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Jatrorrhizin má také schopnost vázat se k DNA, ale na rozdíl od palmatinu a berberinu nemá vazebnou specifitu k určité bázi (Bhadra a Kumar, 2011).

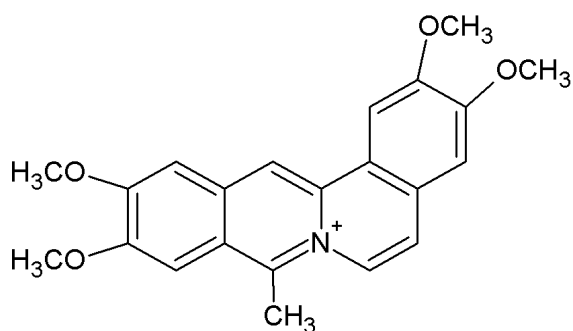


Jatrorrhizin

Obr. 6 Strukturní vzorec alkaloidu jatrorrhizinu.

3.2 Koralyn

Kromě přírodních protoberberinových alkaloidů byl připraven také syntetický protoberberinový alkaloid koralyn ($C_{22}H_{22}O_4N^+$; 5,6,7,8,13,13a-hexadehydro-8-,methyl-2,3,10,11- tetramethoxy berberinium) (Obr. 7). Na uhlíku C-8 protoberberinového skeletu má koralyn navázanou methylovou skupinu, a tak má na rozdíl od berberinu a palmatinu planární strukturu (Bhadra a Kumar, 2011). Koralyn představuje nadějnou sloučeninu působícího proti rakovině, jelikož vykazuje velmi nízkou toxicitu a je silným inhibítozem lidské topoisomerasy I (Gatto *et al.*, 1996). Interkaluje se také do DNA, kde se specificky páruje s bázemi GC. Právě interkalace je faktorem zodpovědným za antileukemickou aktivitu koralynu. Koralyn má také schopnost inhibovat aktivitu reverzní transkriptasy RNA virů způsobujících nádory (Bhadra a Kumar, 2011).



Koralyn

Obr. 7 Strukturní vzorec syntetického alkaloidu koralynu.

3.6 Farmakologické využití protoberberinových alkaloidů

Palmatin a další protoberberinové alkaloidy jsou obsaženy v různých léčivých rostlinách a přípravcích. Nejvíce jsou obsaženy v Rhizoma Corydalis (Obr. 8) a Rhizoma Coptidis (Obr. 9). Rhizoma Corydalis je sušená hlíza rostliny *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang z rostlinné čeledi *Papaveraceae*. Rostlina běžně roste v Číně, Japonsku a na Sibiři. Využívá se k podpoře správného krevního oběhu, tlumení bolesti hlavy a na hrudi, k léčbě zánětů a onemocnění pokožky. Nejvýznamnějšími složkami Rhizoma Corydalis jsou protoberberinové alkaloidy palmatin, tetrahydropalmatin, koptisin a dehydrokorydalin. Dále obsahuje tetrahydroberberin, skoulerin, korydalin a mnoho dalších alkaloidů. Alkaloidy palmatin a koptisin mají schopnost inhibovat agregaci krevních destiček. Dále inhibují vápenaté ionty vstupující do buňky a zabraňují tak odumření neuronů po ischemické perfuzi u potkanů (Wagner *et al.*, 2011).



Obr. 8 Vzhled sušené hlízy *Corydalis yanhusuo* (Převzato z <http://www.epharmacognosy.com/2012/04/corydalis-tuber-yanhusuo-corydalis.html>)

Rhizoma Coptidis (nazýván také jako Huang Lian) je sušený oddenek několika druhů rostliny koptis z čeledi *Ranunculaceae*. Jedná se o oddenek z *Coptis chinensis* Franch (koptis čínský), *Coptis dletoidea* C.Y. Cheng et Hasio a *Coptis teeta* Wallse. Rhizoma Coptidis je součástí léčivých preparátů jako je např. Zuo-Jin-Wan, Huang-Lian-Lie-Du-Tang a Gegen-Huangqin-Huanglian-Tang. Již od pradávna je užíván v tradiční čínské medicíně jako lék pro léčbu diabetu, a to díky schopnosti snižovat hladinu cukru v krvi.

Dále je Rhizoma Coptidis využíván pro léčbu gastroenteritidy, sekrečního průjmu a břišního tyfu. Při orálním podání pozitivně ovlivňuje riziko výskytu rakoviny a kardiovaskulárních chorob stimulací krevního oběhu, snižuje horečku, má antivirové, antibakteriální, antimykotické, antiproliferativní, antioxidantní a hypocholesterolemické účinky (Jung *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010; Ma a Ma, 2013). Rhizoma Coptidis s charakteristickým žlutým zbarvením, obsahuje celou řadu alkaloidů jako bioaktivní složky. Mezi nejvýznamnější patří palmatin, berberin, koptisin, dále pak epiberberin, jatrorrhizin a kolumbamin (Jung *et al.*, 2008). Obsah zastoupeného palmatinu, berberinu a koptisinu v Rhizoma Coptidis tvoří asi 60 % z celkové frakce obsahující alkaloidy, přičemž množství celkových alkaloidů a množství tří nejvýznamnějších alkaloidů slouží jako kontrola kvality produktů z koptise čínského (Yan *et al.*, 2008; Teng *et al.*, 2014).



Obr. 9 Vzhled nadzemní a kořenové části rostliny *Coptis chinensis* Franche (Převzato z <http://www.bencaodao.com/zhongcaoyao/H/20090522/65.html>).

Po perorálním podání Rhizoma Coptidis lidem je možno v moči identifikovat nemetabolizovaný berberin a 11 metabolitů alkaloidů. Jedná se o dehydrokorydalmin-10-*O*-sulfát, 3,10-demethylpalmatin-10-*O*-sulfát, 2,3,10-trihydroxyberberin-2-*O*-sulfát, jatrorrhizin-3-*O*-sulfát, demethylenberberin-2-*O*-sulfát, kolumbamin-2-*O*- β -D-glukuronid, berberrubin-9-*O*- β -D-glukuronid, jatrorrhizin-3-*O*- β -D-glukuronid,

groenlandicin-3-*O*- β -D-glukuronid, dehydrocheilanthifolin-2-*O*- β -D-glukuronid a thalifendin-10-*O*- β -D-glukuronid. Kromě berberinu se jiné nemetabolizované alkaloidy v moči nevyskytují. Tento jev poukazuje na fakt, že alkaloidy Rhizoma Coptidis jsou *in vivo* značně metabolizovány a jejich metabolity jsou tak jedinou existující formou v lidském těle. Během první fáze metabolismu xenobiotik jsou protoberberinové alkaloidy v těle metabolizovány odštěpením dioxolového pětičlenného kruhu nebo demethylací. V druhé fázi biotransformace xenobiotik podléhají sulfonylaci nebo konjugaci s kyselinou glukuronovou. Tyto metabolity jsou velmi polární a jsou snadno vylučovány (Yang *et al.*, 2010).

Jako běžně používané techniky k separaci a extrakci alkaloidů z rostlin jsou používány soxhletova extrakce, macerace za pokojové teploty a refluxní extrakce. V dnešní době se k extrakci bioaktivních látek z rostlinného materiálu využívá také modernějších metod. Jednou z nich je ultrazvukem asistovaná extrakce. Jedná se o metodu, která na rozdíl od jiných moderních technik, jako je superkritická fluidní extrakce a extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem, dovoluje vyšší proniknutí rozpouštědla do rostlinného materiálu, je jednodušší a ekonomičtější (Teng *et al.*, 2014).

Produkty čínské medicíny mají dlouholetou tradici použití a jejich účinnost byla prokázána i v klinické praxi. Ve většině případů jsou léčiva z těchto produktů podávána perorálně, i když jejich biologická dostupnost je často špatná. Jedním z hlavních důvodů je fakt, že alkaloidy obsažené v těchto preparátech jsou biotransformovány v gastrointestinálním traktu nebo játrech (Yang *et al.*, 2010).

4 Cytochromy P450

Cytochromy P450 představují velmi významný systém enzymů metabolizujících různé endogenní substráty (např. steroidy) a xenobiotika (např. léčiva) (Han *et al.*, 2011). Hrají tedy velmi důležitou roli např. při detoxifikaci organismu, chrání tělo před vystavením škodlivým látkám z životního prostředí a tím minimalizují poškození organismu těmito látkami (Xu *et al.*, 2005). Jsou lokalizovány v hladkém endoplasmatickém retikulu a vyskytují se nejčastěji v játrech, ale i v extrahepatálních tkáních jako je mozek, ledviny, plíce, střevní sliznice, lymfocyty, placenta atd. Kromě hladkého endoplasmatického retikula jsou cytochromy P450 lokalizovány také v mitochondriích (Han *et al.*, 2011).

Výraz cytochrom P450 se poprvé objevil v literatuře v roce 1962 jako mikrosomální membránově vázaný hemoprotein, v té době s neznámou fyziologickou funkcí, ale známým charakteristickým absorpčním maximem. Následné objasnění jeho funkce v roce 1963 vedlo k rozšíření výzkumu tohoto hemoproteinu (Omura a Sato, 1962). Evolučně představují cytochromy P450 velmi staré hemoproteiny, které se zde vyskytly ještě dříve než hemoglobin (Stiborová *et al.*, 1999). V dnešní době představuje název cytochrom P450 souhrnné označení pro rozsáhlou nadrodinu hemoproteinů, které se během biologické evoluce diverzifikovaly z jediného ancestrálního proteinu archaeobakterií do mnoha forem a můžeme jej nalézt u bakterií, rostlin, živočichů a lidí (Omura, 1999). I když se mezi cytochromy P450 u prokaryot a eukaryot vykytují značné strukturální a substrátově specifické rozdíly, obsahují tyto proteiny konzervované sekvence aminokyselin poblíž oblasti pro vazebné místo hemu. Cytochromy P450 mají specifické katalytické a spektrální vlastnosti, které je odlišují od ostatních hemoproteinů (Stiborová *et al.*, 1999).

Geny lidských cytochromů P450 jsou vysoce polymorfní. Tento polymorfní charakter do značné míry ovlivňuje odezvu na jednotlivá léčiva a nežádoucí účinky. Mezi varianty polymorfismu patří inserce a delece nukleotidů, missense mutace, mutace ovlivňující genovou expresi a aktivitu hlavně u CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D (Ingleman-Sundberg *et al.*, 2007).

4.1 Názvosloví cytochromů P450

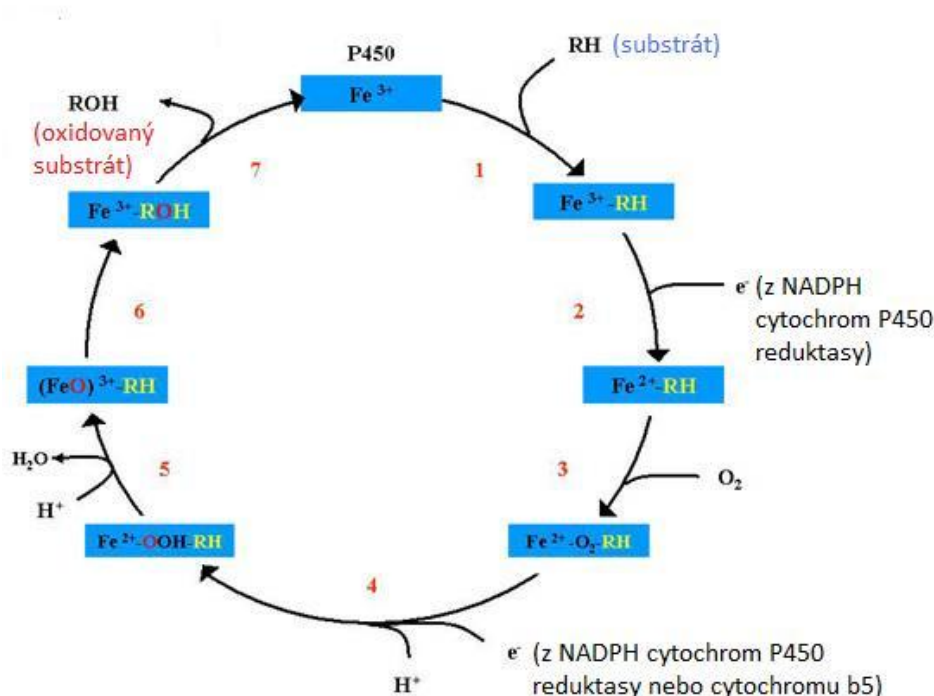
Název cytochrom P450 je odvozen od jeho charakteristického absorpčního maxima, které je 450 nm, pokud se cytochrom nachází v komplexu s oxidem uhelnatým. Od roku 1991 je název tvořen zkráceným tvarem CYP, který je následován arabskou číslicí vyjadřující číslo rodiny (např. CYP1). Číslo rodiny je zároveň spojeno s funkcí enzymu. Cytochromy P450, které tvoří jednu rodinu, by měly mít ze 40 % shodnou sekvenci aminokyselin v překrývajících se částech. Rodina je dále členěna na podrodinu podle vyšší sekvenční podobnosti, která je v tomto případě 55 %. Podrodiny jsou označovány písmeny (např. CYP1A, CYP2E atd.). Následně jsou jednotliví členové podrodiny značeni opět arabskou číslicí (např. CYP1A1, CYP1B1). Sekvence nových členů podrodiny by se měla lišit o více jak 3% (Azenbacher a Azenbacherová, 2001).

4.2 Cytochromy P450 jako monooxygenasy

Cytochromy P450 vystupují jako terminální oxidasy multisložkového řetězce transportujícího elektrony. Tyto enzymy katalyzují inkorporaci atomu kyslíku, pocházejícího z molekulárního kyslíku, do struktury endogenního nebo exogenního substrátu (např. environmentální polutanty, léčiva, steroidy, eikosanoidy atd.). Původně hydrofobní substráty jsou tak transformovány na reaktivnější hydrofilní sloučeniny (Hudeček *et al.*, 2000). Katalytický cyklus cytochromů P450 obsahuje několik poměrně složitých dílčích kroků (Obr. 10). Pro tento cyklus je nutná přítomnost i dalších složek, které spolupracují s cytochromem P450. Mezi tyto složky patří cytochrom *b5*, FMN, FAD, fosfolipidy a NADPH:cytochrom-P450-reduktasa (Šiller, 2010). K monooxygenační reakci jsou vyžadovány také redukční ekvivalenty jako je NADH a NADPH. Eukaryotní cytochromy P450, mikrosomální i mitochondriální, vyžadují k monooxygenaci jako donor elektronů NADPH, zatímco prokaryotní cytochromy P450 přijímají elektrony z koenzymu NADH (Omura, 1999).

Katalyzační reakce cytochromů P450 je zahájena v endoplasmatickém retikulu, kde dochází k vazbě substrátu na enzym a přenosem elektronů z NADPH na enzym NADPH:cytochrom-P450-reduktasa a následně na cytochromy P450. V mitochondriích se uskutečňuje přenos elektronů z NADPH na Fe-S protein nebo na

ferredoxinreduktasu. Dochází tak k redukci cytochromu P450, který aktivuje molekulu kyslíku (Stiborová *et al.*, 1999). Jeden atom kyslíku z této molekuly je včleněn do molekuly příslušného substrátu a druhý je redukován na molekulu vody (Hudeček *et al.*, 2000). Donorem atomárního kyslíku můžou být také peroxokyseliny a peroxidy (Stiborová *et al.*, 1999).



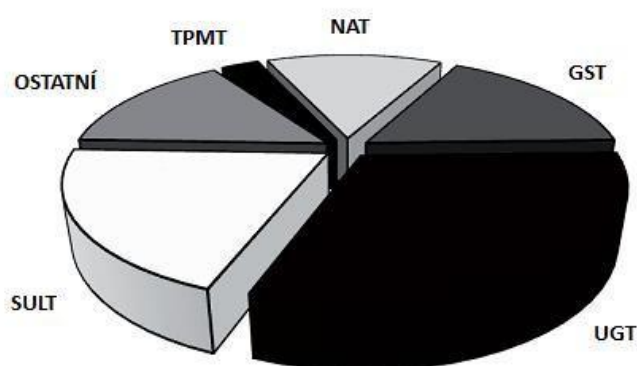
Obr. 10 Katalytický cyklus cytochromu P450. Reakce je zahájena vazbou substrátu na enzym a následně jsou elektrony přenášeny z NADPH na NADPH:cytochrom P450-reduktasa a na cytochrom P450. Tím dojde k redukci cytochromu P450, který aktivuje molekulu kyslíku. Jeden atom kyslíku z této molekuly je včleněn do molekuly substrátu, druhý atom je redukován na molekulu vody (Převzato a upraveno podle Šiller 2010).

4.3 Biotransformace xenobiotik

Jak již bylo uvedeno, u sloučenin, které jsou substráty cytochromů P450 dochází k biotransformaci na více polární produkty, které pak díky tomu mohou být vyloučeny z organismu a nedochází k jejich bioakumulaci (Stiborová *et al.*, 1999). Některé substráty, jako jsou polychlorované bifenyly nebo dioxiny, však mohou být

prostřednictvím určitých cytochromů P450 metabolizovány na genotoxické látky, které se pak vážou na nukleové kyseliny a proteiny a mohou tak zprostředkovávat chemicky indukovanou karcinogenezi (Tab. 1) (Ciolino *et al.*, 1999). Studium metabolismu xenobiotik tedy umožňuje modulovat účinek léčiv, ale také snižovat jejich vedlejší účinky (Stiborová *et al.*, 1999).

Biotransformace xenobiotik probíhá nejčastěji na cytosolární straně endoplasmatického retikula jater (Vrzal *et al.*, 2004) a je rozdělena do dvou fází. První fáze zahrnuje transformaci xenobiotika odhalením nebo naopak *de novo* vytvořením funkční skupiny, čímž dochází ke zvýšení polaritě metabolitu. Nejvýznamnější reakce první fáze biotransformace je hydroxylace, tvorba epoxidů, dealkylace, deaminace a desulfurace. Hlavními enzymy, které se účastní této fáze, jsou cytochromy P450, vykonávající především hydroxylaci a z toho důvodu fungují jako hydroxylasy. Druhá fáze se účastní především enzymy ze skupiny transferas (Jančová *et al.*, 2010). Patří sem sulfotransferasy (SULT), UDP-glukuronyltransferasy (UGT), NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (NQO), *N*-acetyltransferasy (NAT), glutation-*S*-transferasy (GST), epoxidhydrolasy (EPH) (Xu *et al.*, 2005), ale také různé methyltransferasy, např. thiopurin-*S*-methyltransferasa (TPMT) nebo katechol-*O*-methyltransferasa (COMT) (Obr. 11). Oxidované produkty v druhé fázi tedy podléhají konjugaci s malými hydrofilními endogenními molekulami kyseliny glukuronové, glutathionu, cysteinu, acetátu nebo sulfátu (Vrzal *et al.*, 2004).



Obr. 11 Zastoupení některých enzymů účastnících se II. fáze metabolismu xenobiotik. GSTs (glutation-*S*-transferasy), NATs (*N*-acetyltransferasy), TPMT (thiopurin-*S*-methyltransferasa), SULTs (sulfotransferasy), UGTs (UDP-glukuronyltransferasy) (Převzato a upraveno podle Jančová *et al.*, 2010).

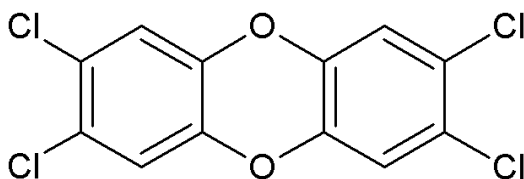
Tab. 1 Lidské cytochromy P450 metabolizující xenobiotika. (Převzato a upraveno podle Azenbacher a Azenbacherová, 2001; Stiborová *et.al.*, 1999; Belitsky a Jakubovska, 2007)

Izoforma	Lokalizace	Substrát		Induktor
		karcinogenní	nekarcinogenní	
CYP1A1	játra, plíce, mozek, srdce, lymfocyty, gastrointestinální trakt (GIT)	hydrofóbní polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH)	nekarcinogenní PAH	PAH (benzo[<i>a</i>]pyren), dioxiny (TCDD), omeprazol
CYP1A2	játra	PAH, aromatické aminy, aflatoxiny, azosloučeniny, 4-aminobifenyl	kofein	PAH (benzo[<i>a</i>]pyren), dioxiny (TCDD), kouření, omeprazol, polychlorované bifenyly
CYP1B1	játra, ledviny, mozek, srdce, pokožka, placenta, plíce, slezina, GIT	dioxin	PAH	dioxin
CYP2A6	játra	steroidy, cyklofosfamid, aflatoxiny, nitrosaminy	kumarin a jeho deriváty	barbituráty, dexamethason
CYP2B6	játra, srdce	nikotin, cyklofosfamid, aflatoxiny, nitrosaminy	kumarin a jeho deriváty	barbituráty, dexamethason
CYP2D6	játra, srdce, mozek	antidepresiva, β -blokátory	debrisoquin	-
CYP3A4	játra, ledviny, lymfocyty, placenta, mozek, plíce, endotel, GIT	aflatoxiny, cyklosporin, steroidy, taxol	barbituráty, blokátory Ca kanálků (nifedipin)	rifampicin, erytromycin, fenobarbital, dexamethason, klofibrát
CYP3A5	játra, ledviny, lymfocyty, placenta, mozek, plíce, endotel, GIT	heterocyklické aminy, dihydrodioly	estrogeny	steroidy, barbituráty
CYP2E1	játra, plíce, mozek, endotel, kostní dřeň, srdce	chloroform, uretan, benzen, nitrosamin, vinylchlorid, akrylamid, styren, akrylonitril		etanol, aceton, toluen, hladovění

4.4 Arylhydroxidový receptor

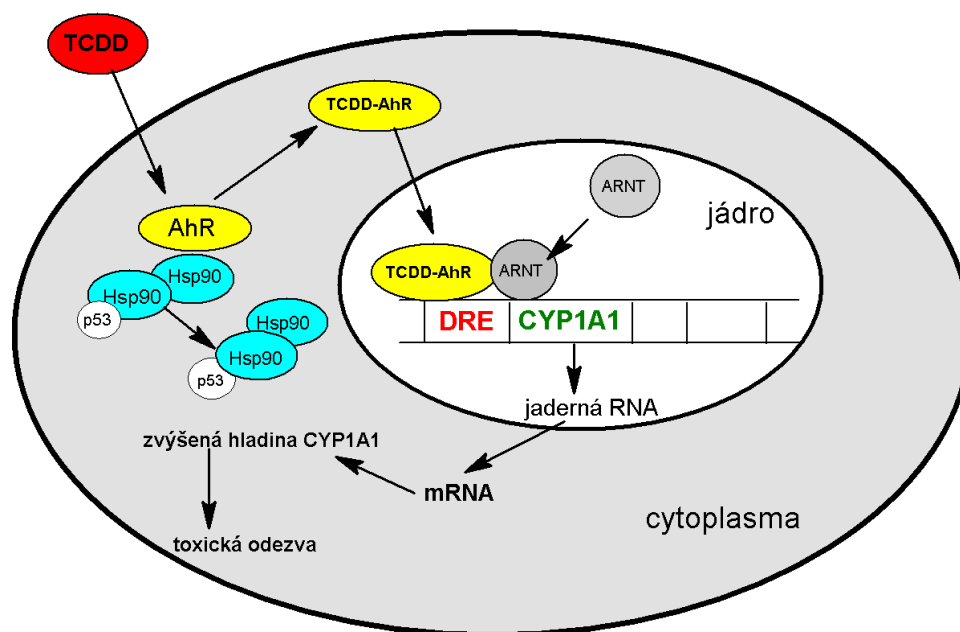
Arylhydroxidový receptor (AhR) je transkripční faktor patřící do rodiny transkripčních faktorů helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim. Kontroluje transkripci velkého množství genů, např. transkripci genů enzymů účastnících se biotransformace xenobiotik a endogenních substrátů, jako jsou CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT, NQO a GST (Vrzal *et al.*, 2004). Lidský gen pro AhR je lokalizován na chromozomu 7. Nachází se zde 12 exonů, které kódují 848 aminokyselin proteinu s molekulovou hmotností 96 147 Da (Vrzal *et al.*, 2004). Poprvé byl AhR identifikován Polandem a jeho skupinou v játrech myši a potkanů. Experimentem bylo zjištěno, že cytosolární frakce jater těchto živočichů obsahuje malé ostrůvky vysoce afinitních stereospecifických vazebných míst pro reverzibilní vazbu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinu (TCDD) (Obr. 12) (Poland a Glover, 1976).

AhR může být aktivován endogenními nebo exogenními ligandy. Mezi endogenní ligandy patří metabolity tryptofanu, metabolity hemu, složky potravy atd. Exogenními ligandy jsou hlavně halogenované aromatické uhlovodíky, jako jsou dioxiny (např. TCDD) a polychlorované bifenyly nebo polycyklické aromatické uhlovodíky (např. benzo[*a*]pyren) (Veldhoen *et al.*, 2008). Benzo[*a*]pyren je látka znečišťující životní prostředí, která je produkována v cigaretovém kouři a je součástí zplodin koksovacích pecí. Dále je benzo[*a*]pyren obsažen ve spáleném jídle a je původcem maligních onemocnění, jako je rakovina plic, hrtanu a ateroskleróza (Uno *et al.*, 2014). TCDD je látka vysoce toxická pro životní prostředí, která vzniká jako vedlejší produkt průmyslové výroby a spalováním odpadů (Safe, 2001). TCDD je rozpustný v tucích, dochází k jeho bioakumulaci v tukové tkáni a jeho poločas rozpadu je u dospělých lidí 7-12 let. Vysoká krátkodobá expozice způsobuje poškození jater a chlorakné, zatímco dlouhodobá expozice v nižších dávkách je spjata s imunodeficiencí, diabetem, různými typy rakoviny, involucí brzlíku, epiteliální hyperplazií a teratogenezí (Mimura *et al.*, 1997; Prokopec *et al.*, 2013).



Obr. 12 Chemická struktura 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinu (TCDD)

AhR se nachází v cytoplasmě v multiproteinovém komplexu, ve kterém je asociovaný se dvěma Hsp90 (heat shock protein 90) a malým proteinem p23. Po navázání ligandu na AhR dochází k disociaci těchto komponent a translokaci do jádra (Vrzal *et al.*, 2004; Mimura *et al.*, 1997). TCDD vytváří spolu s cytoplasmatickým AhR komplex ligand-receptor, který se poté translokuje do jádra, kde dimerizuje s jaderným translokátorem aryluhlovodíkového receptoru (ARNT) (Prokopec *et al.*, 2013). Tento heterodimer rozpoznává a váže se na DNA v místě sekvence DRE (dioxine responsive elements) a tím aktivuje transkripci příslušných genů (Mimura *et al.*, 1997) (Obr. 13).



Obr. 13 Signální dráha vedoucí k odezvě AhR na TCDD. TCDD se jako ligand váže na AhR za vytvoření komplexu TCDD-AhR, který je translokován do jádra, kde dimerizuje s jaderným translokátorem aryluhlovodíkového receptoru. Tento dimer rozpoznává na DNA sekvenci DRE a aktivuje transkripci mRNA příslušných genů (Převzato a upraveno podle Mandal P.K., 2005).

4.5 Cytochromy P450 1A

Mezi členy této podrodiny patří dva izoenzymy, CYP1A1 a CYP1A2 (Okamoto *et al.*, 1993). Tyto enzymy katalyzují oxygenaci heterocyklických aromatických aminů/amidů, polycyklických aromatických uhlovodíků, demethylaci aminoazobarviv, dealkylaci kofeinu, fenacetinu a dalších terapeutických látek. Oxidace přírodních látek prostřednictvím těchto dvou enzymů vede ke vzniku produktů, které jsou více polární a dochází tak k jejich zvýšené exkreci a udržování chemické homeostázy těla. Naopak oxidace heterocyklických aminů a polycyklických aromatických uhlovodíků způsobuje tvorbu arenoxidů, dioleoxidů či dalších reaktivních forem vytvářejících adukty s DNA a proteiny, které pak formují tumor (Ma a Lu, 2007).

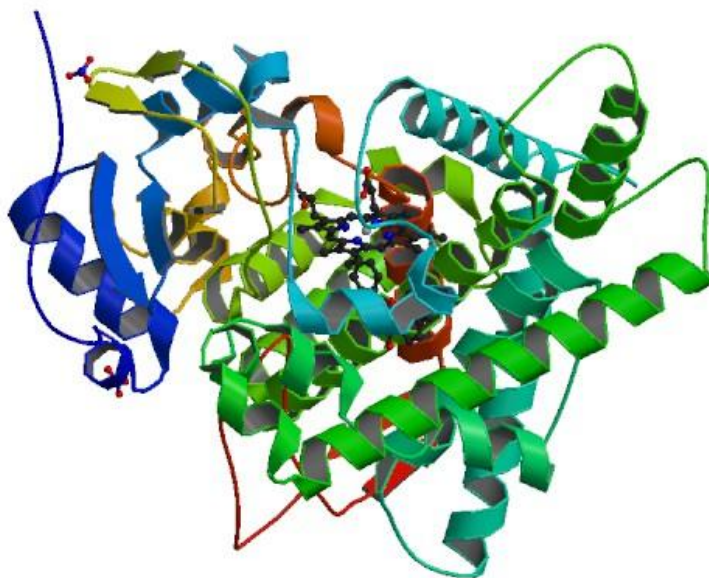
CYP1A prostřednictvím *N*-hydroxylace metabolicky aktivují 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, který vzniká při přípravě potravy bohaté na proteiny za vysokých teplot. Aktivovaný metabolit se váže k DNA a poškozuje ji (Wilkening *et al.*, 2003).

4.5.1 CYP1A1

Cytochrom P450 1A1 (Obr. 14) se vyskytuje především v plicích, mozku, srdci, lymfocytech a gastrointestinálním traktu, ale je indukovatelný i v játrech. Jeho indukci vyvolávají prokarcinogeny, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly a další látky. Jelikož CYP1A1 způsobuje přeměnu těchto prokarcinogenů na karcinogeny, jeho inhibice přírodními látkami může hrát roli v prevenci rozvoje rakoviny (Vrzal *et al.*, 2005).

V plicích je zvýšená exprese genu *CYP1A1* vyvolána prostřednictvím polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) obsažených například v cigaretovém kouři. PAH jsou pomocí CYP1A1 transformovány na mutagenní látky tvořící adukty s DNA, které jsou iniciačním krokem pro zahájení karcinogeneze. Jedním z prvních kroků karcinogeneze plic je mutace tumor supresorového genu *p53* a onkogenu *K-ras*. Zvýšení genové exprese enzymu CYP1A1 je tedy významně spojeno s rizikem rozvoje rakoviny plic (Tekpli *et al.*, 2012).

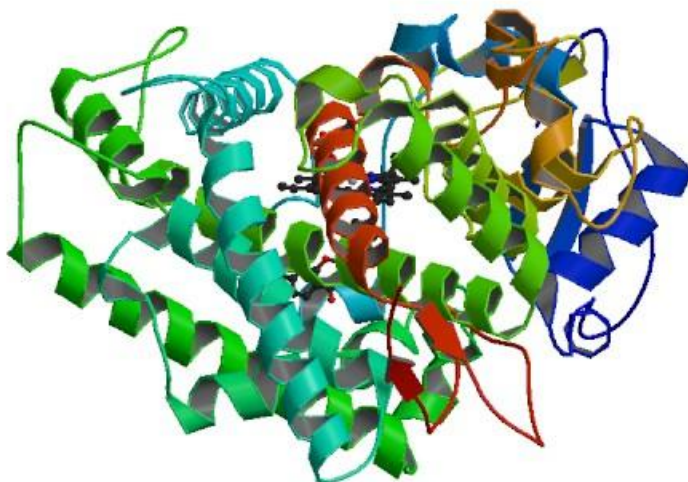
V lokusu genu *CYP1A1* bylo identifikováno několik jednonukleotidových polymorfismů. Alela *CYP1A1 m1* má mutaci T→C v 3' nekódující oblasti. Tato mutace je spojována se zvýšenou aktivitou enzymu. Alela *CYP1A1 m2* obsahuje přechod A→G v exonu 7, který způsobuje substituci aminokyseliny Val za Ile ve vazebném místě hemu a výsledkem je zvýšená aktivita mikrosomálního enzymu. Alela *CYP1A1 m3* má mutaci v intonu 7. Polymorfismus *m4* způsobuje záměnu aminokyseliny Thr za Asn ve vazebném místě hemu. Bylo prokázáno, že genotyp CYP1A1 závisí na etnickém původu. Například polymorfismus *CYP1A1 m1* a *CYP1A1 m2* se vyskytuje mnohem výrazněji u Asiátů ve srovnání s Evropany a Afroameričany (Song *et al.*, 2001).



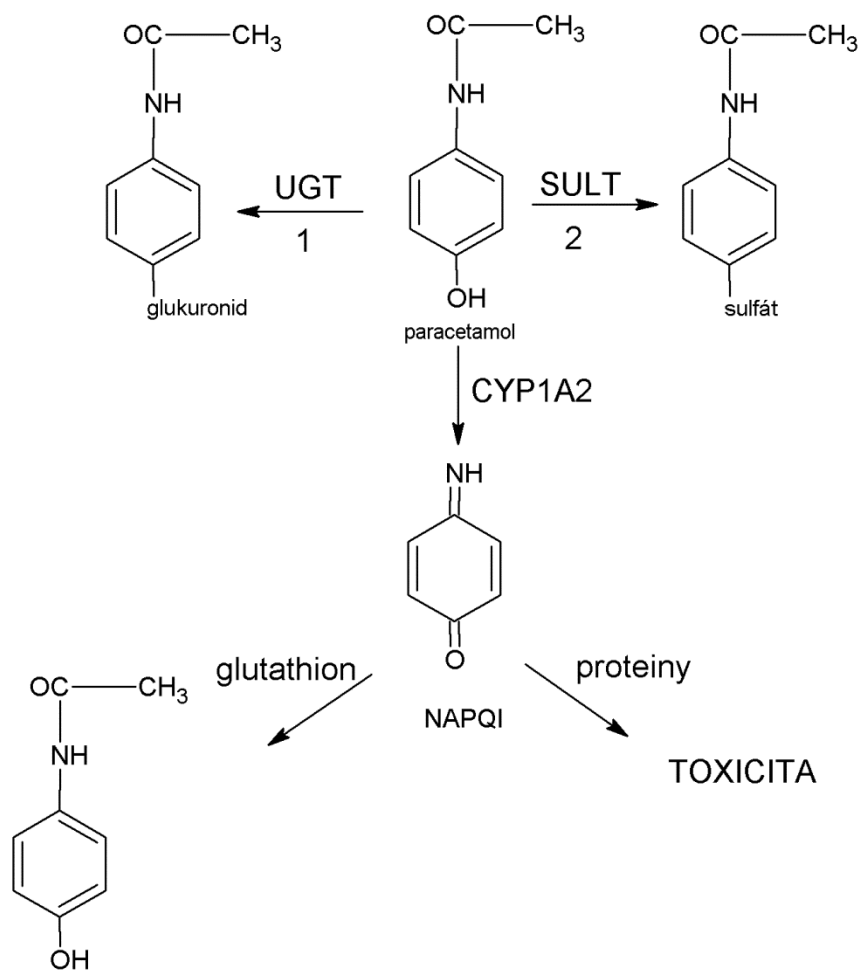
Obr. 14 Krystalová struktura cytochromu P450 1A1 v komplexu s α -naftoflavonem (Převzato podle <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4I8V>).

4.5.2 CYP1A2

Cytochrom P450 1A2 (Obr. 15) je na rozdíl od CYP1A1 lokalizován pouze v játrech, kde je exprimován konstitutivně. Jeho substrátová specifita je poměrně vysoká, metabolizuje přibližně 5 % všech léčiv (Ingleman-Sundberg a Rodriguez-Antona 2005). Mezi nejčastěji metabolizovaná xenobiotika patří kofein, theofylin, fenacetin nebo paracetamol (acetaminofen) (Azenbacher a Azenbacherová, 2001). Paracetamol, léčivum používané jako analgetikum a antipyretikum, je prostřednictvím CYP1A2 biotransformován na elektrofilní *N*-acetyl-*p*-benzochinon imin (NAPQI) (Tonge *et al.*, 1998). Pokud je paracetamol užíván v doporučených dávkách, jedná se o bezpečný lék, je-li však přijímán v nadměrném množství, způsobuje masivní jaterní nekrózy (Zaher *et al.*, 1998). Tato toxicita je způsobena biotransformací acetaminofenu prostřednictvím zvýšeně exprimovaného CYP1A2 (Obr. 16). Za normálních podmínek je NAPQI detoxifikován konjugací s glutathionem (GSH). Při požití nadměrné dávky je však veškerý celulární GSH vyčerpán a další produkovaný NAPQI vytváří adukty s hepatocelulárními proteiny (Tonge *et al.*, 1998).



Obr. 15 Krystalová struktura cytochromu P450 1A2 v komplexu s α -naftoflavonem (Převzato podle <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2HI4>).



Obr. 16 Reakční schéma metabolické biotransformace paracetamolu prostřednictvím CYP1A2. Za normálních podmínek dochází k detoxifikaci *N*-acetyl-*p*-benzochinon iminu (NAPQI) glutationem. Pokud je zvýšena exprese CYP1A2 požitím nadměrné dávky paracetamolu, dochází k poškození jater (Převzato a upraveno podle Azenbacher a Azenbacherová, 2011).

Experimentální část

5 Materiál a chemikálie

5.1 Chemikálie

1-bromo-3-chloropropan (BCP, Sigma-Aldrich)

Dimethylsulfoxid (DMSO, 0,1 %, Sigma-Aldrich)

Dikumarol ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$, Sigma-Aldrich)

Dithiothreitol (DTT, Bio Basic Inc.)

Dodecylsírán sodný (SDS, Sigma-Aldrich)

Dulbecco's Eagle modified medium (DMEM, Invitrogen)

7-ethoxyresorufin (ER, $8 \mu\text{mol.l}^{-1}$, Sigma-Aldrich)

Isopropanol (Lach-Ner)

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

jetPEI[®] transfekční činidlo ($7,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, Polypus transfection[™])

Kozí polyklonální protilátka proti CYP1A1 (G-18) (Santa Cruz Biotechnology)

Kozí polyklonální protilátka proti aktinu (I-18) (Santa Cruz Biotechnology)

Králičí sekundární protilátka IgG značená křenovou peroxidasou (Santa Cruz Biotechnology)

Luminol (Santa Cruz Biotechnology)

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid (MTT, 5 mg.ml^{-1} , Sigma-Aldrich)

Peroxosírán amonný (APS, Bio Basic Inc.)

Plasmid *pDRE-luc* (dar od Dr. L. Poellinger, Stockholm, Švédsko)

Plasmid *pIA1-luc* (Promega)

RNase-free H₂O (Applied Biosystems)

RT Master Mix (Applied Biosystems)

TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems)

N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED, Bio Basic Inc.)

TRI Reagent Solution (Applied Biosystems)

Trypsin (Sigma-Aldrich)

Trypanová modř (Sigma-Aldrich)

standardy BSA (Thermo Scientific)

2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD, Ultra Scientific)

5.2 Rostoky

PBS: 135 mmol.l⁻¹ NaCl, 2,7 mmol.l⁻¹ KCl, 9 mmol.l⁻¹ Na₂HPO₄, 1,5 mmol.l⁻¹ K₂HPO₄, pH 7,4

15 % Triton X-100: 5 ml Triton X-100 + 32,5 ml PBS

0,1 % Triton X-100: 0,3 ml Triton X-100 + 44,7 ml PBS

75 % ethanol: 33,75 ml bezvodého ethanolu + 11,25 ml RNase-free H₂O

čínidlo BCA: 10 ml reagent A + 0,2 ml reagent B (50:1), 13 ml reagent A + 0,26 ml reagent B (50:1)

Lyzační pufr: 50 mmol.l⁻¹ Tris, 1 mmol.l⁻¹ NaF 1 mmol.l⁻¹ EDTA, 1 mmol.l⁻¹ Na₃VO₄, 1 mmol.l⁻¹ fenylmethylsulfonylfluorid, inhibitor proteas Complet (Roche Diagnostics), 0,2 % SDS, 1 % Triton X-100, pH 7,4

Towbinův transferový pufr: 25 mmol.l⁻¹ Tris, methanol (20 %), 192 mmol.l⁻¹ glycin, pH 8,3

Tris-buffered saline (TBS): 0,1 mol.l⁻¹ Tris + 0,137 mol.l⁻¹ NaCl, pH 7,4

Tris-buffered saline/Tween-20 (TBS/T): 0,1 mol.l⁻¹ Tris + 0,137 mol.l⁻¹ NaCl + Tween-20 (0,05 %), pH 7,4

Tris-buffered saline/Tween-20/5% mléko (TBS/T/5 % mléko): 0,1 mol.l⁻¹ Tris + 0,137 mol.l⁻¹ NaCl + Tween-20 (0,05 %), + 5 % sušené odtučněné mléko

5.3 Pístroje

centrifuga	Minispin® (Eppendorf)
luminometr	Single tube luminometer FB12 (Berthold)
nanofotometr	NanoPhotometer™ Pearl (Implen)
odsávačka	Aspiration Station (Gilson Safe)
set pro elektroforézu/ western blot	Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad)
spektrofotometr	Infinite®M200 Pro (Tecan)

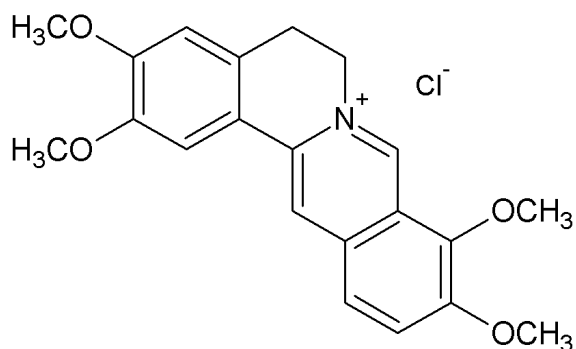
termomixér	Thermomixer Comfort (Eppendorf)
třepačka	DuoMax 1030 (Heidolph)
váhy	Instrument ACB 600 H
vodní lázeň	OLS 200 (Grant)
vortex	Vortex mixer VX-200 (Labnet)
zařízení pro PCR	LightCycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostics)

5.4 Studované látky

Palmatin chlorid (PAL) - (No.311615) - zakoupen od firmy Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)

PAL 50 mmol.l ⁻¹	(22,1635 mg palmatin chlorid + 1 ml DMSO)
PAL 25 mmol.l ⁻¹	(100 µl PAL (50 mmol.l ⁻¹) + 100 µl DMSO)
PAL 10 mmol.l ⁻¹	(40 µl PAL (50 mmol.l ⁻¹) + 160 µl DMSO)
PAL 1 mmol.l ⁻¹	(20 µl PAL (10 mmol.l ⁻¹) + 180 µl DMSO)

Ve všech experimentech byl palmatin (Obr. 17) studován ve čtyřech finálních koncentracích 1, 10, 25, 50 µmol.l⁻¹



Obr. 17 Chemická struktura testovaného alkaloidu palmatinu.

5.5 Biologický materiál

5.5.1 Buňky HepG2

(No. 85011430) - zakoupeny od firmy ECACC, Salisbury, UK. Pocházejí z jaterní biopsie 15-ti letého chlapce se zcela diferencovaným hepatocelulárním karcinomem.

Jedná se o lidskou hepatomovou buněčnou linii, která je užívána jako *in vitro* model, např. při testování látek pro jejich toxicitu, vlastnosti a možnosti rizika rozvoje rakoviny (Wilkening et al., 2003). Buňky HepG2 sekretují celou řadu významných plasmatických bílkovin, např. albumin, transferin, plasminogen, 1-antitrypsin, α 2-makroglobulin atd., ale i enzymů. Neexprimují enzym CYP1A2, ale pouze CYP1A1 (Wilkening et al., 2003).

5.5.2 Primární kultury lidských hepatocytů

Vzorky lidské jaterní tkáně byly získány od multiorgánových dárců s normální jaterní histologií a zpracovány dle protokolů, které byly schváleny etickou komisí Fakultní nemocnice Olomouc.

Buňky primárních kultur lidských hepatocytů obsahují v membráně endoplasmatického retikula enzymy biotransformace xenobiotik a vylučují do média plasmatické bílkoviny a proteiny akutní fáze (Kosina *et al.*, 1999).

V této diplomové práci byly použity kultury hepatocytů pocházející od čtyř dárců:

- kultura LH45 - 46-ti letý muž
- kultura LH47 - 65-ti letý muž
- kultura LH48 - 17-ti letá dívka
- kultura LH49 – 38 letý muž

6 Metody

6.1 Kultivace buněk HepG2

Lidská hepatomová buněčná linie HepG2 byla pěstována v médiu DMEM, do kterého bylo přidáno $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ streptomycinu, $100 \text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ penicilinu, 1 % neesenciálních aminokyselin a 10 % hovězího sérového albuminu. Kultivace probíhala v inkubátoru při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a v atmosféře obsahující 5 % CO_2 , kde docházelo k růstu buněk v monovrstvě po dobu několika dnů.

Před dosažením konfluence byly buňky pasážovány. Pasážování bylo realizováno odstraněním média z buněk a následným dvojnásobným promytím buněk PBS. Pro uvolnění buněk z povrchu kultivační nádoby byl použit enzym trypsin, se kterým byly buňky inkubovány v inkubátoru po dobu 7 min ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2). Po inkubaci bylo k buňkám přidáno 5 ml sérového média a byly přeneseny do nové kultivační nádoby. V experimentech byly používány buňky ze 4. – 15. pasáže.

Aby byla zjištěna koncentrace buněk, byly počítány pod mikroskopem. Buňky byly barveny trypanovou modří a naneseny na Bürkerovu komůrku, kde byly počítány při pětinasobném ředění (20 μl buněk + 80 μl trypanové modří).

Vztah pro výpočet koncentrace buněk (X):

$$X = \text{počet buněk} \times 5 \text{ (ředění)} \times 10\,000 \text{ [b/ml]}$$

Buňky byly vysety při koncentraci 1×10^5 b/ml na 24-jamkovou desku a po jednodenní stabilizaci k nim bylo přidáno čerstvé médium spolu s palmatinem ve čtyřech testovaných koncentracích (1, 10, 25, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 0,1 % (v/v) DMSO jako negativní kontrola a TCDD (5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo 1,5 % (v/v) Triton X-100 jako pozitivní kontrola.

6.2 Kultivace lidských hepatocytů

Izolované lidské hepatocyty byly kultivovány v kultivačním médiu s přídavkem 5% hovězího sérového albuminu. Buňky byly vysety při koncentraci $1,3 \times 10^5$ buněk/ml na

kolagenem pokryté kultivační desky a po 24 hod stabilizaci bylo médium odsáto a k buňkám bylo přidáno médium bez obsahu séra. Dále byl k buňkám přidán palmatin v koncentraci 1, 10, 25, 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 0,1 % (v/v) DMSO jako negativní kontrola a TCDD (5 nmol.l^{-1}) nebo 1,5 % (v/v) Triton X-100 jako pozitivní kontrola.

6.3 MTT test

Viabilita buněk HepG2, po přidání čtyř různých koncentrací alkaloidu palmatinu (1, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), 0,1 % DMSO jako negativní kontroly a 1,5 % Tritonu X-100 jako pozitivní kontroly, byla stanovována kolorimetricky prostřednictvím MTT testu. Test je založen na redukci žlutého MTT na modrofialový formazán živými buňkami, které nemají poškozené mitochondrie (Wan *et al.*, 1994). Buňky HepG2 na 24-jamkové desce byly nejprve promyty 1 ml PBS, poté byl přidán 1 ml média s obsahem MTT ($0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) a buňky byly 24 hod inkubovány v inkubátoru při teplotě 37°C a atmosféře 5% CO_2 . Po inkubaci buněk bylo médium odsáto a buňky byly rozpuštěny v 0,5 ml DMSO s přídavkem 1 % amoniaku. Vzniklý modrofialový formazán byl stanovován spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm. Měření bylo prováděno ve třech opakováních. Průměrná hodnota absorbance byla použita pro výpočet viability buněk, kdy buňky s přídavkem DMSO představovaly 100% viabilitu.

Vztah pro výpočet viability:

$$\text{viabilita} = \frac{A(\text{PAL}) - A(\text{TritonX})}{A(\text{UT}) - A(\text{TritonX})} \cdot 100 (\%)$$

A absorbance

UT kontrola

PAL palmatin

6.4 Exprese reportérového genu

Pro testování byly užity dva plasmidy, *pIA1-luc* a *pDRE-luc*. Plasmid *pDRE-luc* byl použit k tomu, aby bylo zjištěno, zda dojde k aktivaci AhR testovanými látkami a obsahoval pouze vazebné místo pro AhR a reportérový gen luciferasy. Plasmid *pIA1-luc* obsahoval na 5' konci úsek (-1566 až +73) pro lidský gen *CYP1A1* a reportérový gen luciferasy. Tento plasmid byl naklonován do vektoru *KpnI-HindIII-pGL3* a sloužil ke zjištění, zda bude aktivována transkripce genu *CYP1A1* testovanými látkami.

Buňky HepG2 byly před dosažením konfluency uvolněny ze stěny kultivační nádoby trypsinem a přeneseny do 1 ml média bez séra. Následně byly tyto buňky transfekovány 210 ng *pDRE-luc* nebo *pIA1-luc* použitím jetPEI[®] transfekčního činidla. Transfekované buňky byly vysety na 24-jamkovou desku v množství $8,3 \times 10^4$ buněk/jamka a inkubovány přes noc v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂). Po inkubaci bylo k buňkám v každé jamce přidáno 1 ml sérového média s obsahem 0,1 % DMSO (negativní kontrola), palmatinu (1, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) nebo TCDD (5 nmol.l^{-1} , pozitivní kontrola). Takto připravené buňky byly analyzovány na luminometru FB 12 použitím systému ke stanovení aktivity luciferasy. Získané hodnoty luminiscence byly následně použity pro výpočet násobků změn oproti kontrole.

6.5 Izolace celkové RNA ze vzorků

Médium buňek, po inkubaci s palmatinem (1, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), 0,1% DMSO (negativní kontrola) a TCDD (5 nmol.l^{-1} , pozitivní kontrola), bylo odsáto a byl přidán 1 ml TRI Reagentu, který způsobil lýzi buněk. Lyzát byl přenesen do 1,5 ml zkumavek, vortexován a ponechán 5 min stát. Pokud se vzorky nepracovaly ihned, byly uchovávány pro další práci v mrazáku při teplotě -80 °C.

Do zkumavek se vzorkem bylo napipetováno 100 μl BCP, vzorky byly silně vortexovány po dobu 15 s, inkubovány 10 min při pokojové teplotě a centrifugovány 10 min při 4 °C a 1200g (Minispin). Po centrifugaci byla vodná fáze odebrána do zkumavek a bylo k ní přidáno 500 μl isopropanolu. Následně proběhlo opět vortexování po dobu 10 s, inkubace po dobu 10 min a centrifugace 8 min při 4 °C a 1200 g (Minispin). Po odsání supernatantu byl k peletu buněk přidán 1 ml 75 % ethanolu, aby

došlo k jeho uvolnění. Vzorek byl poté ještě dále centrifugován 5 min při 4 °C a 7500g (Minispin). Poté byl pipetou odstraněn veškerý ethanol, pro jehož dokonalé odstranění byl vzorek 30 s centrifugován při 4 °C. Pelet byl sušen několik minut na vzduchu a rozpuštěn v 35 µl vody bez obsahu ribonukleas a byla stanovována koncentrace RNA.

6.6 Stanovení koncentrace RNA

Na nanofotometr byly napipetovány 2 µl H₂O bez obsahu ribonukleas a proběhlo vynulování při 260 nm. Následně byly vloženy vždy 2 µl vzorku izolované RNA a byla stanovována koncentrace RNA v ng/µl a poměr A₂₆₀/A₂₈₀. Tento poměr by měl být v rozsahu 1,8 – 2,2.

6.7 Reverzní transkripce (RT)

Do 1,5 ml zkumavek byl napipetován takový vypočítaný objem izolované RNA, aby množství této RNA v každé zkumavce činilo 2 µg. Následně byl objem doplněn do 10 µl vodou bez obsahu ribonukleas. K této směsi bylo přidáno 10 µl RT MasterMixu a po krátké centrifugaci byly vzorky inkubovány 10 min při 25 °C a poté 2 hod při 37 °C v termomixeru při 0 rpm. Ihned po inkubaci byly vzorky opět krátce centrifugovány a naředěny. Pokud se se vzorky nepracovalo ihned, byly uchovávány v mrazáku při -20 °C.

Složení a objem látek v MasterMixu na 1 reakci - celkový objem 10 µl:

2 µl pufru pro RT

0,8 µl dNTPs (ředění 25x)

2µl primeru

4,2 µl vody bez obsahu RNas

1 µl MultiScribe RTasy

MasterMix byl připraven vždy pro všechny vzorky najednou těsně před použitím.

6.8 Kvantitativní real-time PCR

Vzorky cDNA byly rozmrazeny na ledu, vytemperovány na pokojovou teplotu, krátce centrifugovány (15 s) a vortexovány. Dále byla připravena směs 5 µl TaqMan Universal PCR Master Mixu a 0,5 µl a TaqMan Gene Expression Assays (ředění 10:1). Obě směsi obsahovaly specifické primery a TaqMan sondu vážící se do malého zářezu DNA, značenou fluoresceinem. Na desku pro PCR bylo napipetováno 4,5 µl ředěného vzorku cDNA a přidáno 5,5 µl směsi TaqMan MasterMix/TaqMan GEx Assay. Deska byla překryta fólií a centrifugována 2 min při 1500 g. Následně byla spuštěna analýza na přístroji LightCycler 480 (Roche). ID pro CYP1A1: Hs00153120_m1, pro CYP1A2: Hs010703369_m2, pro 18S: Hs99999901_s1 a pro GAPDH: Hs99999905-m1.

Amplifikace probíhala při následujícím nastavení programu:

2 min při 50°C

10 min při 95°C

15 s při 95°C (40 cyklů)

1 min při 60°C (40 cyklů)

Hodnoty C_T byly stanoveny pomocí analýzy druhého derivačního maxima. Změny v genové expresi byly vypočteny použitím $2^{-\Delta\Delta C_T}$ a výsledky byly normalizovány vzhledem k hladinám GAPDH mRNA a 18S rRNA.

Vztah pro výpočet druhého derivačního maxima (y):

$$\Delta UT = C_{P(CYP)} - C_{P(GAPDH)}$$

$$\Delta PAL = C_{P(CYP)} - C_{P(GAPDH)}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta PAL - \Delta UT$$

$$y = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

6.9 Gelová elektroforéza (SDS-PAGE), Western blot

Z buněk, které byly po dobu 24 hod inkubovány s palmatinem (1, 10, 25 a 50 µmol.l⁻¹), 0,1 % DMSO (negativní kontrola) a TCDD (5 nmol.l⁻¹, pozitivní kontrola), bylo odsáto

médium a byly dvakrát promyty PBS. Poté byl přidán 1 ml PBS a buňky byly seškrábány do 1,5 ml zkumavky. Následně byla suspenze centrifugována 3 min při 1600 g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a precipitát lyzován v 100 µl lyzačního pufru. Lyzát byl udržován 30 min na ledu za občasného protřepávání a poté centrifugován při 4 °C po dobu 10 min a 16 000 g. V supernatantu bylo stanovováno množství proteinu metodou BCA. Na 96-jamkovou desku bylo napipetováno 19 µl H₂O + 1 µl vzorku nebo 20 µl standardu. Do všech jamek bylo poté přidáno 200 µl činidla BCA a deska byla dána na 30 min do inkubátoru (37 °C, atmosféra 5% CO₂). Po uplynutí 30 min byla měřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Z naměřené absorbance standardů byla následně sestavena kalibrační přímka a podle ní vypočten objem vzorku s množstvím proteinu 30 µg pro rozdělení pomocí gelové elektroforézy (SDS-PAGE).

Podle tab. 2 byl připraven dělicí gel (10 %) a zaostřovací gel (4%). Polymerace dělicího gelu byla zahájena přidavkem 10 % peroxosíranu amonného (APS) a po rychlém promíchání byl gel nanesen mezi odmaštěné skleněné desky (1,5 cm). Poté byl gel převrstven *n*-butanolem a ponechán tuhnout. Po 30 min byl *n*-butanol odstraněn, vymyt pomocí ddH₂O a gel byl vysušen filtračním papírem. Polymerace zaostřovací gelu byla opět zahájena přidavkem APS, po promíchání byl zaostřovací gel nanesen na dělicí gel, byl do něj vložen hřebínek a gel tuhl dalších 30 min při laboratorní teplotě. Po ztuhnutí byl z gelu odstraněn hřebínek a skla s gelem byla vložena do elektroforetické komůrky, do které byl nalit elektrodový pufr. Do jamek bylo naneseo 2,5 µl standardu molekulových hmotností a vypočítaný objem vzorků. Po uzavření aparatury byla elektrodová komůrka připojena ke zdroji konstantního proudu 0,03 A a poté byl zdroj navýšen na proud 0,06 A. Po ukončení dělení proteinů byl gel vyjmut ze skel a před přenesením na blot byl ponořen do Towbinova pufru.

Transfer proteinů z gelu na membránu byl realizován pomocí elektroblotingu. Byla připravena membrána (polyvinylidendifluoridová membrána - Immobilion P) o velikosti gelu – 8,5 x 6,5 cm, která byla nejprve hydratována 15 s v methanolu, 2 min v ddH₂O a 2 min v Towbinově transferovém pufru. Následně na sebe byly uspořádány tyto vrstvy: průhledná deska – houbička – filtr – membrána – gel – filtr – houbička – černá deska, které byly vloženy do blotovací kazety, v uspořádání kdy černá deska směřuje k černé a byl přidán Towbinův transferový pufr. Uzavřená kazeta byla vložena na led a připojena ke zdroji konstantního proudu 0,4 A na 2 hod. Po uplynutí 2 hod byla membrána vyjmuta z blotovací kazety a inkubována 5 min v Towbinově transferovém

pufri. Blokování probíhalo 2 hod při pokojové teplotě v TBS/T pufri a 5 % sušeném odtučněném mléce.

Tab. 2 Objemy složek pro přípravu dělicího a zaostřovacího gelu (hodnoty uvedeny v ml).

Typ gelu	TAE	AA/BIS	dd H₂O	SDS	TEMED	APS
	pufri	38,6%/1,4%		10%		
Dělicí (10%)	5,00	5,00	9,80	0,20	0,02	0,20
Zaostřovací (4%)	1,66	0,88	4,06	0,066	0,01	0,05

Proteiny CYP1A1/2 byly detekovány přidáním kozí polyklonální protilátky proti CYP1A1 (G-18), aktin byl detekován pomocí kozí polyklonální protilátky proti aktinu (I-19). Detekce probíhala tak, že do dvou zkumavek (pro CYP1A1 a pro aktin) bylo napipetováno 5 ml 5 % BSA v TBS/T (10 ml TBS/T + 0,5 g BSA) a 10 µl primární protilátky a obsah těchto zkumavek byl aplikován na membrány. Inkubace s protilátkami probíhala přes noc. Následující den byly membrány propláchnuty 5 x 5 min v TBS/T a primární protilátky byly detekovány sekundární protilátkou. Pro detekci primární protilátky byly opět použity dvě zkumavky. Do každé z nich bylo napipetováno 5 ml 5 % BSA v TBS/T a 2,5 µl králičí sekundární protilátky značené křenovou peroxidasou v případě CYP1A1/2, v případě aktinu 1 µl králičí sekundární protilátky značené křenovou peroxidasou. Inkubace se sekundární protilátkou probíhala po dobu 1,5 hod a po uplynutí této doby byla membrána propláchnuta 6 x 5 min v TBS/T a přenesena ve svislé poloze mezi fólie. Na membránu byl aplikován substrát pro křenovou peroxidasu (3 ml luminolu + 3 ml H₂O₂) a s tímto substrátem byla membrána inkubována 2 min. Membrána ve fólii byla poté přenesena na fotografickou kazetu a ve fotokomoře byla po tmě probíhající chemiluminiscenční reakce detekována na fotopapír.

6.10 EROD test

V buněčné kultuře HepG2 a primárních kulturách lidských hepatocytů byla fluorimetricky měřena aktivita enzymů CYP1A jako deethylasová aktivita 7-ethoxyresorufinu.

Buňky, které byly inkubovány 24 hod s palmatinem (1, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), 0,1 % DMSO (negativní kontrola) a TCDD (5 nmol.l^{-1} , pozitivní kontrola), byly promyty PBS. Následně bylo přidáno 0,75 ml média bez séra s obsahem ethoxyresorufinu (8 mmol.l^{-1}) a dikumarolu (10 mmol.l^{-1}), které bylo připraveno smícháním 5 ml média s 5 μl ethoxyresorufinu a 5 μl dikumarolu. Dikumarol zde působí jako látka blokující aktivitu cytosolárního enzymu diaphorasa, která má podobnou aktivitu jako CYP1A (Keyes *et al.*, 1984). S těmito látkami byly buňky inkubovány po dobu 30 min v inkubátoru při teplotě 37°C a v atmosféře 5% CO_2 . Poté byla spektrofotometricky měřena fluorescence vzniklého resorufinu v médiu při nastavení excitační vlnové délky 530 nm a emisní vlnové délky 585 nm.

Dále bylo stanovováno množství celkového proteinu v jamce metodou Bradfordové. Médium bylo odsáto a buňky propláchnuty PBS. Poté byly buňky rozpuštěny a lyzát byl přenesen do 1,5 ml zkumavky a dán na 10 s do ultrazvukové lázně. Do každé jamky bylo nanášeno 9 μl H_2O a 1 μl vzorku. Do 6 jamek bylo nanášeno 10 μl standardu BSA se vzrůstající koncentrací. Následně bylo do všech jamek přidáno 200 μl Bradfordova činidla a látky s ním byly inkubovány po dobu 5 min. Po 5 minutách bylo množství proteinu stanovováno spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm.

Hodnoty fluorescence byly standardizovány vůči stanovenému množství proteinů a výsledky byly následně použity pro výpočet násobků změn oproti kontrole.

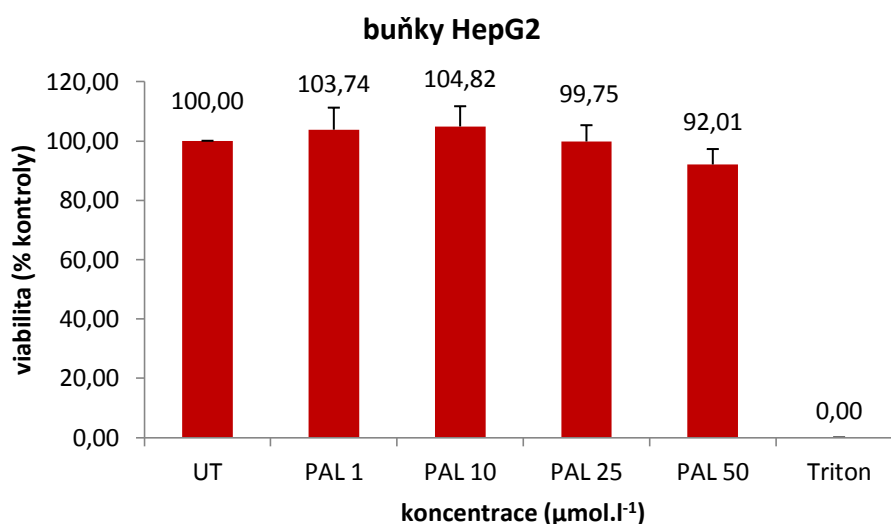
Vztah pro výpočet násobků změn oproti kontrole (UT):

$$\text{násobky UT} = \frac{\frac{\text{fluorescence (vzorek)}}{c \text{ (vz) protein}}}{\frac{\text{fluorescence (UT)}}{c \text{ (UT) protein}}}$$

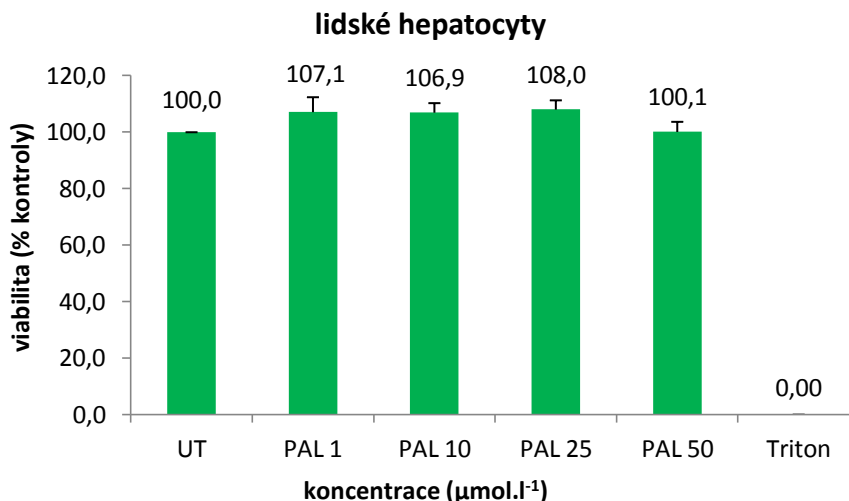
7 Výsledky

7.1 Vliv palmatinu na viabilitu buněk HepG2 a primárních kultur lidských hepatocytů

U testovaného alkaloidu palmatinu byla nejprve hodnocena jeho možná cytotoxicita vůči lidským hepatomovým buňkám HepG2 a primárním kulturám lidských hepatocytů pomocí redukčního testu MTT. Palmatin byl testován v koncentracích 1, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Koncentrace byly zvoleny právě takto, jelikož berberin, alkaloid strukturně velmi podobný palmatinu, v těchto koncentracích ovlivňuje aryluhlovodíkový receptor a indukuje expresi CYP1A (Vrzal *et al.*, 2005). Buňky HepG2 a primární kultury lidských hepatocytů byly po dobu 24 hod inkubovány s palmatinem a kontrolami a poté byl sledován vliv na viabilitu. Bylo zjištěno, že po 24 hod inkubaci způsobuje palmatin mírný pokles viability buněk HepG2 na 92 %, a to pouze v nejvyšší testované koncentraci 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (Obr. 18) V primárních kulturách lidských hepatocytů byl i po 24 hod inkubaci vliv palmatinu na viabilitu buněk zanedbatelný (Obr. 19).



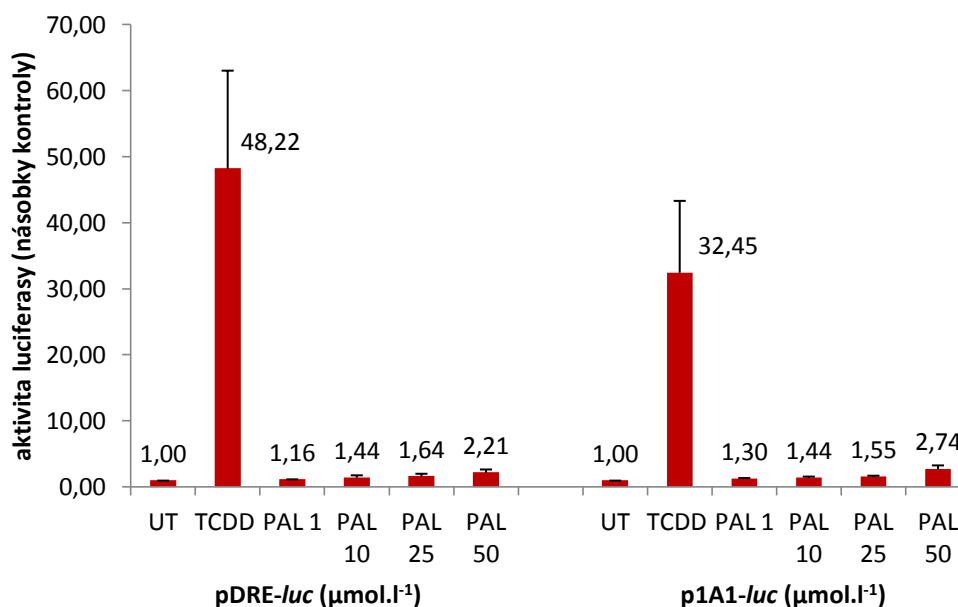
Obr. 18 Vliv palmatinu na viabilitu buněk HepG2. Buňky HepG2 byly inkubovány s 0,1 % DMSO (UT, negativní kontrola), palmatinem (PAL - 1, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a 1,5 % Tritonem X-100 (pozitivní kontrola). Viabilita byla stanovena spektrofotometricky prostřednictvím MTT testu při vlnové délce 540 nm. Data jsou vyjádřena vůči kontrole, která představuje viabilitu 100 %.



Obr. 19 Vliv palmatinu na viabilitu primárních kultur lidských hepatocytů. Lidské hepatocyty byly inkubovány s 0,1 % DMSO (UT, negativní kontrola), palmatinem (PAL - 1, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a 1,5 % Tritonem X-100 (pozitivní kontrola). Viabilita byla stanovena spektrofotometriky prostřednictvím MTT testu při vlnové délce 540 nm. Data jsou vyjádřena vůči kontrole, která představuje viabilitu 100 %.

7.2 Vliv palmatinu na aktivitu AhR a transkripci CYP1A1 v transformovaných buňkách HepG2

V tomto experimentu byl testován vliv palmatinu na aktivitu AhR a následnou transkripci *CYP1A1*. Buňky HepG2 byly transfekovány dvěma plasmidy. Plasmidem *pDRE-luc*, který obsahoval pouze vazebné místo pro AhR zatímco *p1A1-luc* měl inkorporován promotor pro *CYP1A1*. Buňky byly inkubovány 24 hod s palmatinem (1, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), 0,1 % DMSO (negativní kontrola) a TCDD (5 nmol.l^{-1} , pozitivní kontrola), který patří mezi nejsilnější aktivátory AhR (Vrzal *et al.*, 2004). TCDD aktivoval *pDRE-luc* 48-krát silněji než kontrola, zatímco *p1A1-luc* byl prostřednictvím TCDD aktivován 32-krát silněji než kontrola. Palmatin, ve srovnání s TCDD, aktivoval oba plasmidy mnohem slaběji. Nejsilnější byla tato aktivace při nejvyšší testované koncentraci palmatinu 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, kdy byla zvýšena aktivita *pDRE-luc* 2,2-krát a aktivita *p1A1-luc* 2,7-krát (Obr. 20).



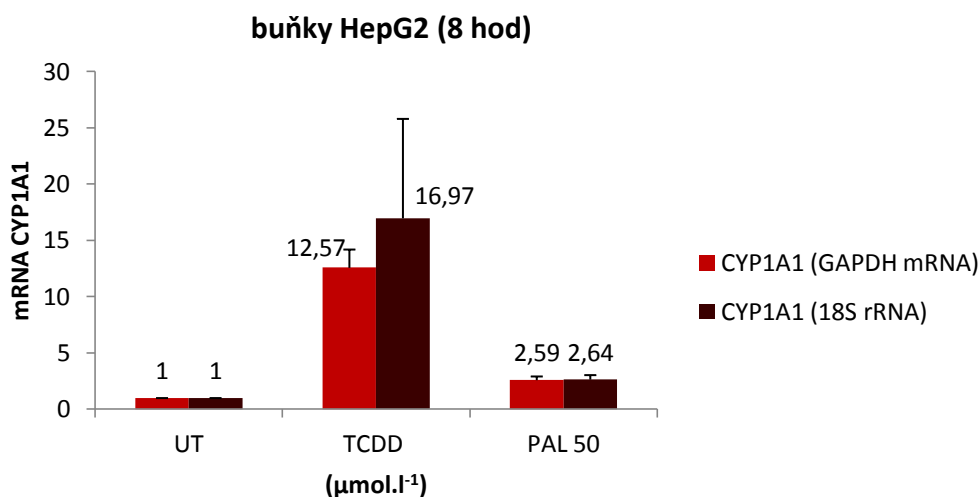
Obr. 20 Vliv palmatinu na transkripční aktivitu buněk HepG2 transfekovaných plasmidem *pDRE-luc* a *p1A1-luc*. Buňky byly transientně transfekovány plasmidy *pDRE-luc* a *p1A1-luc* a následně inkubovány 24 hod s 0,1 % DMSO (UT, negativní kontrola), palmatinem (PAL - 1, 10, 25 a 50 μmol.l⁻¹) a TCDD (5 nmol.l⁻¹, pozitivní kontrola). V buněčných lyzátech pak byla luminometricky stanovována aktivita luciferasy.

7.3 Vliv palmatinu na hladinu mRNA CYP1A u buněk HepG2 a primárních kultur lidských hepatocytů

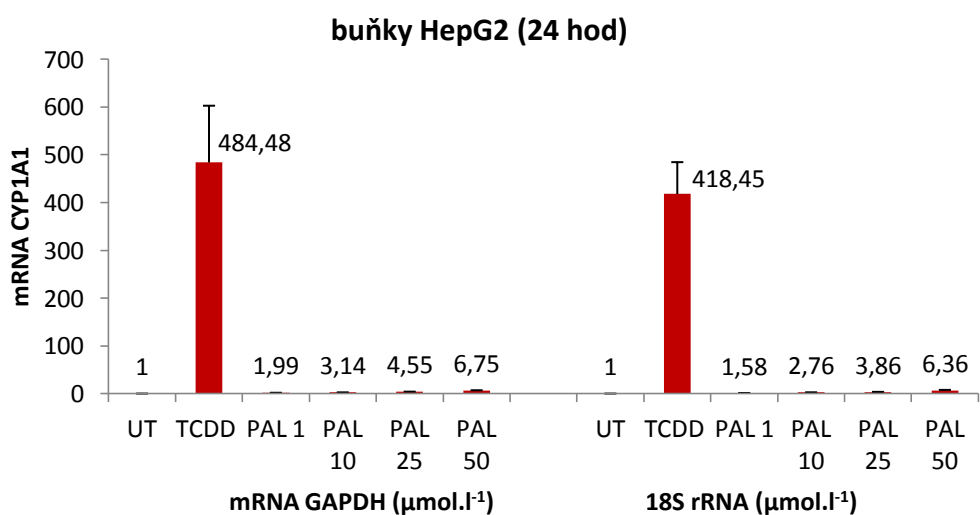
Podrodina CYP1A obsahuje dva izoenzymy, CYP1A1 a CYP1A2. Jelikož buňky HepG2 neexprimují enzym CYP1A2, byl v této buněčné linii měřen pouze vliv palmatinu na hladinu mRNA CYP1A1. Pro sledování změn hladiny mRNA byla použita metoda kvantitativní real-time PCR. Výsledky ukazují, že již po 8 hod inkubaci palmatin o koncentraci 50 μmol.l⁻¹ zvyšuje genovou expresi CYP1A1 v buňkách HepG2 (Obr. 21). Hladina mRNA zde byla zvýšena 2,6-krát. TCDD po 8 hod zvyšuje hladinu mRNA 12,6-krát ve srovnání s kontrolou. Tyto výsledky byly normalizovány na mRNA GAPDH. Výsledky byly také normalizovány na 18S rRNA. V tomto případě zvyšoval palmatin o nejvyšší testované koncentraci 50 μmol.l⁻¹ hladinu mRNA 2,6-krát a TCDD 17-krát. Po 24 hod inkubaci buněk HepG2 s palmatinem byla hladina mRNA významně zvýšena, a to od koncentrace 10 μmol.l⁻¹ (Obr. 22). Pokud se jedná o normalizaci na mRNA GAPDH, palmatin v koncentracích 10, 25 a 50 μmol.l⁻¹ zvyšoval hladinu

mRNA 3,1-krát, 4,5 krát a 6,8 krát ve srovnání s kontrolou. TCDD po 24 hod inkubaci zvyšoval hladinu mRNA CYP1A1 484,5-krát. Při normalizaci na 18S rRNA zvyšoval palmatin v koncentraci 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 24 hod expresi CYP1A1 2,8-krát, 3,9-krát a 6,4-krát. TCDD zvyšoval expresi CYP1A1 418,5-krát. Zvýšení exprese mRNA CYP1A1 v buňkách HepG2 je tedy závislé jak na testované koncentraci palmatinu, tak na délce jeho inkubace s těmito buňkami.

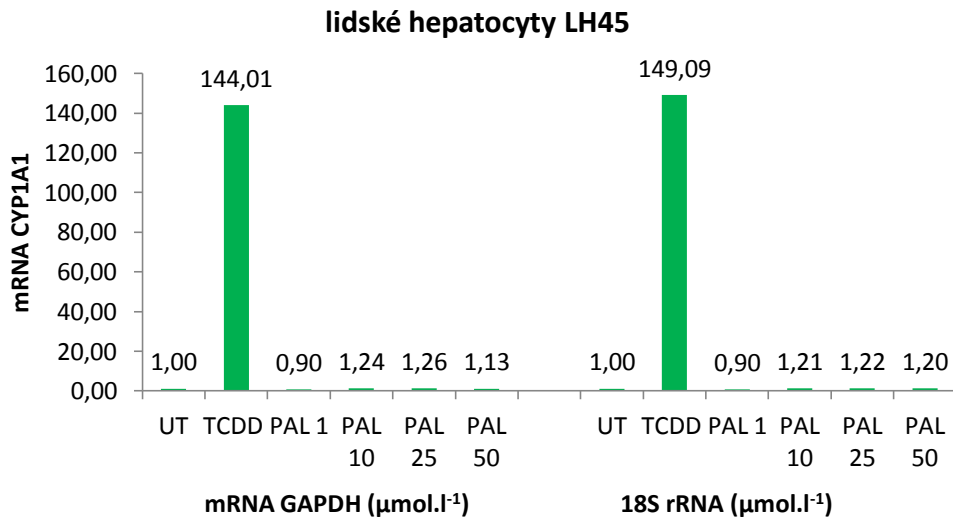
V primárních kulturách lidských hepatocytů byl po 24 hod inkubaci pozorován menší vliv palmatinu na expresi CYP1A než v buňkách HepG2. Ovlivnění této exprese látkami se lišilo v závislosti na použité kultuře lidských hepatocytů. Výsledky byly normalizovány na mRNA GAPDH a 18S rRNA. V primárních kulturách lidských hepatocytů TCDD významně zvyšoval expresi CYP1A1 i CYP1A2. Výraznější zvýšení bylo pozorováno u mRNA CYP1A1, i přesto však toto zvýšení nebylo tak výrazné jako u buněk HepG2. Při normalizaci na mRNA GAPDH zvyšoval TCDD expresi genu *CYP1A1* 119-krát až 167-krát, exprese genu *CYP1A2* byla zvýšena 55-krát až 82-krát. V kulturách LH45 (Obr. 23), (Obr. 27) a LH49 (Obr. 30), (Obr. 28) způsoboval palmatin v koncentraci 1-50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ pouze nepatrné zvýšení hladiny mRNA CYP1A1 i CYP1A2. Mírné zvýšení mRNA CYP1A1 i CYP1A2 způsoboval palmatin v koncentraci 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ u kultur LH47 (Obr. 24), (Obr. 28) a LH48 (Obr. 25), (Obr. 29). Exprese však byla zvýšena pouze dvojnásobně až trojnásobně ve srovnání s kontrolou. Velmi podobné změny exprese CYP1A1 a CYP1A2 byly zjištěny při normalizaci na 18S rRNA. TCDD zvyšoval hladinu mRNA CYP1A1 102-krát až 210-krát, hladina mRNA CYP1A2 byla zvýšena 58-krát až 70-krát. Palmatin o koncentraci 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ zvyšoval hladinu mRNA CYP1 v kulturách LH45 a LH48 1,2-krát a 2,1-krát, hladina mRNA CYP1A2 byla zvýšena 1,6-krát a 1,7-krát ve srovnání s kontrolou. Zvýšení exprese mRNA CYP1A1 a CYP1A2 v primárních kulturách lidských hepatocytů je ovlivněno koncentrací palmatinu a typem použité kultury lidských hepatocytů.



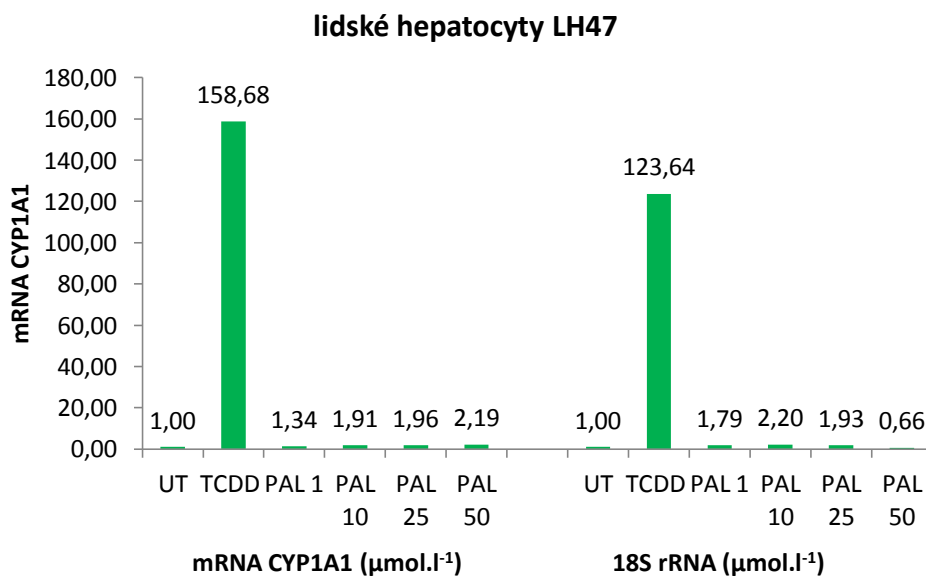
Obr. 21 Vliv palmatinu na expresi mRNA CYP1A1 v buňkách HepG2. Buňky HepG2 byly inkubovány 8 hod s 0,1% DMSO (UT, negativní kontrola), palmatinem (PAL - 1, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a TCDD (5 nmol.l^{-1} , pozitivní kontrola). Ovlivnění hladiny mRNA CYP1A1 bylo zjišťováno prostřednictvím kvantitativní real-time PCR a normalizováno na mRNA GAPDH a 18S rRNA.



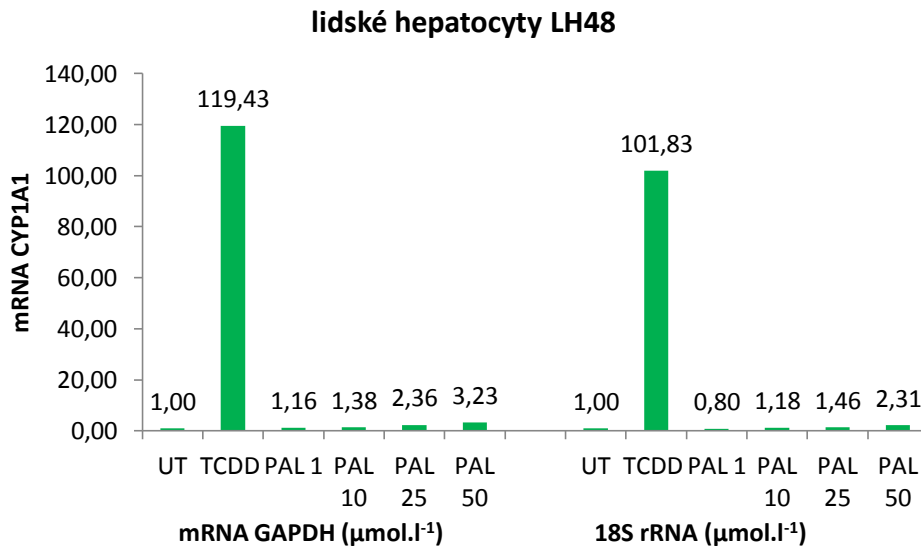
Obr. 22 Vliv palmatinu na expresi mRNA CYP1A1 v buňkách HepG2. Buňky HepG2 byly inkubovány 24 hod s 0,1% DMSO (UT, negativní kontrola), palmatinem (PAL - 1, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a TCDD (5 nmol.l^{-1} , pozitivní kontrola). Ovlivnění hladiny mRNA CYP1A1 bylo zjišťováno prostřednictvím kvantitativní real-time PCR a normalizováno na mRNA GAPDH a 18S rRNA.



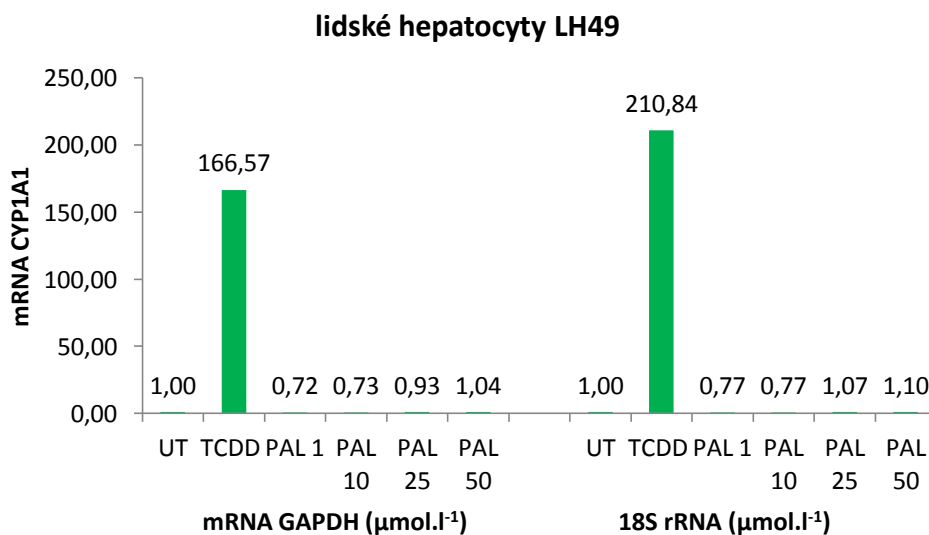
Obr. 23 Vliv palmatinu na expresi mRNA CYP1A1 v primárních kulturách lidských hepatocytů. Lidské hepatocyty (LH45) byly inkubovány 24 hod s 0,1% DMSO (UT, negativní kontrola), palmatinem (PAL - 1, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a TCDD (5 nmol.l^{-1} pozitivní kontrola). Ovlivnění hladiny mRNA CYP1A1 bylo zjišťováno prostřednictvím kvantitativní real-time PCR a normalizováno na mRNA GAPDH a 18S rRNA.



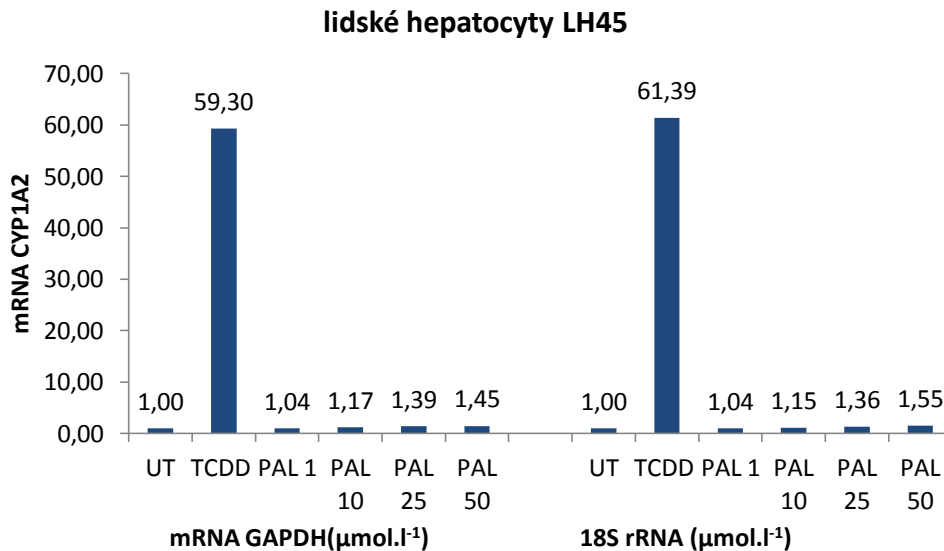
Obr. 24 Vliv palmatinu na expresi mRNA CYP1A1 v primárních kulturách lidských hepatocytů. Lidské hepatocyty (LH47) byly inkubovány 24 hod s 0,1% DMSO (UT, negativní kontrola), palmatinem (PAL - 1, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a TCDD (5 nmol.l^{-1} , pozitivní kontrola). Ovlivnění hladiny mRNA CYP1A1 bylo zjišťováno prostřednictvím kvantitativní real-time PCR a normalizováno na mRNA GAPDH a 18S rRNA.



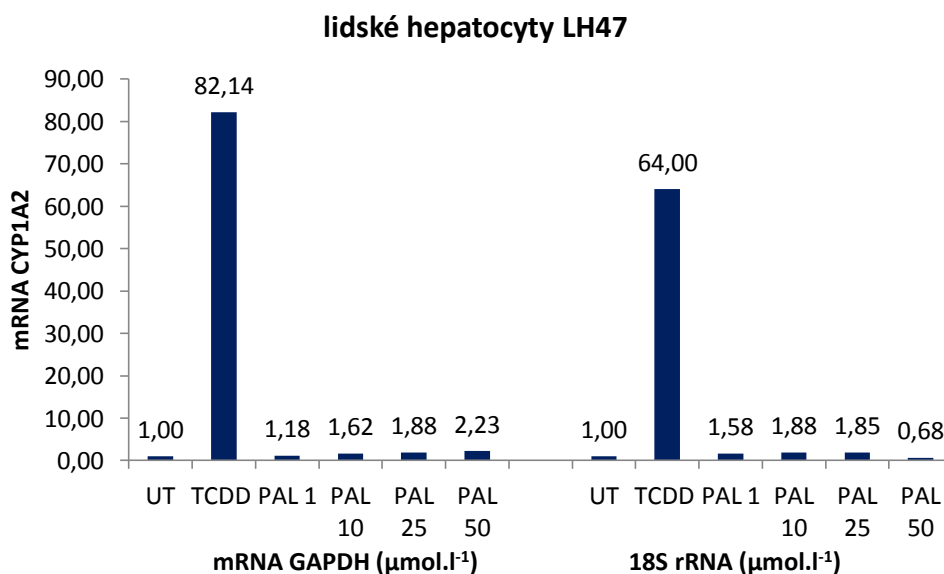
Obr. 25 Vliv palmatinu na expresi CYP1A1 mRNA v primárních kulturách lidských hepatocytů. Lidské hepatocyty (LH48) byly inkubovány 24 hod s 0,1% DMSO (UT, negativní kontrola), palmatinem (PAL - 1, 10, 25 a 50 μmol.l⁻¹) a TCDD (5 nmol.l⁻¹, pozitivní kontrola). Ovlivnění hladiny mRNA CYP1A1 bylo zjišťováno prostřednictvím kvantitativní real-time PCR a normalizováno na mRNA GAPDH a 18S rRNA.



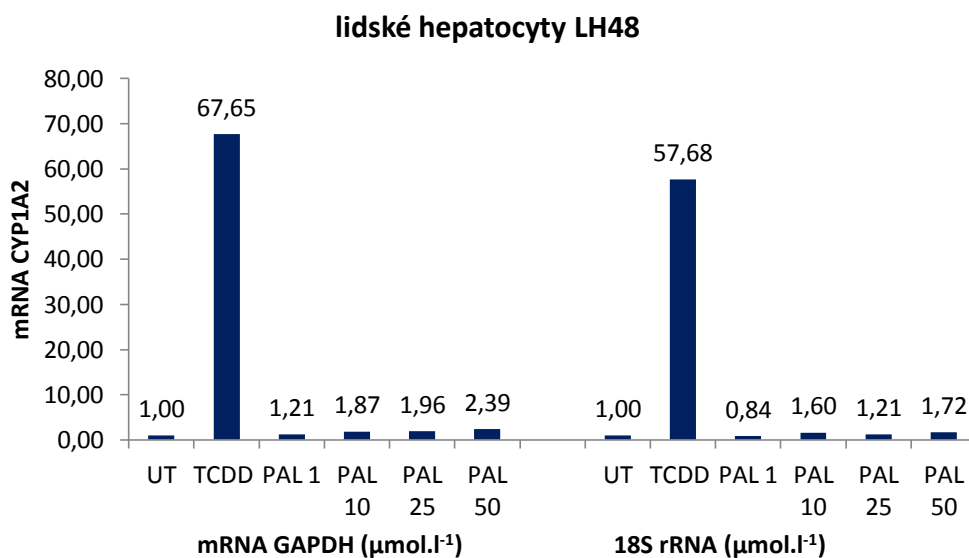
Obr. 26 Vliv palmatinu na expresi mRNA CYP1A1 v primárních kulturách lidských hepatocytů. Lidské hepatocyty (LH49) byly inkubovány 24 hod s 0,1% DMSO (UT, negativní kontrola), palmatinem (PAL - 1, 10, 25 a 50 μmol.l⁻¹) a TCDD (5 nmol.l⁻¹, pozitivní kontrola). Ovlivnění hladiny mRNA CYP1A1 bylo zjišťováno prostřednictvím kvantitativní real-time PCR a normalizováno na mRNA GAPDH a 18S rRNA.



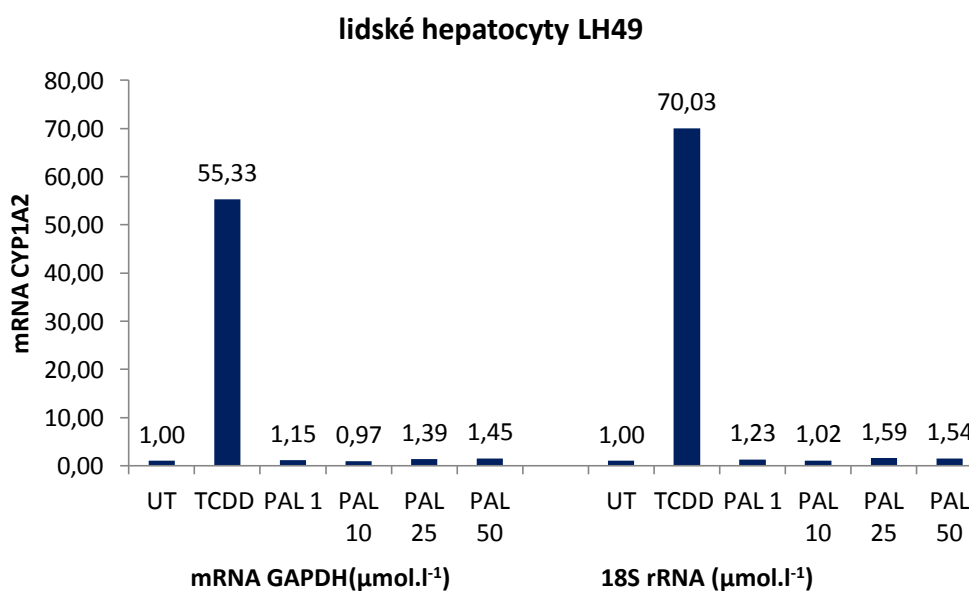
Obr. 27 Vliv palmatinu na expresi mRNA CYP1A2 v primárních kulturách lidských hepatocytů. Lidské hepatocyty (LH45) byly inkubovány 24 hod s 0,1% DMSO (UT, negativní kontrola), palmatinem (PAL - 1, 10, 25 a 50 μmol.l⁻¹) a TCDD (5 nmol.l⁻¹, pozitivní kontrola). Ovlivnění hladiny mRNA CYP1A2 bylo zjišťováno prostřednictvím kvantitativní real-time PCR a normalizováno na mRNA GAPDH a 18S rRNA.



Obr. 28 Vliv palmatinu na expresi mRNA CYP1A2 v primárních kulturách lidských hepatocytů. Lidské hepatocyty (LH47) byly inkubovány 24 hod s 0,1% DMSO (UT, negativní kontrola), palmatinem (PAL - 1, 10, 25 a 50 μmol.l⁻¹) a TCDD (5 nmol.l⁻¹, pozitivní kontrola). Ovlivnění hladiny mRNA CYP1A2 bylo zjišťováno prostřednictvím kvantitativní real-time PCR a normalizováno na mRNA GAPDH a 18S rRNA.



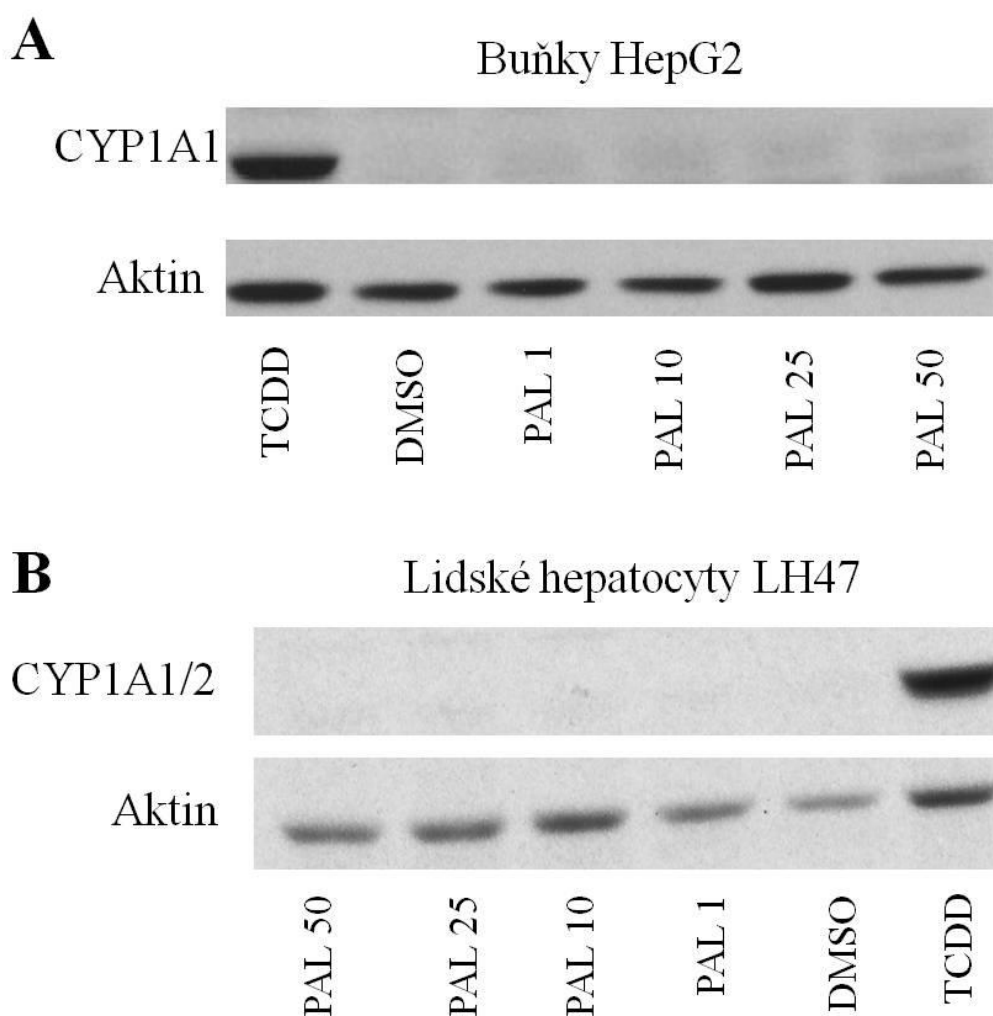
Obr. 29 Vliv palmatinu na expresi mRNA CYP1A2 v primárních kulturách lidských hepatocytů. Lidské hepatocyty (LH48) byly inkubovány 24 hod s 0,1% DMSO (UT, negativní kontrola), palmatinem (PAL - 1, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a TCDD (5 nmol.l^{-1} , pozitivní kontrola). Ovlivnění hladiny mRNA CYP1A2 bylo zjišťováno prostřednictvím kvantitativní real-time PCR a normalizováno na mRNA GAPDH a 18S rRNA.

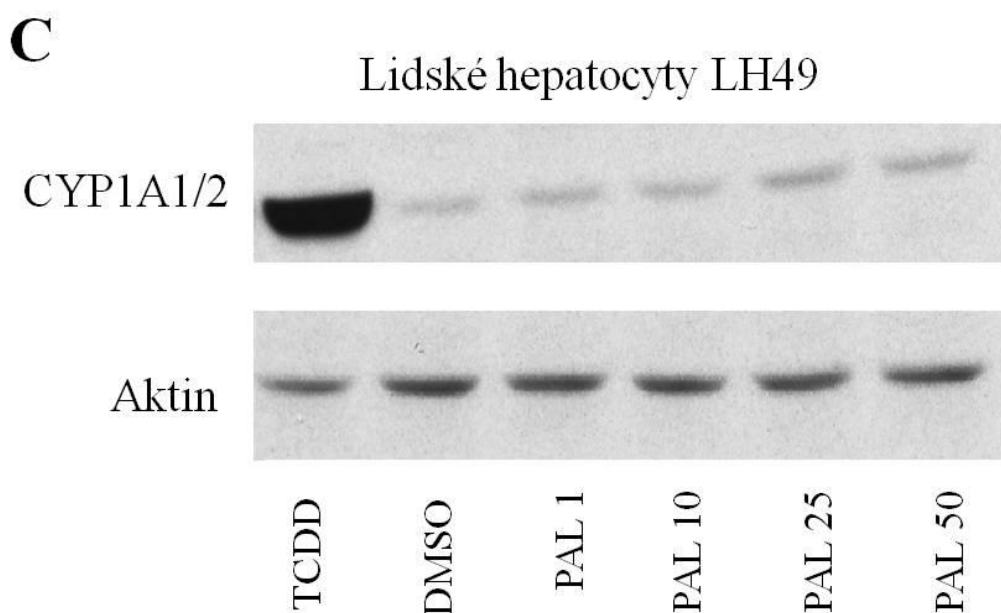


Obr. 30 Vliv palmatinu na expresi mRNA CYP1A2 v primárních kulturách lidských hepatocytů. Lidské hepatocyty (LH49) byly inkubovány 24 hod s 0,1% DMSO (UT, negativní kontrola), palmatinem (PAL - 1, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a TCDD (5 nmol.l^{-1} , pozitivní kontrola). Ovlivnění hladiny mRNA CYP1A2 bylo zjišťováno prostřednictvím kvantitativní real-time PCR a normalizováno na mRNA GAPDH a 18S rRNA.

7.4 Vliv palmatinu na enzymovou aktivitu a množství proteinu CYP1A v buňkách HepG2 a primárních kulturách lidských hepatocytů

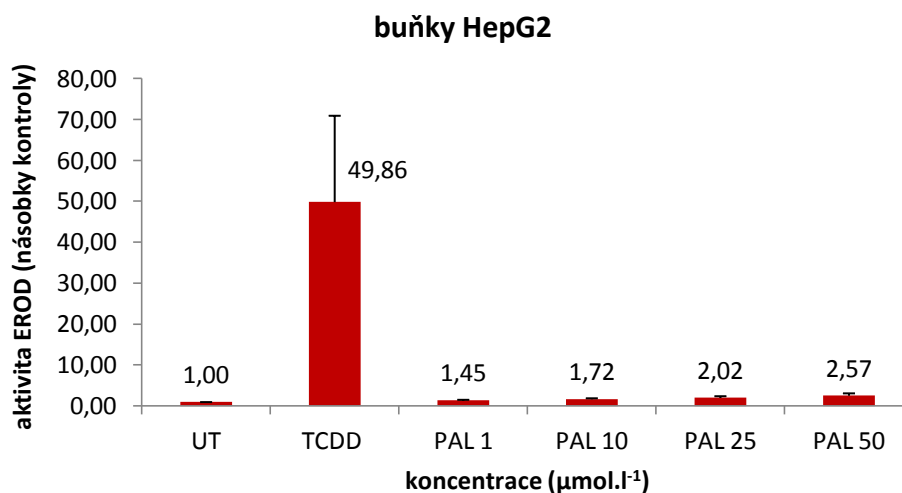
Vliv palmatinu na expresi proteinu v buňkách HepG2 a v primárních kulturách lidských hepatocytů byl detekován pomocí western blotu užitím protilátky proti CYP1A1 a CYP1A2. Jako srovnávací protein byl použit aktin, který je základní složkou cytoskeletu eukaryot a je tedy konstitutivně exprimován ve všech buňkách (Hall, 1998). Při inkubaci po dobu 24 hod zvyšoval TCDD množství proteinu CYP1A1 a CYP1A2. Palmatin za těchto podmínek nezpůsobil změny v množství proteinu CYP1A1 u buněk HepG2 ani v množství CYP1A1/2 u lidských hepatocytů (Obr. 31).



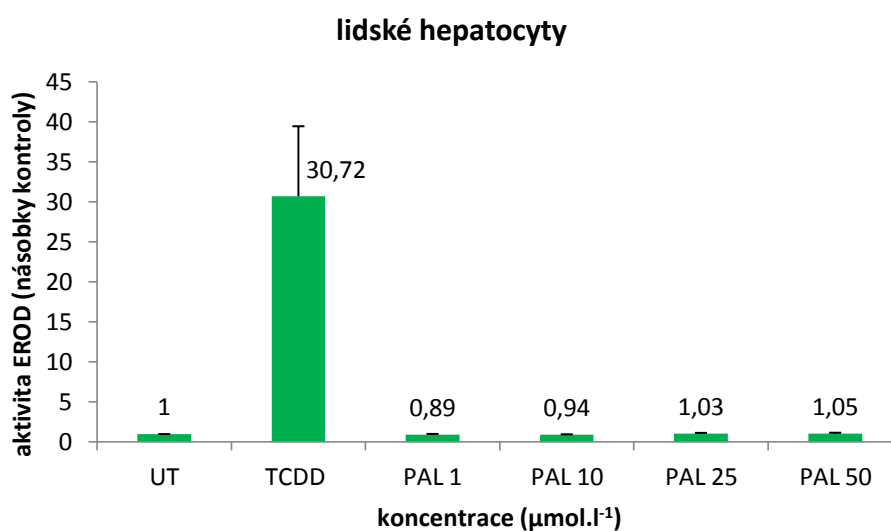


Obr. 31 Vliv palmatinu na expresi proteinů CYP1A buněk HepG2 (A) a primárních kultur lidských hepatocytů LH 47 (B) a lidských hepatocytů LH49 (C). Buňky byly inkubovány s TCDD (5 nmol.l^{-1} , pozitivní kontrola), 0,1 % DMSO (UT, negativní kontrola) a s palmatinem (PAL - 1, 10, 25 a $50 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$). Buněčné lyzáty obsahující $30 \text{ } \mu\text{g}$ proteinu/jamka byly analyzovány pomocí western blotu. CYP1A1 A CYP1A2 a aktin byly detekovány pomocí protilátek, které byly vizualizovaný chemiluminiscenčně. Na obrázku jsou ukázány reprezentativní výsledky.

Vliv palmatinu na enzymovou aktivitu CYP1A1 buněk HepG2 (Obr. 32) a na aktivitu CYP1A1/2 primárních kultur lidských hepatocytů (Obr. 33) byl měřen jako vliv na deethylasovou aktivitu 7-ethoxyresorufinu (EROD). Buňky byly inkubovány 24 hod s palmatinem v koncentracích 1, 10, 25 a $50 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$, 0,1 % DMSO jako negativní kontrolou a TCDD (5 nmol.l^{-1}) jako pozitivní kontrolou. Měřením bylo zjištěno, že u buněk HepG2 dochází po 24 hod expozici ke zvýšení deethylasové aktivity, a to v závislosti na koncentraci palmatinu. Již od nejnižší testované koncentrace $1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ docházelo k mírnému zvýšení této aktivity, která byla 1,4-krát vyšší ve srovnání s kontrolou. Při testované koncentraci $10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ byla tato aktivita 1,7-krát vyšší, v případě koncentrace $25 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ byla aktivita 2-krát vyšší a při nejvyšší testované koncentraci $50 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ byla aktivita zvýšena až 2,6-krát. TCDD zvyšoval tuto aktivitu až 50-krát více než kontrola. V primárních kulturách lidských hepatocytů způsoboval palmatin téměř zanedbatelné změny aktivity EROD. TCDD zde vykazoval 31 násobné zvýšení ve srovnání s kontrolou.



Obr. 32 Vliv palmatinu na enzymovou aktivitu CYP1A1 v buňkách HepG2. Buňky HepG2 byly inkubovány 24 hod s 0,1% DMSO (UT, negativní kontrola), palmatinem (PAL - 1, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a TCDD (5 nmol.l^{-1} , pozitivní kontrola). Po inkubaci byl fluorimetricky měřen vliv na enzymovou aktivitu CYP1A1 jako vliv na aktivitu EROD. Hodnoty fluorescence byly standardizovány vůči stanovenému množství proteinu a použity pro výpočet násobků změn oproti kontrole.



Obr. 33 Vliv palmatinu na enzymovou aktivitu CYP1A1/2 v primárních kulturách lidských hepatocytů. Lidské hepatocyty (LH45, LH47, LH48 a LH49) byly inkubovány 24 hod s 0,1% DMSO (UT, negativní kontrola), palmatinem (PAL - 1, 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a TCDD (5 nmol.l^{-1} , pozitivní kontrola). Po inkubaci byl fluorimetricky měřen vliv na enzymovou aktivitu CYP1A1/1A2 jako vliv na aktivitu EROD. Hodnoty fluorescence byly standardizovány vůči stanovenému množství proteinu a použity pro výpočet násobků změn oproti kontrole.

8 Diskuze

Palmatin je protoberberinový alkaloid, který představuje hlavní bioaktivní složku řady rostlin, jako je např. *Coptis chinensis*, *Corydalis yanhusuo* nebo *Enantia chlorantha*. Palmatin vykazuje především analgetické, protizánětlivé, antidiabetické a hepatoprotektivní účinky, a proto jsou sušené kořeny nebo oddenky těchto rostlin využívány jako součást léčivých preparátů (Khan *et al.*, 2013). Má schopnost reagovat s nukleovými kyselinami prostřednictvím interkalace a stává se tedy cílem studií, jak tyto interakce ovlivňují genovou a proteinovou expresi jednotlivých typů buněk (Bhadra a Kumar, 2011).

CYP1A1 a CYP1A2 jsou izoenzymy patřící do podrodiny CYP1A, které mají ze 70 % shodnou sekvenci aminokyselin, ale liší se lokalizací (Lo *et al.*, 2013). CYP1A1 se v malých množstvích nachází v játrech, kde je exprimován inducibilně a ve vyšší koncentraci je přítomen v extrahepatických orgánech. Naopak CYP1A2 je v játrech exprimován konstitutivně. Oba enzymy metabolizují celou řadu substrátů, jako jsou xenobiotika (např. paracetamol, benzo[*a*]pyren, theofylin atd.) a endogenní sloučeniny (např. eikosanoidy, bilirubin, kyselina arachidonová atd.). Významně se podílí na metabolické aktivaci prokarcinogenů na karcinogenní látky. Aktivují téměř 90 % látek vyvolávajících rakovinu (Rendic a Di Carlo, 1997). Genová exprese CYP1A je řízena prostřednictvím aryluhlovodíkového receptoru (AhR). Jedná se o ligand-dependentní transkripční faktor, který se nachází v cytosolu v multiproteinovém komplexu a je aktivován řadou exogenních a endogenních substrátů. Mezi typické exogenní aktivátory patří polycyklické aromatické uhlovodíky (benzo[*a*]pyren) a halogenované aromatické uhlovodíky (TCDD) (Vrzal *et al.*, 2004). TCDD je ligandem s nejvyšší afinitou k AhR a zároveň je jeho nejsilnějším aktivátorem. Po navázání ligandu na AhR dochází k vytvoření komplexu ligand-AhR a k uvolnění AhR z multiproteinového komplexu. Nově vytvořený komplex ligand-AhR je translokován do jádra kde dimerizuje s jaderným translokátorem aryl uhlovodíkového receptoru (ARNT). Tento dimer se následně váže na DNA v místě sekvence DRE (dioxine responsive elements) a spouští tak genovou expresi genů kódujících enzymy CYP1A1 a CYP1A2 (Puga *et al.*, 2009).

V této práci byly nejprve ověřovány možné cytotoxické účinky palmatinu vůči buňkám lidské hepatomové linie HepG2 a primárním kulturám lidských hepatocytů užitím MTT testu. Principem tohoto testu je přeměna MTT na modrofialový formazán prostřednictvím živých buněk s nepoškozenými mitochondriemi. Aktivita mitochondrií

je přímo úměrná počtu životaschopných buněk (Van Meerloo *et al.*, 2011). Palmatin nevykazoval pokles viability vůči lidským hepatocytům. Pouze u buněk HepG2 způsoboval palmatin v nejvyšší koncentraci 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ snížení viability na 92 %.

Expres reportérového genu byla testována za použití dvou plasmidů, které byly transfekovány do buněk HepG2. Plasmid *pDRE-luc* obsahoval pouze vazebné místo pro AhR a plasmid *pIA1-luc* obsahoval promotor genu *CYP1A1*. Bylo zjištěno, že palmatin významně aktivuje AhR a zvyšuje aktivitu promotoru genu *CYP1A1*. Jelikož ovlivnění hladiny mRNA v důsledku odpovědi na stimuly slouží jako důkaz toho, že genová exprese byla spuštěna či umlčena (Vrzal *et al.*, 2005), byl testován vliv palmatinu na hladinu mRNA CYP1A. Po 24 hodinové inkubaci způsoboval palmatin v koncentraci 10, 25 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ zvýšení hladiny mRNA CYP1A1 u buněk HepG2. Hladina mRNA však nebyla ovlivněna tak významně jako u TCDD, který je známým aktivátorem AhR. Tento efekt na hladinu mRNA CYP1A1 buněk HepG2 byl již dříve pozorován i u jiných isochinolinových alkaloidů včetně berberinu (Vrzal *et al.*, 2005; Vrba *et al.*, 2011). I když má protoberberinový alkaloid berberin, stejně jako palmatin, tetracyklickou strukturu, způsobuje mnohem výraznější zvýšení exprese CYP1A1 mRNA (Vrba *et al.*, 2014). Míra zvýšení je ovlivněna strukturou alkaloidu. Palmatin má ve své struktuře navázány čtyři methoxy skupiny v polohách 2, 3, 9, 10, avšak berberin má místo dvou methoxy skupin v poloze 2, 3 methylenedioxy skupinu tvořící planární 1,3-dioxolový kruh, který je strukturně bližší dioxinům. Planární struktura umožňuje snazší uchycení k proteinům a látky s touto strukturou často vystupují jako agonisté AhR (Hallgren a Darnerud 2002; Behre *et al.*, 2012). Palmatin se svou mírně deformovanou strukturou tedy funguje jako parciální agonista AhR. I když byla pomocí real-time PCR pozorována v buňkách HepG2 zvýšená exprese CYP1A1 na úrovni mRNA, nezpůsobil palmatin zvýšenou expresi CYP1A1 na úrovni proteinu, která byla detekována western blotem. Metodou EROD bylo přesto zjištěno malé, ale významné zvýšení aktivity CYP1A1. Tento rozpor je pravděpodobně způsoben malou citlivostí western blot analýzy. I když jsme detekovali zvýšenou aktivitu CYP1A1, jinou studií bylo zjištěno, že palmatin inhibuje aktivitu lidského rekombinantního CYP1A1 s $\text{IC}_{50} = 8,71 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (Lo *et al.*, 2013). Lze se proto domnívat, že koncentrace palmatinu v intaktních buňkách po 24 hod inkubaci nedosahuje hodnot potřebných k inhibici enzymu CYP1A1.

Primární kultury lidských hepatocytů exprimují celé spektrum biotransformačních enzymů první i druhé fáze metabolismu xenobiotik včetně CYP1A2 a představují tak

vhodný *in vitro* buněčný model pro studium lidských biotransformačních reakcí (Kosina *et al.*, 1999; Wilkening *et al.*, 2003). V této diplomové práci byly použity čtyři různé kultury lidských hepatocytů (LH45, LH47, LH48 a LH49). U všech čtyř kultur palmatin, na rozdíl od TCDD, způsoboval pouze slabé zvýšení hladiny mRNA CYP1A1 a CYP1A2. Vliv palmatinu závisel na použité kultuře lidských hepatocytů a byl mnohem slabší než v buňkách HepG2. U lidských hepatocytů nebyly zaznamenány změny množství proteinu ani enzymové aktivity CYP1A.

Z výsledků vyplývá, že palmatin aktivuje AhR a zvyšuje expresi CYP1A v buňkách HepG2, ale ne v lidských hepatocytech. Rozdílný účinek palmatinu v těchto buněčných modelech může souviset s biotransformací palmatinu v hepatocytech.

9 Závěr

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda protoberberinový alkaloid palmatin ovlivňuje expresi genů *CYP1A1* a *CYP1A2* v lidské hepatomové linii HepG2 kultivované v monovrstvě a primárních kulturách lidských hepatocytů. Výsledky byly vždy srovnávány s negativní kontrolou, kterou představoval 0,1 % DMSO a jako pozitivní kontrola byl zvolen TCDD (5 nmol.l⁻¹).

Nejprve bylo pomocí kolorimetrického MTT testu ověřováno, zda palmatin nevykazuje cytotoxické účinky vůči testovaným buňkám. Bylo zjištěno, že palmatin v koncentracích 1, 10 a 25 μmol.l⁻¹ nesnižuje viabilitu buněk HepG2 ani lidských hepatocytů a není pro ně tedy cytotoxický. Palmatin v koncentraci 50 μmol.l⁻¹ způsoboval mírný pokles viability na 92 % u buněk HepG2. Vliv na aktivaci AhR a na aktivaci transkripce byl ověřován expresí reportérového genu pomocí plasmidů *pDRE-luc* a *pIA1-luc*, které byly transfekovány do buněk HepG2. Výsledky ukázaly, že palmatin aktivuje AhR a způsobuje transkripci genu *CYP1A1*. Vliv palmatinu na expresi *CYP1A1* a *CYP1A2* na úrovni mRNA byl testován prostřednictvím real-time PCR, přičemž hodnoty byly normalizovány na GAPDH mRNA a 18S rRNA. Výsledky ukazují, že palmatin významně zvyšuje hladinu mRNA *CYP1A1* v buňkách HepG2 a zvýšení je závislé na době inkubace palmatinu s buňkami. Lidské hepatocyty vykazovaly slabé zvýšení mRNA *CYP1A1* a *CYP1A2*, které bylo ovlivněno typem použité kultury lidských hepatocytů. Western blot analýzou byl sledován vliv palmatinu na expresi *CYP1A* na úrovni proteinu. Palmatin nezpůsoboval zvýšení množství proteinu v primárních kulturách lidských hepatocytů ani v buňkách HepG2. Enzymová aktivita byla měřena fluorimetricky metodou EROD, kterou byla sledována deethylasová aktivita enzymů *CYP1A*. V buňkách HepG2 byla tato aktivita zvýšena vlivem palmatinu, u lidských hepatocytů nebyla zaznamenána žádná změna aktivity enzymů.

Ze získaných výsledků tedy vyplývá, že působením palmatinu na buňky HepG2 dochází k aktivaci aryluhlovodíkového receptoru, zvýšené expresi mRNA *CYP1A1* a ke zvýšené enzymové aktivitě *CYP1A1*. Tento vliv palmatinu však nebyl zjištěn u lidských hepatocytů. Jelikož primární kultury lidských hepatocytů exprimují celé spektrum biotransformačních enzymů, důvodem může být metabolizace palmatinu.

10 Literatura

- Azenbacher P., Azenbacherová E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**, 737-747.
- Belitsky G. A., Yakubovskaya M. G. (2008): Genetic Polymorphism and Variability of Chemical Carcinogenesis. *Biokhimiya* **73**, 675-689.
- Bencaodao homepage: <http://www.bencaodao.com/zhongcaoyao/H/20090522/65.html> (20.3.2014).
- Bhadra K., Maiti M., Kumar G. S. (2008): Interaction of Isoquinoline Alkaloids Palmatine with Deoxyribonucleic Acids: Binding Heterogeneity and Conformational and Thermodynamic Aspects. *Chemistry & Biodiversity* **5**, 575-590.
- Bhadra K., Kumar G. S. (2011): Therapeutic Potential of Nucleic Acid-Binding Isoquinoline Alkaloids: Binding Aspects and Implications for Drug Design. *Medicinal Research Reviews* **31**, 821-862.
- Briskin D. P. (2000): Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant Physiology* **124**, 507-514.
- Chen W.-H., Qin Y., Cai Z., Chan C.-L., Luo G.-A., Jiang Z.-H. (2005): Spectrometric studies of cytotoxic protoberberine alkaloids binding to double-stranded DNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13**, 1859-1866.
- Chen H.-Y., Ye X.-L., Cui X.-L., He K., Jin Y.-N., Chen Z., Li X.-G. (2012): Cytotoxicity and antihyperglycemic effect of minor constituents from *Rhizoma Coptidis* in HepG2 cells. *Fitoterapia* **83**, 67-73.
- Choi K.-B., Morishige T., Shitan N., Yazaki K., Sato F. (2002): Molecular cloning and characterization of coclaurine N-methyltransferase from cultured cells of *Coptis Japonica*. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 830-835.
- Ciolino H. P., Daschner P. J., Yeh G. C. (1999): Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligand of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochemical Journal* **340**, 715-722.
- Dittrich H., Kutchan T. M. (1991): Molecular cloning, expression and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme Essentials to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to patogen attack. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **88**, 9969-997.
- Facchini P. J., De Luca V. (1995): Phloem-Specific Expression of Tyrosine/Dopa Decarboxylase Genes and the Biosynthesis of Isoquinoline Alkaloids in Opium Poppy. *The Plant Cell* **7**, 1811-1821.
- Fukuda K., Hibiya Y., Mutoh M., Koshiji M., Akao S., Fujiwara H. (1999): Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology* **66**, 227-233.
- Gao W. H., Lin S. Y., Jia L., Guo X. K., Chen X. G., Hu Z. D. (2005): Analysis of protoberberine alkaloids in several herbal drugs and related medicinal preparations by non-aqueous capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science* **28**, 92-97.
- Gatto B., Sanders M. M., Yu C., Wu H.-Y., Makhey D., LaVoie E. J., Liu L. F. (1996): Identification of Topoisomerase I as the Cytotoxic Target of the Protoberberine Alkaloid Coralyne. *Cancer Research* **56**, 2795-2800.
- Giri P., Hossain M., Kumar G. S. (2006): Molecular aspects on the specific interaction of cytotoxic plant alkaloid palmatine to poly(A). *International Journal of Biological Macromolecules* **39**, 210-221.
- Giri P., Hossain M., Kumar G. S. (2006): RNA specific molecules: Cytotoxic plant alkaloid palmatine binds strongly to poly (A). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **16**, 2364-2368.
- Grycová L., Dostál J., Marek R. (2007): Quarternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry* **68**, 150-175.

- Guengerich F. P., Johnson W. W. (1997): Kinetics of Ferric Cytochrome P450 Reduction by NADPH-Cytochrome P450 Reductase: Rapid Reduction in the Absence of Substrate and Variations among Cytochrome P450 Systems. *Biochemistry* **36**, 14741-14750.
- Hahn M. E. (2002): Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chemico-Biological Interactions* **141**, 131-160.
- Han H., Fang D.-C. (1989): The blockong and partial agonistic action of jatrorrhizine on alpha-adrenoreceptors. *Acta Pharmacologica Sinica* **10**, 385-389.
- Han Y.-L., Yu H.-L., Li D., Meng X.-L., Zhou Z.-Y., Yu Q., Zhang X.-Y. Wang F.-J., Guo C. (2011): In Vitro Inhibition of Huanglian [*Rhizoma coptidis* (L.)] and its Six Active Alkaloids on Six Cytochrome P450 Isoforms in Human Liver Microsomes. *Phytotherapy Research* **25**, 1660-1665.
- Hall A. (1998): Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514.
- Harrigan J. A., McGarrigle B. P., Sutter T. R., Olson J. R. (2006): Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicology in Vitro* **20**, 426-438.
- Hirakawa K., Hirano T. (2008): The Microenvironment of DNA Switches the Activity of Singlet Oxygen Generation Photosensitized by Berberine and Palmatine. *Photochemistry and Photobiology* **84**, 202-208.
- Hu Y.-J., Ou-Yang Y., Dai C.-M., Liu Y., Xiao X.-H. (2010): Site-Selective Binding of Human Serum Albumin by Palmatine: Spectroscopic Approach. *Biomacromolecules* **11**, 106-112.
- Hudeček J., Azenbacherová E., Azenbacher P., Munro A. W., Hildebrandt P. (2000): Structural Similarities and Differences of the Heme Pocket of Various P450 Isoform as Revealed by Resonance Raman Spectroscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **383**, 70-78.
- Inbaraj J. J., Kukielczak B. M., Sandvik S. L., Chignell C. F. (2001): Photochemistry and Phototoxicity of Alkaloids from Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) 1. Berberine. *Chemical research in toxicology* **14**, 1529-1534.
- Inbaraj J. J., Kukielczak B. M., Bilski P., He Y.-Y., Sik R. H., Chignell C. F. (2006): Photochemistry and Photocytotoxicity of Alkaloids from Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.). 2. Palmatine, Hydrastine, Canadine and Hydrastinine. *Chemical research in toxicology* **19**, 739-744.
- Ingleman-Sundberg M., Rodriguez-Antona C. (2005): Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy. *Philosophical transactions of the royal society B* **360**, 1563-1570.
- Ingleman-Sundberg M., Sim S. C., Gomez A., Rodriguez-Antona C. (2007): Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics* **116**, 496-526.
- Islam M. M., Sinha R., Kumar G. S. (2007): RNA binding small molecules: Studies on t-RNA binding by cytotoxin plant alkaloid berberine, palmatine and the comparison to ethidium. *Biophysical Chemistry* **125**, 508-520.
- Islam M. M., Kumar G. S. (2008): RNA targeting binding: Studies on the binding of palmatine and berberine to polyribonucleotides and comparison to ethidium. *Journal of Molecular Structure* **875**, 382-391.
- Islam M. M., Roy Chowdhury S., Kumar G. S. (2009): Spectroscopic and calorimetric studies on the binding of alkaloids berberine, palmatine and coralyne to double stranded RNA polynucleotides. *Journal of Physical Chemistry* **113**, 1210-1224.
- Jancova P., Azenbacher P., Azenbacherova E. (2010): Phase II Drug Metabolizing Enzymes. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia* **154**, 103-116.
- Jang C. S. (1953): Pharmacological studies on berberine II. The mode of action of berberine. *Acta Pharmacologica Sinica* **19**, 12-18.
- Jang M. H., Kim H. Y., Kang K. S., Yokozawa T., Park J. H. (2009): Hydroxyl Radical Scavenging Activities of Isoquinoline Alkaloids Isolated from *Coptidis Chinensis*. *Archives of Pharmacal Research* **32**, 341-345.

- Jung H. A., Yoon N. Y., Bae H. J., Min B.-S., Choi J. S. (2008): Inhibitory activities of the alkaloids from *Coptidis Rhizoma* against aldose reductase. *Archives of Pharmacal Research* **31**, 1405-1412.
- Kettmann V., Košťálová D., Höltje H.-D. (2004): *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **18**, 785-796.
- Keyes S. R., Fraccasso P. M., Heimbrook D. C., Rockwell S., Sligar S. G., Sartorelli A. C. (1984): Role of NADPH:Cytochrome c Reductase and DT-Diaphorase in the biotransformation of Mitomycin C. *Cancer Research* **44**, 5638-5643.
- Khan A. Y., Hossain M., Kumar G. S. (2013): Binding of plant alkaloids berberine and palmatine to serum albumins: a thermodynamic investigation. *Molecular biology reports* **40**, 553-566
- Kim S. A., Kwon Y., Kim J. H., Muller M. T., Chung I. K. (1998): Induction of Topoisomerase II-Mediated DNA Cleavage by a Protoberberine Alkaloid Berberrubine. *Biochemistry* **37**, 16316-16324.
- Kosina P., Dvorák Z., Walterová D. (1999): The human hepatocyte: I. A model for studying metabolism and toxicity of xenobiotics. *Ceska a Slovenska farmacie: Casopis Ceske Farmaceuticke Spolecnosti a Slovenske Farmaceuticke Spolecnosti* **48**, 65-71
- Kumar D., Hirao H., de Visser S. P., Zheng J., Wang D., Thiel W., Shaik S. (2005): New features in the Catalytic cycle of Cytochrome P450 during the Formation of Compound I from Compound 0. *Journal of physical chemistry* **109**, 19946-19951.
- Kuo C. L., Chou C. C., Yung B. Y.-M. (1995): Berberine complexes with DNA in the berberine-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Cancer Letters* **93**, 191-200.
- Lee J.-W., Iwahashi A., Hasegawa S., Yonezawa T., Jeon W. B., Cha B.-Y., Nagai K., Woo J.-T. (2012): Coptisine inhibits RANKL-induced NF- κ B phosphorylation in osteoclast precursors and suppresses function through the regulation of RANKL and OPG gene expression in osteoblastic cells *Journal of natural medicines* **66**, 8-16.
- Lo S.-N., Chang Y.-P., Tsai K.-C., Chang C.-Y., Wu T.-S., Ueng Y.-F. (2013): Inhibition of CYP1 by berberine, palmatine, and jatrorrhizine: Selectivity, kinetic characterization, and molecular modeling. *Toxicology and Applied Pharmacology* **272**, 671-680.
- Liu Y.-T., Hao H.-P., Xie H.-G., Lai L., Wang Q., Liu C.-X., Wang G.-J. (2010): Extensive Intestinal First-Pass Elimination and Predominant Hepatic Distribution of Berberine Explain Its Low Plasma Levels in Rats. *Drug Metabolism and Disposition* **38**, 1779-1784.
- Ma Q., Lu A. Y. H. (2007): Perspective CYP1A Induction and Human Risk Assessment: An Envolving Tale of in Vitro and in Vivo Studies. *Drug Metabolism and Disposition* **35**, 1009-1016.
- Ma B.-L., Ma Y.-M., Shi R., Wang T.-M., Zhang N., Wang C.-H., Yang Y (2010): Identification of the toxic constituents in *Rhizoma Coptidis*. *Journal of Ethnopharmacology* **128**, 357-364.
- Ma B.-L., Ma Y.-M. (2013): Pharmacokinetic properties potential herb-drug interactions and acute toxicity of oral *Rhizoma coptidis* alkaloids. *Expert Opinion* **9**, 51-61.
- Maiti M., Kumar G. S. (2007): Molecular Aspects on the Interactions of Protoberberine Benzophenanthridine and Aristolochia Group of Alkaloids. *Medicinal Research Reviews* **27**, 649-695.
- Mandal P. K. (2005): Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *Journal of comparative physiology B* **175**, 221-230.
- Mimura J., Yamashita K., Nakamura K., Morita M., Takagi T. N., Nakao K., Ema M., Sogawa K., Yasuda M., Katsuki M., Fujii-Kuriyama Y. (1997): Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes to Cells* **2**, 645-654.
- Morishige T., Dobouzet E., Choi K.-B., Yazaki K., Sato F. (2002): Molecular cloning of columbamine *O*-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *European Journal of Biochemistry* **269**, 5659-5667.
- Nietsch H. H., Roe M. W., Fiekers J. F., Moore A. L., Lidofsky S. D. (2000): Activation of Potassium and Chloride Channels by Tumor Necrosis Factor α . *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 20556-20561.

- Okamoto T., Mitsuhashi M., Fujita I., Sindhu R. K., Kikkawa Y. (1993): Induction of cytochrome P450 1A1 and 1A2 by hyperoxia. *Biochemical and Biophysical research communications* **197**, 878-885.
- Omura T., Sato R. (1962): A New Cytochrome in Liver Microsomes. *The Journal of Biological Chemistry* **237**, 1375-1376.
- Omura T. (1999): Forty Years of Cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communucations* **266**, 690-698.
- Ou-Yang Y., Li X.-L., Wang H., Fang M., Hu Y.-J. (2012): Determination of the specific interaction between palmatine and bovine serum albumin. *Molecular Biology Reports* **39**, 5495-5501.
- Pharmacognosy homepage: <http://www.epharmacognosy.com/2012/04/corydalis-tuber-yanhusuo-corydalis.html> (20.3.2014)
- Poland A., Glover E. (1976): Stereospecific, High Affinity Binding of 2,3,7,8,-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by Hepatic Control. *The Journal of Biological Chemistry* **251**, 4936-4946.
- Prokopec S. D., Buchner N. B., Fox N. S., Chong L. C., Mak D. Y. F., Watson J. D., Petronis A., Pohjanvirta R., Boutros P. C. (2013): Validating reference genes within a mouse model systém of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) toxicity. *Chemico-Biological Interactions* **205**, 63-71.
- Puga A., Ma C., Marlowe J. L. (2009): The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochemical Pharmacology* **77**, 713-722.
- Qiu F., Zhu Z., Kang N., Piao S., Qin G., Yao X. (2008): Isolation and Identification of Urinary Metabolite sof Berberine in Rats and Humans. *Drug Metabolism and Disposition* **36**, 2159-2165.
- Rendic S., Di Carlo F. J. (1997): Human Cytochrome P450 Enzymes: A Status Report Summarizing Their Reactions, Substrates, Inducers and Inhibitors. *Drug Metabolism Reviews* **29**, 1-2.
- RSCB Protein Data Bank: <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4I8V> (18.2.2014).
- RSCB Protein Data Bank: <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2HI4> (18.2.2014).
- Roberts M. F., Wink M. (1998): Introduction. In: *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Plenum Press New York, U.S.A., 1-4
- Rychkov G., Brereton H. M., Harland M. L., Barritt G. J. (2001): Plasma Membrane Ca²⁺ Release-Activates Ca²⁺ Channels With a High Selectivity for Ca²⁺ Identified by Patch-Clamp Recording in Rat Liver Cells. *Hepatology* **33**, 938-947.
- Safe S. (2001): Molecular biology of the AhR receptor and ints role in carcinogenesis. *Toxicology Letters* **120**, 1-7.
- Samani N., Facchini P. J. (2002): Purification and characterization of norcoclaurine synthase. The first committed enzyme in benzyloquinoline alkaloids biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 33878-33883.
- Sato F., Yamada Y. (2008): Engineering formativ of medicinbal compounds in cell cultures. *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology* **1**, 311-345.
- Sato F., Kumagai H. (2013): Microbial production of isoquinoline alkaloids as plants secondary metabolites based on metabolit engineering. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **89**, 165-181.
- Shin J. S., Kim E. I., Kai M., Lee M. K. (2000): Inhibition of Dopamine Biosynthesis by Protoberberine Alkaloids in PC12 Cells. *Neurochemical Research* **25**, 363-368.
- Schmeller T., Latz-Brüning B., Wink M. (1997): Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry* **44**, 257-266.
- Song N., Tan W., Xing D., lin D. (2001): CYP 1A1 polymorphism and risk of lung cancer in relation to tobacco smoking: a case-control study in China. *Carcinogenesis* **22**, 11-16.
- Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999): Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy* **93**, 229-237.

- Suzuki H., Tanabe H., Mizukami H., Inoue M. (2010): Selective Regulation of Multidrug Resistance Protein in Vascular Smooth Muscle Cells by the Isoquinoline Alkaloid Coptisine. *Biological & pharmaceutical bulletin* **33**, 677-682.
- Suzuki H., Tanabe H., Mizukami H., Inoue M. (2011): Differential Gene Expression in Rat Vascular Smooth Muscle Cells Following Treatment with Coptisine Exerts a Selective Antiproliferative Effect. *Journal of Natural Products* **74**, 634-638.
- Šiller M. (2010): *Role cytochromů P450 a dalších enzymů metabolismu léčiv v biotransformaci dvou syntetických derivátů cytokininů*. Disertační práce, UP Olomouc, Česká Republika.
- Tanabe H., Suzuki H., Mizukami H., Inoue M. (2005): Double blockade of cell cycle progression by coptisine in vascular smooth muscle cells. *Biochemical Pharmacology* **70**, 1176-1184.
- Tekpli X., Zienolddiny S., Skaug V., Stangeland L., Haugen A., Mollerup S. (2012): DNA methylation of the CYP1A1 enhancer is associated with smoking-induced genetic alterations in human lung. *International Journal of Cancer* **131**, 1509-1516.
- Teng H., Choi Y. H. (2014): Optimization of ultrasonic-assisted extraction of bioactive alkaloid compounds from rhizoma coptidis (*Coptis chinensis* Franch.) using response surface methodology. *Food Chemistry* **142**, 299-305.
- Tonge R. P., Kelly E., J., Bruschi S. A., Kalthorn T., Eaton D. L., Nebert D. W., Nelson S. D. (1998): Role of CYP1A2 in the Hepatotoxicity of Acetaminophen: Investigations Using *Cyp1a2* Null Mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **153**, 102-108.
- Uno S., Sakurai K., Nebert D. W., Makishima M. (2014): Protective role of cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) against benzo[a]pyrene-induced toxicity in mouse aorta. *Toxicology* **316**, 34-42.
- Van Meerloo J., Kaspers G. J. L., Cloos J. (2011): Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Methods in Molecular Biology* **731**, 237-245.
- Vannerstrom J. L., Klayman D. L. (1988): Protoberberine Alkaloids as Antimalarials. *Journal of Medicinal Chemistry* **31**, 1084-1087.
- Veldhoen M., Hirota K., Christensen J., O'Garra A., Stockinger B. (2008): Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essentials for optimal differentiation of Th17T cells. *The Journal of Experimental Medicine* **206**, 43-49.
- Volleková A., Košťálová D., Kettmann V., Tóth J. (2003): Antifungal activity of Mahonia aquifolium extract and its major protoberberine alkaloids. *Phytotherapy Research* **17**, 834-837.
- Vrba J., Vrublova E., Modriansky M., Ulrichova J. (2011): Protopine and allocryptopine increase mRNA levels of cytochromes P450 1A in human hepatocytes and HepG2 cells independently of AhR. *Toxicology Letters* **203**, 135-141.
- Vrba J., Kren V., Vacek J., Papouskova B., Ulrichova J. (2012): Quercetin, Quercetin Glycosides and Taxifolin Differ in their Ability to Induce AhR Activation and CYP1A1 Expression in HepG2 Cells. *Phytotherapy Research* **26**, 1746-1752.
- Vrzal R., Ulrichová J., Dvořák Z. (2004): Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia* **148**, 3-10.
- Vrzal R., Zdařilová A., Ulrichová J., Bláha L., Giesy P. P., Dvořák Z. (2005): Activation of the aryl hydrocarbon receptor by berberine in HepG2 and H4IIE cells: Biphasic effect on CYP1A1. *Biochemical Pharmacology* **70**, 925-936.
- Wagner H., Bauer R., Melchart D., Xiao P.-G., Staudinger A. (2011): *Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines. Thin-layer and High Performance Liquid Chromatography of Chinese Drugs*. 2nd ed., Springer, New York, U.S.A., 1022 stran
- Wan H., Williams R., Doherty P., Williams D. F. (1994): A study of the reproducibility of the MTT test. *Journal of materials science: Materials in medicine* **5**, 154-159.
- Wang F., Zhou H.-Y., Cheng L., Zhou J., Fu L.-Y., Yao W.-X. (2003): Effect of palmatine on potassium and calcium currents in isolated rat hepatocytes. *World Journal of Gastroenterology* **9**, 329-333.

- Wang X., Wang R., Xing D., Su H., Ma C., Ding Y., Du L. (2005): Kinetic difference of berberine between hippocampus and plasma in rat after intravenous administration of *Coptidis rhizoma* extract. *Life Sciences* **77**, 3058-3067.
- Wang L.-J., Ye X.-L., Li X.-G., Sun Q.-L., Yu G., Cao X.-G., Liang Y.-T., Zhang H.-S., Zhou J.-Z. (2008): Synthesis and Antimicrobial Activity of 3-Alkoxyjatrorrhizine Derivates. *Planta Medica* **74**, 290-292.
- Wilkening S., Stahl F., Bader A. (2003): Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metabolism and Disposition* **31**, 1035-1042.
- Wu D. Z., Yuan J. Y., Shi H. L., Hu Z. B. (2008): Palmatine, a protoberberine alkaloid, inhibits both Ca^{2+} - and cAMP-activated Cl^- secretion in isolated rat distal colon. *British Journal of Pharmacology* **153**, 1203-1213.
- Xu C., Li C. Y.-T., Kong A.-N. (2005): Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics. *Archives of Pharmacological Research* **28**, 249-268.
- Yan F.-U., Benrong H.-U., Qiang T., Qin F.-U., Jizhou X. (2005): Hypoglycemic Activity of Jatrorrhizine. *Journal of Huazhong University of Science and Technology* **25**, 491-493.
- Yan D., Jin C., Xiao X.-H., Dong X.-P. (2008): Antimicrobial properties of berberine alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by microcalorimetry. *Journal of biochemical and biophysical methods* **70**, 845-849.
- Yang Y., Xia H., Li J., Chen L., Qiu F. (2010): Metabolites of Protoberberine Alkaloids in Human Urine following Oral Administration of *Coptidis Rhizoma* Decoction. *Planta Medica* **76**, 1859-1863.
- Ye M., Fu S., Pi R., He F. (2009): Neuropharmacological and pharmacokinetic properties of berberine: a review of recent research. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **61**, 831-837.
- Zaher H., Buters J. T. M., Ward J. M., Bruno M. K., Lucas A. M., Stern S. T., Cohen S. D., Gonzalez F. J. (1998): Protection against Acetaminophen Toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 Double-Null Mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **152**, 193-199.
- Zhang Z.-Y., Pelletier R. D., Wong Y. N., Sugawara M., Zhao N., Littlefield B. A. (2006): Preferential inducibility of CYP1A1 and CYP1A2 by TCDD: Differential regulation in primary human hepatocytes versus transformed human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **341**, 399-407.
- Zhang W., Zhao Y., Bai X., Wang Y., Zhao D. (2011): The orientation of protoberberine alkaloids and their binding activities to human serum albumin by surface-enhanced Raman scattering. *Spectrochimica Acta Part A* **78**, 1105-1109.
- Zhao X., Zhang J.-J., Wang X., Bu X.-Y., Lou Y.-Q., Zhang G.-L. (2008): Effect of berberine on hepatocyte proliferation, inducible nitric oxide synthase expression, cytochrome P450 2E1 and 1A2 activities in diethylnitrosamine- and fenobarbital-treated rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **62**, 567-572.
- Zuo F., Nakamura N., Akao T., Hattori M. (2006): Pharmacokinetics of Berberine and Its Main Metabolites in Conventional and Pseudo Germ-Free Rats Determined by Liquid Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition* **34**, 2064-2072.

11 Seznam použitých zkratek

AhR	aryluhlovodíkový receptor
APAP	acetaminofen
APS	peroxosíran amonný
ARNT	translokátor aryluhlovodíkového receptoru
BCP	1-bromo-3-chlorpropan
BSA	hovězí sérový albumin
COMT	katechol- <i>O</i> -methyltransferasa
COX-2	cyklooxygenasa 2
CYP1A1	cytochrom P450 1A1
CYP1A2	cytochrom P450 1A2
ddH ₂ O	dvojnásobně deionizovaná voda (double deionized H ₂ O)
DMEM	Dulbecco's Eagle modified medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DOPA	dihydroxyfenylalanin
DRE	dioxine responsive element
ER	7-ethoxyresorufin
EROD	7-ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylasa
GIT	gastrointestinální trakt
GSH	glutathion
GST	glutathion- <i>S</i> -transferasa
HepG2	lidská hepatomová buněčná linie
HL-60	buňky lidské promyelocytární leukémie
Hsp90	heat shock protein
IQA	isochinolinové alkaloidy
LH	lidské hepatocyty

MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NAT	<i>N</i> -acetyltransferasa
NAPQI	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzochinon imin
NQO	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PAL	palmatin
PBS	fyzilogický roztok upravený fosfátem na pH 7,4
PCB	polychlorované bifenyly
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
ROS	reaktivní kyslíkové formy
SAM	<i>S</i> -adenosylmethionin
SDS	dodecylsírán sodný
SULT	sulfottransferasa
TBS	Tris pufr (Tris-buffered saline)
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TEMED	N,N,N'N'-tetramethylethylendiamin
TPMT	thiopurin- <i>S</i> -methyltransferasa
UGT	UDP-glukuronyltransferasa
UT	kontrola