

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vliv vybraných přírodních látek na jaterní
cytochromy P450**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Martina Fojtíková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.
Termín odevzdání práce:	23. 4. 2012

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 23. 4. 2012

.....

Bc. Martina Fojtíková

Poděkování

Ráda bych poděkovala mé vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Evě Anzenbacherové, CSc. za odborné vedení, poskytnuté rady, předané zkušenosti a motivaci k práci. Poděkování patří i Mgr. Aleně Špičákové za odbornou pomoc nejen při experimentech a všech členům Ústavu farmakologie LF UP za vytvoření příjemného prostředí k práci a přátelský kolektiv. Nemalou zásluhu na úspěšném dokončení této práce má i moje rodina a přítel, a proto i jim bych chtěla poděkovat.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Martina Fojtíková
Název práce	Vliv vybraných přírodních látek na jaterní cytochromy P450
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP Olomouc
Vedoucí práce	doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	<p>Přírodní látky ve formě doplňků stravy hrají stále významnější roli v životě člověka. Tato práce se zabývá vlivem vybraných přírodních látek (silybin, lykopen, anthokyaniny) na enzymy, které hrají významnou úlohu při metabolismu léčiv, konkrétně se věnuje ovlivnění aktivity cytochromů P450 (CYP). Důvodem studia této problematiky jsou možné změny hladin aplikovaných léčiv při současné konzumaci účinných přírodních látek, a to z důvodu lékových interakcí na úrovni metabolismu. Jako modelové léčivo byl v práci použit warfarin. V rámci experimentální části byla optimalizována a kalibrována HPLC metoda s UV i fluorescenční detekcí pro stanovení nejvýznamnějších metabolitů warfarinu, které vznikají za účasti CYP. Tato metoda umožňuje v jednom analytickém kroku měřit současně aktivitu několika forem CYP. S využitím sledování vzniku metabolitů warfarinu produkovaných potkaní jaterní mikrosomální frakcí byla provedena <i>in vitro</i> analýza vlivu přírodních látek na aktivitu CYP. Výsledek měření ukázal, že silybin mírně inhibuje CYP2C11, lykopen nemá výraznější účinky na studované enzymy a anthokyaniny inhibují CYP3A2.</p>
Klíčová slova	xenobiotika, metabolismus, cytochrom P450 (CYP), silybin, lykopen, anthokyaniny, warfarin, HPLC
Počet stran	61
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Martina Fojtíková
Title	The influence of selected natural compounds on the hepatic cytochromes P450
Type of thesis	Master
Department	Department of medical chemistry and biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, Csc.
The year of presentation	2012
Abstract	Natural compounds in the form of dietary supplements are becoming increasingly important in a person's life. The thesis inquires into the influence of selected natural compounds (silybin, lycopene, anthocyanins) to the enzymes that are important for the metabolism of drugs, and in particular, deals with the interference to the activity of cytochromes P450 (CYP). Investigating this issue is important due the possible difference of levels of active drug ingredients when taken together with the natural compounds in question caused by the interaction on metabolic level. Warfarin was chosen as the model drug. In the experimental part, we optimized and calibrated an HPLC method with both UV and fluorescence detection in order to determine the most important metabolites of warfarin that arise in the presence of CYP. This method allows us to measure the activity of several forms of CYP at once, in one analytical step. Tracking the emergence of warfarin metabolites produced by microsomal fraction of rat liver, we performed <i>in vitro</i> analysis of the influence of natural compounds to the activity of CYP. The results show that silybin slightly inhibits CYP2C11, lycopene has no significant effects to the enzymes under investigation, and that anthocyanins inhibit CYP3A2.
Keywords	xenobiotics, metabolism, cytochrome P450 (CYP), silybin, lycopene, anthocyanins, warfarin, HPLC
Number of pages	61
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Cíle diplomové práce.....	8
Teoretická část.....	9
1 Úvod.....	9
2 Přírodní látky.....	10
2.1 Silybin.....	10
2.2 Lykopen.....	11
2.3 Anthokyany.....	14
3 Cizorodé látky – Xenobiotika	16
3.1 Biotransformace cizorodých látek.....	17
3.2 Cytochromy P450 (CYP).....	18
3.3 Přehled důležitých forem lidských cytochromů P450.....	21
3.3.1 CYP3A4 (Obr. 9).....	21
3.3.2 CYP2C.....	21
3.3.3 CYP1A2.....	22
3.3.4 CYP2E1.....	22
3.3.5 Experimentální zvířecí modely využívané při studiu metabolismu léčiv.....	22
4 Přírodní látky a léčiva – lékové interakce.....	23
4.1 Lékové interakce.....	23
4.2 Warfarin.....	24
4.2.1 Metabolismus warfarinu.....	25
5 Studium cytochromů P450.....	26
5.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	27
Experimentální část.....	29
6 Materiál.....	29
6.1 Biologický materiál.....	29
6.1.1 Mikrosomy.....	29
6.1.2 Přírodní látky.....	29
6.2 Chemikálie.....	29
6.3 Přístrojové vybavení.....	30
7 Metody.....	31
7.1 Izolace mikrosomů z jater potkana.....	31
7.2 Stanovení koncentrace cytochromů P450 v mikrosomální frakci.....	32

7.3 Stanovení koncentrace proteinů v mikrosomální frakci.....	32
7.4 Využití HPLC pro stanovení metabolitů warfarinu.....	33
7.4.1 Optimalizace a kalibrace metody.....	33
7.5 Izolace a charakterizace lykopenu.....	34
7.6 Vliv silybinu na metabolické přeměny warfarinu.....	35
7.7 Vliv lykopenu na metabolické přeměny warfarinu.....	35
7.8 Vliv anthokyanů na metabolické přeměny warfarinu.....	36
8 Výsledky.....	36
8.1 Charakterizace mikrosomální frakce jaterního homogenátu potkana.....	36
8.2 Optimalizace a kalibrace metody pro stanovení metabolitů warfarinu.....	37
8.2.1 Kalibrace jednotlivých metabolitů warfarinu.....	37
8.2.2 Optimalizace podmínek pro stanovení metabolických přeměn warfarinu v jaterní mikrosomální frakci potkana.....	42
8.3 Izolace lykopenu a jeho charakterizace.....	44
8.4 Vliv silybinu na metabolické přeměny warfarinu.....	46
8.5 Vliv lykopenu na metabolické přeměny warfarinu.....	48
8.6 Vliv anthokyanů na metabolické přeměny warfarinu.....	51
Diskuse.....	53
Závěr.....	55
Seznam literatury.....	56
Seznam zkratk.....	61

Cíle diplomové práce

1. Optimalizovat a kalibrovat metody pro stanovení vybraných metabolitů warfarinu pomocí HPLC s UV a fluorescenční detekcí
2. Optimalizovat podmínky pro sledování metabolických přeměn warfarinu za účasti CYP
3. Izolovat a charakterizovat lykopen z běžně dostupného zdroje (rajčatové pyré)
4. Určit vliv přírodních látek (silybin, lykopen, anthokyany) na metabolické přeměny warfarinu

Teoretická část

1 Úvod

Přírodní léčivé přípravky zaznamenávají stále větší oblibu u lidí, kteří chtějí těmito látkami v podobě např. doplňků stravy svému tělu prospět. Rostlinné léčivé přípravky v některých případech přispívají ke snížení rizika vzniku rakoviny nebo u chronicky nemocných mohou pomáhat zmírnit příznaky nemoci. Vzhledem ke stále se rozšiřujícímu užívání doplňků stravy lidskou populací a možnému ovlivnění hladin současně podávaných léčiv jsme se rozhodli v rámci diplomové práce sledovat interakce vybraných přírodních látek s enzymy, které se účastní metabolismu léčiv.

Jako modelové léčivo jsme vybrali warfarin. Warfarin patří svojí chemickou strukturou mezi kumarinové deriváty a pacientům se podává ve formě racemické směsi. V lékařství se používá jako antikoagulancium (snižuje srážlivost krve). Metabolických přeměn warfarinu se účastní jednak mikrosomální jaterní cytochromy P450 (CYP), které patří k enzymům účastnícím se tzv. I. fáze biotransformace xenobiotik (cizorodé látky, léčiva apod.), tak enzymy II. fáze (konjugační), které dále metabolizují warfarin za vzniku příslušných glukuronidů a sulfátů. Při léčbě warfarinem se projevují u vysokého procenta pacientů komplikace, které jsou často způsobeny různou hladinou této látky, která odráží různou intenzitu metabolických přeměn tohoto léčiva. Proto je nutný další výzkum týkající se studia ovlivnění aktivit příslušných enzymů.

Ke studiu vlivu přírodních látek na metabolismus warfarinu jsme si vybrali silybin z ostropestřce mariánského, který je už od pradávna znám pro své hepatoprotektivní účinky. Další studovanou látkou byl lykopen, což je červené karotenoidní barvivo vyskytující se např. v rajčatech nebo v papaye a které nachází stále větší oblibu jak u lidí při běžné konzumaci, tak u vědců, kteří zkoumají jeho pozitivní vliv na lidské zdraví. Třetím zástupcem přírodních látek byla směs anthokyanů z plodů klikvy velkoplodé, která je podobná u nás více známé brusnici brusince. Anthokyany jsou ve vodě rozpustné rostlinné pigmenty, které mají antioxidační a antibakteriální vlastnosti.

2 Přírodní látky

2.1 Silybin

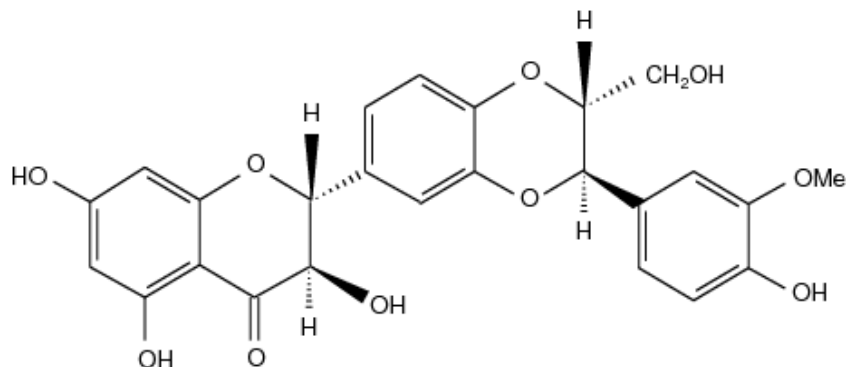
Zdrojem silybinu je rostlina zvaná ostropestřec mariánský, lat. *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Obr. 1). Botanicky se řadí mezi byliny pocházející z oblasti Středozemního moře, ale dnes roste i v mnoha částech Severní Ameriky a také ve Východní Asii. Je to jedno až dvouletá bylina, která může dorůst výšky až jeden metr. Listy jsou převážně v dolní části lodyhy a mají bílé žilkování. Květ má nachovou barvu a plodem jsou nažky s bílým chmýřím (Janča & Zentrich, 1995).



Obrázek 1 Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* (L.) Gaertn).

Svoji chemickou strukturou patří silybin mezi flavonolignany a je hlavní složkou silymarinu (~ 60%), což je standardizovaný extrakt ze sušených semen ostropestřce mariánského. V silymarinu se dále vyskytují flavonolignany isosilybin, silydianin, silychristin a dihydroflavonol taxifolin (Radjabian et al., 2008). Semena ostropestřce dále obsahují aminokyseliny, sacharidy, oleje s vyšším podílem nenasycených mastných kyselin, alkaloidy, sílice a organické kyseliny (Morazzoni & Bombardelli, 1995). Silybin, stejně jako ostatní polyfenolické látky, je špatně rozpustný ve vodě (Škottová & Krečman, 1997).

Přírodní silybin je přibližně ekvimolární směs dvou diastereomerů, silybinu A (Obr. 2) a silybinu B, jejichž analytická separace je celkem uskutečnitelná, zato preparativní separace je extrémně komplikovaná (Monti et al, 2010).



Obrázek 2 Struktura silybinu A.

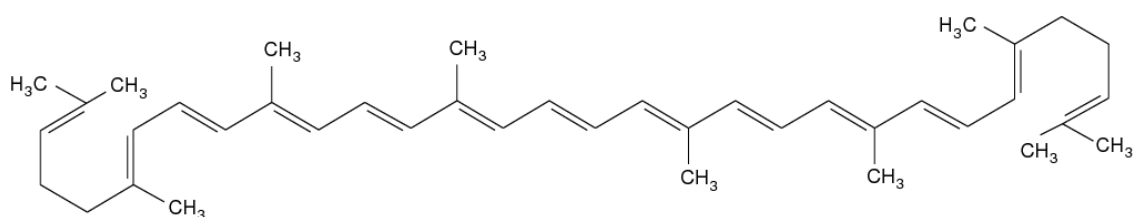
Ostropestřec mariánský, konkrétně extrakt ze semen, se začal užívat už ve 4. stol. př. n. l. a první písemná zmínka o této léčivé bylině pochází od Theophrasta (nar. 371 př. n. l.). V 16. stol. se extrakt z ostropestřce stal oblíbeným lékem na hepatobiliární nemoci a jeho oživení ve střední Evropě nastalo opět v roce 1960 (Pradhan & Girish, 2006).

V souvislosti s regeneračními účinky na játra, která hrají důležitou roli v regulaci metabolismu lipoproteinů v plazmě, byly provedeny experimenty, které naznačují, že silymarin má přímý účinek na metabolismus cholesterolu v játrech, konkrétně inhibuje biosyntézu cholesterolu. Později byly publikovány i další pozitivní účinky silymarinu na lidský organismus – chemoprotektivní, protinádorové nebo neuroprotektivní (Gažák et al., 2007). V dnešní době se silybin stává součástí mnoha fytopřípravků používaných často k podpůrné léčbě při otravě muchomůrkou zelenou, při chronické nemoci jater jako je např. steatóza (Škottová & Krečman, 1997) nebo při poškození jater způsobené alkoholem (Comoglio et al., 1995).

2.2 Lykopen

Karotenoidy jsou lipofilní barviva, která se vyskytují v květech, listech, plodech i peří papoušků. Patří do skupiny tetraterpenů (C₄₀) složených z osmi isoprenoidních jednotek. Nejjednodušším karotenoidem je *lykopen*. Má lineární řetězec se 40 uhlíky a 13 dvojnými vazbami, z toho 11 je konjugovaných. Lykopen může zaujímat v prostoru několik

konformací – *trans* isomer (Obr. 3), který se vyskytuje primárně a *cis* isomery vznikající působením světla nebo tepelnou energií. Nejstabilnější isomer je 5-*cis* lykopen, následovaný *trans* a pak zbývajícími *cis* isomery. Biosyntéza začíná sloučeninou fytoen ($C_{40}H_{64}$) s 9 dvojnými vazbami a přes fytofluen, karoten a neurosporen se postupným přidáváním dvojných vazeb dostaneme až k lykopenu (Macholán, 2003). Dalším produktem biosyntézy je β -karoten, lykopen je tedy jeho prekurzorem (Davis et al., 2003). Je to velice stabilní molekula, která je schopná odolat i oxidační, tepelné a světelné degradaci. Lykopen má charakteristické absorpční spektrum, které lze využít při jeho identifikaci, a to tři absorpční maxima při 448, 472 a 505 nm.



Obrázek 3 Struktura *trans* lykopenu.

Lykopen je zodpovědný za červenou barvu mnoha druhů ovoce a zeleniny jako jsou např. rajčata (Obr. 4). Nejvýznamnější zdroje lykopenu jsou uvedeny v Tab. 1.

Lykopen, stejně jako tokoferoly, vitamin E, askorbová kyselina (vitamin C) a ostatní karotenoidy, reaguje s volnými radikály, peroxidovými radikály a se singletovým kyslíkem (1O_2), což je základ pro jeho funkci jako antioxidant. Tyto reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou produkty buněčného metabolismu, avšak porušením rovnováhy mezi ROS a antioxidační kapacitou buňky (buňka nestíhá reaktivní produkty odbourávat) vzniká *oxidační stres*. Ten má za následek indukci poškození DNA, oxidaci proteinů a proces lipidové peroxidace (Sies & Stahl, 1995).



Obrázek 4 Rajče jedlé (*Solanum lycopersicum*).

Vstřebávání lykopenu probíhá přes gastrointestinální trakt (GIT) a chylomikrony. Studie, které se touto problematikou zabývají, uvádějí, že mnohem účinněji se tak děje z tepelně upravených rajčatových produktů než z čerstvých plodů. Absorbovaný lykopen je pak rozváděn po těle prostřednictvím cirkulačního systému. Je to dominantní karotenoid v lidské plazmě. Přestože u rostlin převládá *trans* isomer, v plazmě se nachází isomerická směs obsahující 50% *cis* isomeru. V tkáních lykopen podléhá oxidaci a metabolické přeměně. O metabolismu *in vivo* se toho ví velmi málo. *In vitro* však byly identifikovány dva typy metabolických produktů lykopenu a to 3-keto-apo-13-lykopenon a 3,4-dehydro-5,6-dihydro-15-lykopenal (Rao & Rao, 2007).

Tabulka 1 Obsah lykopenu ve vybraném ovoci a zelenině (podle Rao & Rao, 2007).

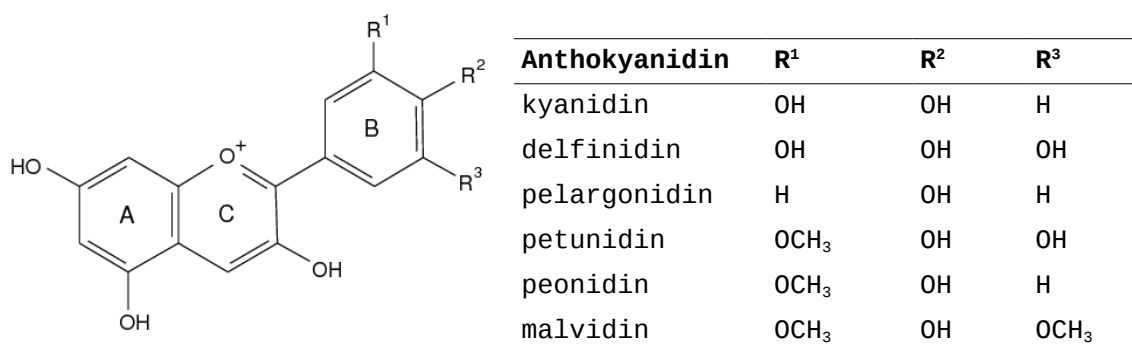
Zdroj	Lykopen ($\mu\text{g/g}$ mokré váhy)
gac (plod Momordiky indočínské)	2000-2300
čerstvé rajče	8,8-42
rajčatová šťáva	86-100
rajčatová omáčka	63-131
kečup	124
vodní meloun	23-72
růžový grapefruit	3,6-34
růžová guava	54
papaya	20-53
pyré ze šípků	7,8
meruňka	< 0,1

Epidemiologické studie ukazují, že lykopen může mít pozitivní účinky proti rakovině prostaty, zvláště proti více letálním formám této rakoviny. Pět studií uvádí 30-40% snížení rizika spojeného s vysokou konzumací rajčat nebo lykopenu. Tři studie souhlasí s 30% snížením rizika, ale výsledky nejsou statisticky významné a sedm studií tuto souvislost nepodporuje (Giovannucci, 2002). Další studie poukazují na to, že lykopen může působit jako ochrana proti oxidativnímu poškození plic. Po požití zeleninového džusu s vysokým obsahem karotenoidů a následnému vystavení ozonu se u testovaných jedinců zvýšila průměrná koncentrace lykopenu o 12% a poškození DNA plicních epitelálních buněk se snížilo o 20%. Autoři článku však nebyli schopni oddělit efekty lykopenu od ostatních karotenoidů, nicméně lykopen je převládající karotenoid v zeleninovém džusu (představuje 88% všech karotenoidů), a proto lze tyto účinky přisuzovat právě jemu (Arab et al., 2002). Další *in vitro* a *in vivo* studie ukazují, že

lykopen má prospěšnou roli při kardiovaskulárních chorobách, arteroskleróze, diabetes a neurodegenerativních onemocnění (Kong et al., 2010).

2.3 Anthokyany

Anthokyany (nebo také anthokyaniny) jsou nejdůležitější skupinou ve vodě rozpustných rostlinných pigmentů. V pletivech rostlin produkují modrou, fialovou a červenou barvu a u některých druhů mohou za černé zbarvení. Jejich odstín a struktura se odvíjí od hodnoty pH a přítomnosti kopigmentů. V přírodních zdrojích se nacházejí především jako glykosidy. Nejčastějšími sacharidy jsou glukosa, galaktosa, rhamnosa a arabinosa, obvykle se jedná o 3-glykosid nebo 3,5-diglykosid. *Anthokyanidiny* jsou pak anthokyany bez sacharidové složky, které jsou velmi nestabilní. Struktury šesti nejznámějších anthokyanidinů jsou na Obr. 5.



Obrázek 5 Struktury některých anthokyanidinů (podle Kowalczyk et al., 2003).

Anthokyany jsou obecně rozšířené u konzumních rostlin. Obsahuje je mnoho druhů ovoce a zeleniny, jak dokazují údaje z Tab. 2 (Clifford, 2000).

Tabulka 2 Obsah anthokyanů v některých druzích ovoce, zeleniny a vína (podle Clifford, 2000).

Zdroj	Obsah (mg.kg ⁻¹)
borůvka	825-4200
brusinka	600-2000
bezinka	2000-10000
ostružina	1150
jahoda	150-350
červené zelí	250
lilek	7500
červené víno	240-350
červené víno (portské)	140-1100

Klikva velkoplodá, lat. *Vaccinium macrocarpon* (Obr. 6), získala značnou pozornost pro své údajné vlastnosti prospívající lidskému zdraví. Plody obsahují 111,5 mg anthokyanů na 100 g suché váhy, včetně derivátů kyanidinu a peonidinu. Dále obsahují flavonoly, které se řadí mezi flavonoidy, a z toho největší zastoupení mají aglykony myricetin a kvercetin. Prokyanidiny, nebo také proanthokyanidiny, jsou další významnou složkou klikvy. Patří mezi polymerické flavonoidy složené z jednotek flavan-3-olu, které mají antioxidační vlastnosti. Jsou také schopny vázat proteiny a ionty kovů, což má podíl na jejich přínosu pro naše zdraví. Byly spolu s anthokyany uznány jejich protinádorové vlastnosti a inhibiční vliv na adhezi bakterií v močových cestách (White et al., 2010).



Obrázek 6 Klikva velkoplodá (*Vaccinium macrocarpon*).

Anthokyany jsou zástupci široké skupiny rostlinných pigmentů zvaných flavonoidy. V přírodě do této skupiny patří přes 500 sloučenin. Některé glykosidy anthokyanů mohou být po požití rychle vstřebány z žaludku a po průchodu játry vstupují do systémového oběhu. Zbytek se přesune do tenkého střeva. Anthokyany v oběhu mohou být metabolizovány. Ty anthokyany, které se dostanou až do tlustého střeva, jsou vystaveny mikrobiální populaci a mohou být degradovány na sacharid a fenolické sloučeniny. Další degradace vedou k narušení kruhu C za vzniku fenolových kyselin a aldehydů (McGhie & Walton, 2007).

Studie potvrdily jejich antioxidační vlastnosti a to díky hydroxylové skupině v pozici 3 na kruhu C a také v pozici 3' a 4' na kruhu B. Přítomnost hydroxylové skupiny na kruhu C umožňuje tvorbu chelátů s kovovými ionty, např. Fe, Cu. Antioxidační aktivita je také zvýšena díky acylaci sacharidových zbytků s aromatickými hydroxy kyselinami. Pokud srovnáme antioxidační vlastnosti anthokyanů s široce známými antioxidanty, ukáže se, že mají vyšší antioxidační aktivitu než vitamin E, kyselina askorbová a β -karoten. Této vlastnosti anthokyanů se mimo jiné využívá k léčbě kardiovaskulárních onemocnění (Kowalczyk et al., 2003). Další vlastností je inhibice růstu rakovinných buněk a anti-obezitní účinky (McGhie & Walton, 2007). Jiné studie zkoumaly efekt anthokyanů na lidské topoisomerasy I a II, a jejich význam pro integritu DNA bez lidských buněk. Bylo zjištěno, že anthokyany nesoucí hydroxy skupiny na kruhu B, silně inhibují katalytickou aktivitu topoisomeras (Habermeyer et al., 2005).

3 Cizorodé látky – Xenobiotika

Cizorodé látky neboli xenobiotika jsou látky, které se v organismu běžně nevyskytují a přijímáme je z vnějšího prostředí. Pro přehlednost je můžeme rozdělit na dvě třídy:

- *přírodní* - biogenní a heterocyklické aminy, alkaloidy, peptidy, polyfenoly, látky přírodní barviva, terpenoidy;
- bakteriální toxiny; toxiny sinic, mykotoxiny
- *antropogenní látky* - průmyslové kontaminanty (PCB, ftaláty, detergenty), anorg. polutanty, pesticidy;
- aditiva v potravinách;
- farmaka a jejich rezidua.

Osud těchto látek zkoumá obor xenobiochemie. Většina xenobiotik se následně v organismu

účastní chemického dění. Hlavními mechanismy toxicity xenobiotik je genotoxicita – metabolická aktivace promutagenů a chromosomální aberace, oxidativní stres, apoptotické procesy, inhibice mitochondriálních funkcí nebo poruchy metabolismu endogenních látek po působení xenobiotik.

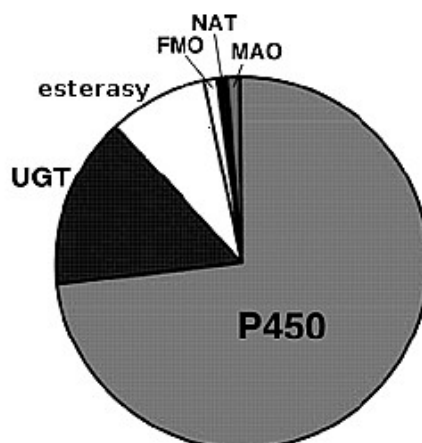
Dalším pojmem v této problematice, který už byl zmíněn výše, je *farmakon* (mn. č. farmaka). Farmakon je látka, která po vstupu do organismu vyvolá změnu jeho funkce či stavu. Farmaka obecně potlačují, stimulují nebo modifikují biologické procesy probíhající v buněčném metabolismu. Podle výsledného efektu na organismus je můžeme rozdělit na ta, která ho příznivě ovlivňují (léky) a která mají nepříznivý efekt (jedy). Obecně však platí, že všechna farmaka jsou více či méně toxická, záleží na dávce. Studium účinku farmak na funkci živých organismů se zabývá obor *farmakologie*.

Cest vstupu xenobiotik do organismu je několik. Nejběžnější je vstup zažívacím traktem, pak pokožkou, sliznicí a pro plynné látky je to inhalace (dýchací systém). Po vstupu cizorodé látky do organismu a následném vsřebání (resorpce) dochází k interakcím mezi xenobiotikem a složkami organismu. Tyto reakce lze rozdělit na fázi farmakokinetickou, ve které se uvolňují účinné látky, dochází k absorpci, distribuci, biotransformaci a exkreci, a farmakodynamickou, která zahrnuje reakce farmaka s receptory a vede k vyvolání biologického účinku (Vodrážka, 2007).

3.1 Biotransformace cizorodých látek

Biotransformace má za úkol přeměnit xenobiotika na látky (většinou) nepoškozující organismus, které se zároveň dají snadno vyloučit z organismu ven. Děje se tak pomocí biotransformačních enzymů, které nejprve zavedou skupinu, která zvýší rozpustnost (polárnost) xenobiotika ve vodě a zároveň tato skupina posléze slouží ke konjugační reakci za vzniku endogenního produktu metabolismu. Z toho vyplývá, že biotransformace probíhá ve dvou fázích. V I. fázi dochází k uvolnění nebo vytvoření funkční skupiny, např. -OH, -SH, -NH₂ a metabolit se stává více polární. Obecně řečeno, jedná se o děje oxidační, redukční a hydrolytické. Nejvýznamnějšími enzymy této fáze biotransformace jsou cytochromy P450, které patří mezi monooxygenasy. Dalšími enzymy, které se účastní biotransformace, jsou aldo-keto reduktasy, cyklooxygenasy, flavinmonooxygenasy, reduktasy nebo hydrolasy (Obr. 7). Ve II. fázi biotransformace dochází ke konjugačním reakcím za účasti konjugačních enzymů jako jsou glutathion-S-transferasy (GST), uridindifosfoglukuronyltransferasy (UDPGT), sulfotransferasy (SULF), N-acetyltransferasy nebo methyltransferasy (Anzenbacher

& Anzenbacherová, 2001, Murra et al., 2002, Vodrážka, 2007).



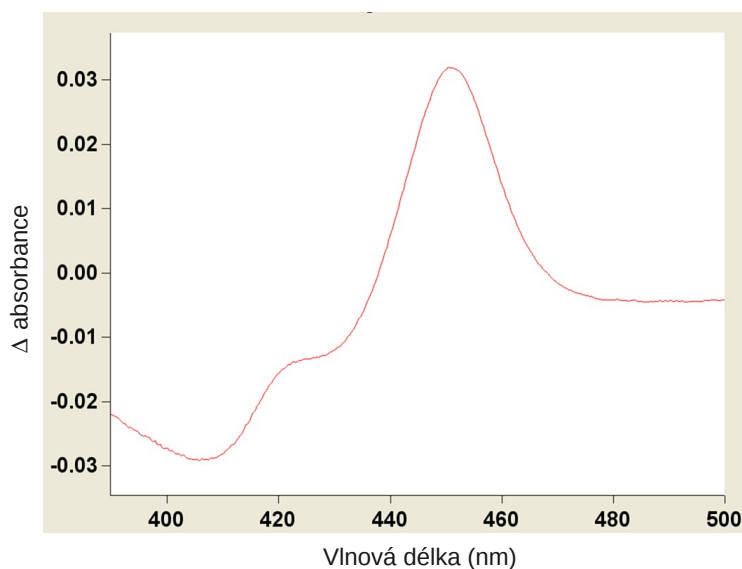
Obrázek 7 Podíl jednotlivých enzymových systémů na metabolismu prodávaných léčiv. UGT označuje UDP-glukuronosyltransferasu, FMO flavinmonooxygenasu, NAT *N*-acetyltransferasu a MAO monoaminoxidasu (podle Guengerich, 2006).

3.2 Cytochromy P450 (CYP)

CYP (EC 1.14.14.1.) patří do skupiny proteinů obsahujících hem (spolu s myoglobinem, hemoglobinem). Evolučně jsou však mnohem starší než například hemoglobin (Stiborová et al., 1999). Předpokládá se, že jejich evoluce začala před 2-3 miliardami let s pouhými několika geny kódující formy CYP, které byly zapojeny do metabolismu endogenních substrátů (steroidy, mastné kyseliny apod.). K dalšímu vývoji došlo před přibližně 1200 miliony lety, kdy se rozdělila zvířata a rostliny. Zvířata začala jíst rostliny a ty to donutilo ke zlepšení svých mechanismů obrany. Proto vyvinuly nové stresové metabolity (fytoalexiny), které dělaly rostliny méně chutnými/stravitelnými pro zvířata. Zvířata na to odpověděla novými geny pro CYP, který byly schopny tyto fytoalexiny detoxifikovat. Prudký nárůst nových forem P450 je vidět v posledních 400 milionech let, což je způsobeno především zvýšením frekvence duplikace a konverze genů CYP, dávající počátek genům, které kódují nové formy CYP metabolizující xenobiotika a/nebo endogenní substráty (Souček & Gut, 1992).

Jde o monooxygenasy, které se účastní oxidačních reakcí xenobiotik v I. fázi biotransformace cizorodých látek. Konkrétně se podílejí na metabolismu více jak 50 % léčiv, ale přeměňují také endogenní látky (např. steroidní hormony). To je řadí mezi nejdůležitější enzymy metabolismu xenobiotik. Nachází se v mnoha orgánech, např. v játrech, mozku, GIT,

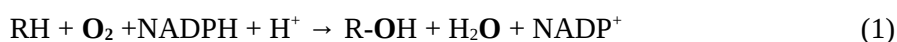
plicích, lymfocytech, kůži, svalech, ledvinách, v plodu nebo placentě. V buňce jsou cytochromy P450 lokalizovány především v endoplazmatickém retikulu (ER), ale také se nacházejí v mitochondriích, lysosomech a cytosolu (Murray et al., 2002, Vodrážka, 2007). Cytochromy P450 dostaly svůj název od jejich povahy jako hemoproteiny a kvůli neobvyklým spektrálním vlastnostem komplexu redukované formy s molekulou CO, kdy má tento komplex absorpční maximum při 450 nm (Obr. 8): cytochrom představuje hemoprotein, P pigment a 450 odpovídá absorpčnímu píku komplexu redukované formy CYP s CO (Bernhardt, 2006).



Obrázek 8 Ukázka absorpčního spektra redukovaného cytochromu P450 s molekulou CO.

CYP při oxidačních přeměnách cizorodých látek váží molekulu kyslíku na hemové železo (totéž, které je v molekule hemoglobinu či myoglobinu). Rozdíl mezi nimi spočívá ve způsobu interakce hemového železa s okolním proteinem. Oproti hemoglobinovému železu je v CYP atom železa vázán o něco silněji k thiolátové síře v aminokyselině cysteinu. Tato vazba dává hemu vlastnosti nezbytné k aktivaci kyslíku (konkrétně k rozštěpení molekuly O₂ na dva atomy kyslíku). Další osud těchto molekul je popsán níže.

Reakčního mechanismu reakce se účastní NADPH (rovnice 1), který za pomoci enzymu NADPH:P450-reduktasa slouží k redukcí CYP. Přesněji řečeno, dochází k přenosu elektronů z NADPH na CYP přes tento enzym. Pak následuje aktivace molekuly kyslíku, přerušení vazby a finální monooxygenace substrátu.



Detailní průběh reakce je ovšem mnohem složitější, než je naznačeno v rovnici, protože CYP nemusí využívat jen molekulární kyslík, ale také kyslík např. z peroxidů a zdrojem elektronů nemusí být jen NADPH ale i NADH. Dalším komplikujícím faktorem je skutečnost, že enzym potřebuje k tomu, aby mohl akceptovat elektrony, ještě mezičlánek, a to reduktasu obsahující jako koenzym flavin nebo také protein typu ferredoxinu.

Z této rovnice také vyplývá osud molekuly O₂. Po rozštěpení vytváří jeden atom kyslíku molekulu vody a druhý atom je aktivován a zaveden do molekuly substrátu. Proto se tato reakce nazývá monooxygenázová.

Další významnou vlastností těchto enzymů je, že většina z nich je inducibilních. Tato skutečnost je důležitá např. při dávkování léčiv vzhledem k intenzitě jejich metabolismu a udržení správné plazmatické koncentrace účinné látky (Murray et al., 2002, Vodrážka, 2007, Zuber et al., 2002).

Cytochromy P450 se vyskytují v mnoha formách, které jsou na základě podobnosti primární struktury zařazovány do rodin a podrodin. Formálně se rodiny značí prvním číslem za zkratkou CYP, pak následuje velké písmeno označující podrodinu a jednotlivé formy enzymů jsou označeny číslem za písmenem podrodiny. Z lidských jaterních CYP jsou pro metabolismus xenobiotik nejdůležitější CYP1A2, 2A6, 2D6, 2C, 2E1 a 3A4. Z pohledu celkového množství enzymů mají největší zastoupení CYP3A4 a CYP2C8/9/19, pak CYP1A2 a 2E1. I zde však množství a aktivitu enzymů ovlivňuje řada faktorů jako je genetický polymorfismus, věk, způsob života, užívaná léčiva apod. (Tab. 3). Substrátová specifita podílející se na metabolismu cizorodých látek je poměrně široká (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001, Stiborová et al., 1999).

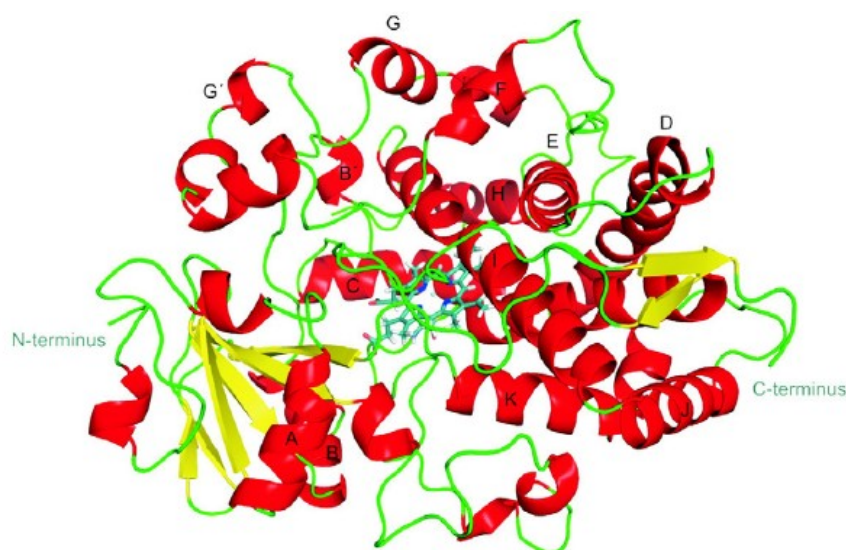
Tabulka 3 Faktory ovlivňující množství některých CYP u člověka (podle Stiborová et al., 1999).

CYP	Faktor
1A1, 1A2, 2E1, 3A4, 3A5, 3A7	výživa, léčiva
1A1, 1A2	kouření
2E1	alkohol
1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C, 2D6, 3A4, 3A5, 3A7	léčiva
1A1, 1A2, 2A6, 1B, 2E1, 3A4, 3A5, 3A7	vnější prostředí (polutanty)
1A1, 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1	genetický polymorfismus

3.3 Přehled důležitých forem lidských cytochromů P450

3.3.1 CYP3A4 (Obr. 9)

Tento enzym patří k nejdůležitějším cytochromům P450 pro svoji účast při metabolismu léčiv u člověka. Vykazuje širokou substrátovou specifitu, což je zřejmě důsledkem vysoké flexibility aktivního místa (Anzenbacherová et al., 2000). CYP3A4 se účastní metabolismu více než poloviny léčiv, u kterých je známá metabolická dráha. Z farmakologického hlediska je problémem vysoká variabilita aktivit tohoto enzymu u jednotlivých pacientů konzumující léky metabolizované CYP3A4 (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).



Obrázek 9 Topologie CYP3A4 s navázanými sekundárními elementy (Hendrychová et al., 2011).

3.3.2 CYP2C

Tato podrodina zahrnuje 4 formy a to CYP2C8, CYP2C9, CYP2C10 a CYP2C19. Druhá a třetí forma je často posuzována společně, jelikož se od sebe, co se týče struktury a substrátové specifity, liší jen velmi málo. CYP2C9 a CYP2C19 metabolizují důležitá léčiva (např. ibuprofen, diazepam nebo R-warfarin) a jsou vysoce polymorfní (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

3.3.3 CYP1A2

Tento enzym byl dlouho znám pod názvem P-448 a poprvé byl charakterizován v potkaních jaterních mikrosomech po indukci methylcholanthrenem. Přesně řečeno, jsou známy dva cytochromy P450 z podrodiny CYP1A: CYP1A1 a CYP1A2. První z nich (CYP1A1) je lokalizován hlavně extraheparálně a v játrech se zvyšuje jeho hladina až po indukci, CYP1A2 se vyskytuje převážně v játrech. Substráty těchto enzymů jsou např. aromatické aminy, polycyklické aromatické uhlovodíky. Příkladem léčiv, které jsou metabolizovány touto podrodinou, jsou kofein, phenacetin nebo theophylin. CYP1A1/2 je znám svým genetickým polymorfismem. Mezidruhově je tento protein konzervovaný, můžeme jej nalézt např. i u ryb (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

3.3.4 CYP2E1

CYP2E1 je jediný člen podrodiny CYP2E u savců. Známý je hlavně svou účastí na metabolismu ethanolu. Kromě toho je přítomen při biotransformaci mnohých malých organických molekul (jako substrátů), např. halogenované uhlovodíky (vinylchlorid, chloroform, methylchlorid), acetaldehyd, benzen nebo styren. Z léčiv metabolizuje acetaminophen (paracetamol) nebo chlorzoxazon (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

3.3.5 Experimentální zvířecí modely využívané při studiu metabolismu léčiv

Při vývoji nových léčiv se pro sledování farmakologických parametrů často využívají experimentální zvířata. Jedním z nejvíce užívaných zvířat je laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*). Na druhou stranu je třeba vždy brát v úvahu, že např. biotransformační enzymy potkana a člověka se značně liší. Co se týká lidských CYP, ne každá forma má svůj ekvivalent u potkana, nicméně jistá shoda existuje. Tabulka 4 shrnuje sekvenční homologii mezi potkaními a lidskými formami CYP. Nicméně pro nejdůležitější lidskou formu CYP, CYP3A4, není potkan vhodným modelem. A to z toho důvodu, že potkaní ortholog CYP3A1 není indukován typickým CYP3A induktorem rifampicinem a co je ještě důležitější, mnoho prototypů substrátů lidských CYP3A enzymů nejsou metabolizovány potkaními CYP3A1 nebo jinými formami CYP3A. Nejpočetnější podrodina CYP v potkaních játrech je CYP2C mající roli lidských CYP2C a CYP3A enzymů.

Tabulka 4 Sekvenční homologie potkaních a lidských forem CYP (podle Souček & Gut, 1992, Zuber et al., 2002).

Potkaní	Formy CYP	Sekvenční homologie [%]
	Lidské orthology	
CYP1A1	CYP1A1	80
CYP3A1	CYP3A4	73
CYP3A2	CYP3A5	71
CYP2B1	CYP2B6	78
CYP2C6	CYP2C10	75
CYP2C11	CYP2C9	80
CYP2D1	CYP2D6	71
CYP2E1	CYP2E1	75

Všechny hlavní lidské CYP byly nalezeny v jaterních mikrosomech prasete a miniprasete. Kromě lidských CYP2D6 a 2C9/10/19 se tyto modely hodí pro experimenty týkající se metabolismu xenobiotik. Pro studium lidských CYP2C9/10/19 se jeví jako dobrý model enzymy 2C podrodiny opice (*Maccacus rhesus*). Pokud se v budoucnu nenajdou významné rozdíly, opice se stanou jediným dobrým zvířecím modelem pro metabolismus zprostředkovaný enzymy podrodiny CYP2C. CYP2D15 je hlavní forma CYP u psa a jeho enzymová aktivita je shodná s lidskou formou CYP2D6. Proto se zdá být dobrým modelem pro tuto formu. Nalézt ideální zvířecí model pro experiment je nejdůležitější. Je nutné rozhodnout se pro hlavní očekávané CYP účastníci se metabolismu a podle toho vybrat příslušný zvířecí model (Zuber et al., 2002).

4 Přírodní látky a léčiva – lékové interakce

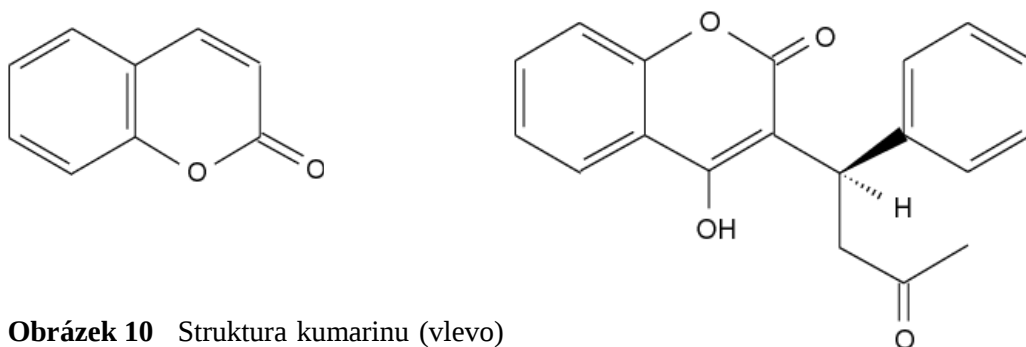
4.1 Lékové interakce

Lékové interakce jsou charakterizovány jako změny v účinku léčiva a délce jeho trvání vlivem jiné látky (léčivo, alkohol, potrava). Podle mechanismu dělíme interakce na farmaceutické, farmakokinetické a farmakodynamické. V této diplomové práci nás zajímaly

farmakokinetické interakce, při kterých je ovlivněna biotransformace léčiv, což je častá interakce. Děje se tak na základě změny aktivit enzymů, které katalyzují biotransformace léčiv. Jde buď o enzymovou indukci (zvýšení aktivity) nebo enzymovou inhibici (snížení aktivity). Při indukci enzymů dochází k rychlejší biodegradaci léčiva indukovanými enzymy, a proto je nutné k dosažení stejného účinku zvýšit dávku. Po ukončení podávání induktoru se během několika dní hladina CYP sníží, takže je třeba snížit i dávku léčiva. K indukci CYP (CYP1A1/2) dochází také při kouření cigaret, kdy benzopyreny přítomné v kouři vyvolávají systémové účinky. Klinické důsledky lékových interakcí se často projevují jako nežádoucí reakce nebo dokonce i selhání léčby (Martínková et al., 2007).

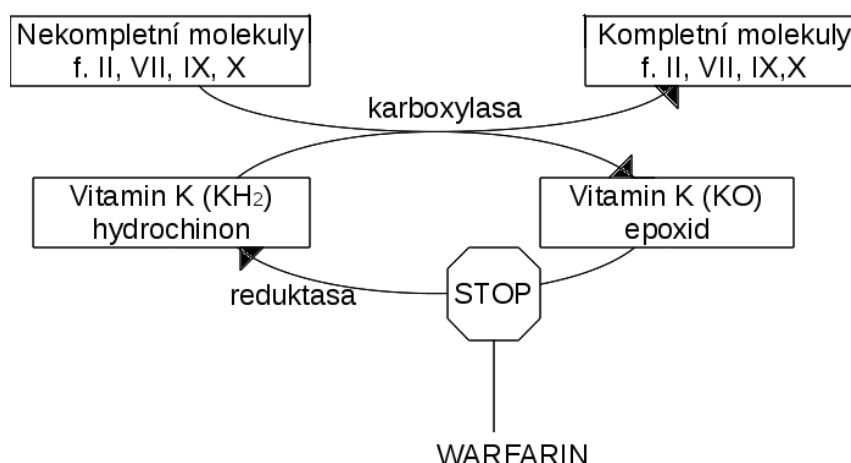
4.2 Warfarin

Warfarin je kumarinový derivát (Obr. 10), který se v lékařství používá jako nepřímé antikoagulancium, tedy ke snižování srážlivosti krve, podobně jako např. heparin. Užívá se při žilní trombóze, embolii apod. Jedná se o racemickou směs dvou enantiomerů, R a S, přičemž S-warfarin je 3-5x účinnější (Locatelli et al., 2005). Mechanismus účinku je dán tím, že se jako kofaktor účastní tvorby koagulačních faktorů II, VII, IX, a X, které jsou závislé na vitamínu K (Obr. 11). Při tvorbě koagulačních faktorů jsou jejich nekompletní formy převáděny karboxylací na kompletní molekuly schopné aktivace. To se děje za účasti enzymu karboxylasa, který vyžaduje redukovanou formu vitamínu K (hydrochinon) jako kofaktor. Během této reakce dochází k oxidaci vitamínu K na epoxid, který je zpátky na hydrochinon redukován reduktasou. Nepřímá antikoagulancia blokují právě reduktasu, a tím zastavují i karboxylaci nekompletních molekul koagulačních faktorů. Warfarin se po perorálním užití rychle a kompletně vstřebává z GIT, váže se na plazmatické bílkoviny a eliminuje se v játrech (za účasti CYP) a ledvinách (Martínková et al., 2007).



Obrázek 10 Struktura kumarinu (vlevo)

a jeho derivátu S-warfarinu (vpravo).



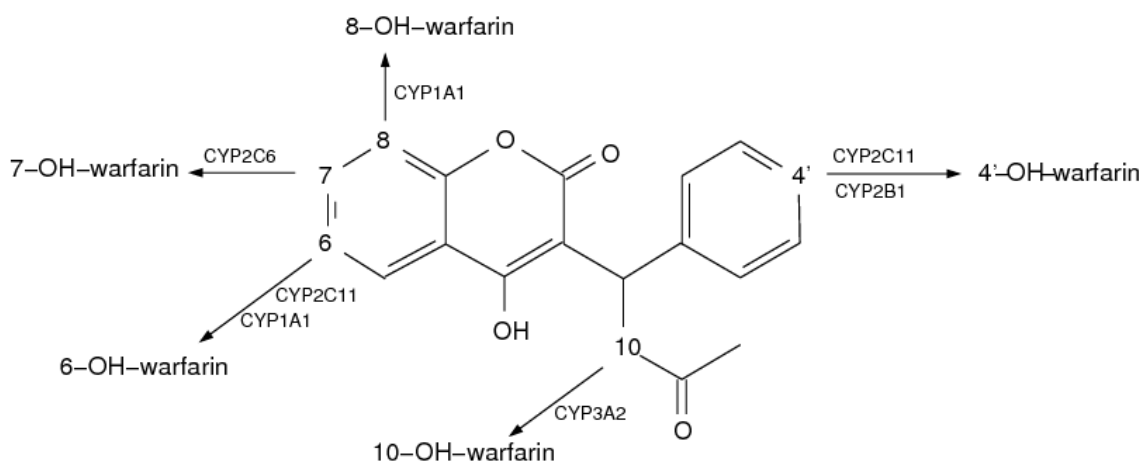
Obrázek 11 Mechanismus účinku perorálních antikoagulancií (podle Martínková et al., 2007).

Počet lidí léčených warfarinem neustále roste. K 50 milionům jich každý rok přibudou 2 miliony. Komplikace při léčbě se projevují u vysokého procenta pacientů a jsou často způsobeny různou intenzitou metabolických přeměn tohoto léčiva. Proto je nutný další výzkum v této oblasti (Jones et al., 2009).

4.2.1 Metabolismus warfarinu

Metabolismus warfarinu můžeme rozdělit na dvě části. V I. fázi biotransformace dochází k redukci a oxidaci warfarinu. Reduktasy přeměňují warfarin na alkohol, CYP produkují hydroxyderiváty warfarinu. V této fázi vzniká hydroxylací 5 metabolitů warfarinu a to v závislosti na výchozí formě. U člověka vzniká z S-formy 7-OH-warfarin, 6-OH-warfarin a 4'-OH-warfarin. U R-formy vzniká ještě navíc 10-OH-warfarin a 8-OH-warfarin, nejvíce však 6-OH-warfarin a 10-OH-warfarin. Následuje II. fáze, ve které dochází ke konjugacním reakcím, konkrétně jde o glukuronidaci UDP-glukuronosyltransferasami (UGT) a sulfonaci sulfotransferasami (SULF) (Jones et al., 2009).

U potkanů se hydroxylace warfarinu účastní enzymy podrodin CYP2C, CYP2B, CYP1A a CYP3A (Obr. 12) (Ishizuka et al., 2007). Warfarin a jeho metabolity mají přirozenou fluorescenci, a tak se této vlastnosti využívá při jejich stanovování pomocí HPLC (Lang & Böcker, 1995).



Obrázek 12 Metabolická dráha warfarinu u potkanů (podle Ishizuka et al., 2007).

5 Studium cytochromů P450

Při studiu interakcí CYP s léčivou se využívá několika přístupů. Je možné tyto interakce sledovat v rámci celého organismu, kdy se laboratornímu zvířeti podává modelové léčivo a sledují se hladiny metabolitů v séru nebo v moči. Z hlediska zisku informací je při tomto postupu výhodou, že se dají zjistit konkrétní účinky léčiva na celý organismus, na druhou stranu nám říká velmi málo o metabolických přeměnách léčiva na buněčné úrovni. K tomu se lépe hodí izolované perfundované orgány (hlavně játra) nebo mikrosomální frakce buněčného homogenátu. Jelikož játra jsou hlavním orgánem biotransformace a obsahují nejvíce biotransformačních enzymů, byly v diplomové práci použity jako zdroj studovaných enzymů fragmenty ER jaterních buněk, nazývané *mikrosomy*. Vznikají z ER při homogenizaci jaterní tkáně, kdy se vytváří z ER uzavřené měchýřky (mikrosomy); získají se pak frakční centrifugací. Při tomto postupu se z buněčného homogenátu postupně odstraní těžší složky jako jsou jádra, mitochondrie nebo lysosomy. Mikrosomální frakce sedimentuje při 100000 g (Šípal et al., 1981). K navození podmínek, které panují v živém organismu, se využívají modelové systémy, které jsou navrženy tak, aby co nejlépe imitovaly prostředí daného orgánu. K jaterní mikrosomální frakci se při studiu aktivity CYP přidává obvykle fosfátový pufr obsahující NADPH jako zdroj redukčních ekvivalentů pro enzymatické přeměny a obsahu potřebných iontů. Dále systém obsahuje konkrétní léčivo/léčiva nebo jiné testované látky. Vzniklé metabolity se pak identifikují a kvantifikují pomocí různých analytických metod jako je kapilární elektroforeza, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), přímé fotometrické,

fluorescenční nebo luminiscenční metody. Nejčastěji se k analýze metabolitů používá HPLC a tato metoda byla použita i v této diplomové práci. Stručné charakterizaci HPLC se věnuje následující kapitola.

5.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Chromatografické metody patří mezi separační metody, při nichž dochází k dělení směsi látek. Základním principem chromatografie je využití rozdílné afinity jednotlivých složek směsi ke dvěma vzájemně nemísitelným fázím: mobilní a stacionární. Mobilní fází bývá kapalina nebo plyn, stacionární fází tvoří pevný nosič (sorbent) nebo kapalina. Podle uspořádání můžeme chromatografii rozdělit na sloupcovou (kolonovou), kde je kolona naplněna vhodným sorbentem, a plošnou, kde separace probíhá na tenké vrstvě sorbentu.

Je-li účelem chromatografie získání informace o dělených látkách a jejich kvantifikace, pak se jedná o chromatografii analytickou. V případě, že chceme získat větší množství čistých látek, hovoříme o chromatografii preparativní.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC = high performance liquid chromatography) se využívá ke kontinuálnímu dělení látek na sorbentu o velmi malých částicích (3-20 μm) v kovových (dříve i skleněných) kolonách. Dostatečný průtok je zajištěn přetlakem až desítek MPa a k protlačení rozpouštědla kolonou se využívají vysokotlaká čerpadla, která generují tlak 1-60 MPa.

Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníku rozpouštědla (mobilní fáze), čerpadla, dávkovacího ventilu (který je většinou součástí autosampleru), kolony, detektoru(ů) a vyhodnocovacího zařízení s příslušným softwarem. Složení mobilní fáze může být po celou dobu analýzy stejné, pak hovoříme o izokratické eluci. Pokud se složení mobilní fáze během analýzy mění, jedná se o gradientovou eluci. Dávkovací ventily umožňují nástřik vzorku proti tlakům až 60 MPa. Často to jsou ventily s výměnnou dávkovací smyčkou o vnitřním objemu 0,5 μl – 2 ml. Kolony jsou trubice naplněné sorbentem mající velkou mechanickou pevnost (musí odolávat vysokým tlakům). Stacionární fází může být chemicky modifikovaný oxid křemičitý. Pro separaci nepolárních látek (např. většiny léčiv) se využívají hydrofóbní stacionární fáze s navázanými alkylovými řetězci: C18 – oktadecyl, C8 – oktyl. Kromě hydrofóbních kolon se používají iontoměničové kolony, absorbenty nebo stacionární fáze nanesené na inertní nosič. Nejběžnějším detektorem je fotometrický detektor, který sleduje absorbance látek vystupujících z kolony. Pro UV oblast se používá deuteriová výbojka, pro viditelné záření halogenová žárovka. Často se také využívá detektor diodového pole, který

zaznamenává celé absorpční spektrum v dané oblasti vlnových délek. Fluorimetrický detektor se používá pro látky, které vykazují fluorescenci. Zdrojem světla je xenonová výbojka nebo laser. Výhodou je snadná dosažitelnost nízkých mezí detekcí. Dnes už se stále častěji uplatňuje hmotnostní detektor, který na základě hmotnostních spekter přímo identifikuje jednotlivé separované látky (Opekar et al., 2003).

Experimentální část

6 Materiál

6.1 Biologický materiál

6.1.1 Mikrosomy

Směsné potkaní jaterní mikrosomy byly připraveny frakční centrifugací (Šípal et al., 1981).

Charakterizace MS: $c_{\text{proteinu}} = 20,85 \text{ g.l}^{-1}$

$c_{\text{P450}} = 23,95 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$

6.1.2 Přírodní látky

Standard silybinu byl od firmy Galena Primary (Opava, CZ).

Lykopen byl izolován z komerčně dostupného rajčatového pyré značky Hamé extrakcí do organického rozpouštědla.

Anthokyaniny byly komerčního původu – HI-PAC 4.0 (lyofilizovaná šťáva *Vaccinium macrocarpon* Ait. Standardizovaná na 4,75% proanthokyanidinů), od firmy Decas Botanical Synergies (USA).

6.2 Chemikálie

Firmou Sigma Aldrich (Praha, CZ) bylo dodáno: isocitrátdehydrogenasa (IDH), kyselina DL-isocitronová (ISO), β -nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADP⁺), Trizma base (TRIS), warfarin.

Od Lach-Ner (Neratovice, CZ) bylo zakoupeno: dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), dichlormethan (CH₂Cl₂), dimethylsulfoxid (DMSO), chlorid draselný (KCl), kyselina ethylendiamintetraoctová dihydrát (EDTA), kyselina chloristá (HClO₄), sacharosa, síran hořečnatý heptahydrát (MgSO₄.7H₂O).

Merck (Praha, CZ): acetonitril (CH₃CN), methanol (CH₃OH), tetrahydrofuran (THF).

Fluka (Buchs, Švýcarsko) dodala: phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), butylovaný hydroxytoluen (BHT).

Linde Technoplyn (Praha, CZ): dusík, oxid uhelnatý (CO).

Všechny použité chemikálie byly p.a. čistoty, vhodné pro experimenty s biologickým materiálem a pro enzymová stanovení.

6.3 Přístrojové vybavení

analytické váhy GR-202 (Schoeller Instruments, Praha, CZ)

centrifuga BR4i (Jouan, Saint Nazaire, Francie)

koncentrátor vzorků TERMOVAP TV 10 (ECOM, Praha, CZ)

magnetická míchačka Heidolph MR 1 000 (Fischer Scientific, Pardubice, CZ)

minicentrifuga HERMLE Z 100 M (HERMLE, Korea)

minitřepačka IKA MS 3 basic (MERCY, Brno, CZ)

pH metr Schott CG 843 (Fischer Scientific, Pardubice, CZ)

spektrofotometr/spektrofluorimetr/luminometr TECAN Infinite M200 (Schoeller Instruments, Praha, CZ)

spektrofotometr Varian Cary UV VIS 4000 (Varian, Melbourne, AUS)

ultrazvukový generátor K 10 (Kraintek, Podhájska, Slovensko)

vodní lázeň WB 14 (Memmert, Schwabach, Německo)

zařízení pro přípravu čisté a ultračisté vody Watrex Ultrapur (Watrex, Praha, CZ)

HPLC systém :

řídící jednotka (Shimadzu system controller SCL-10AVP, Shimadzu, Kyoto, Japonsko), kolona Hibar 125-4 LiChrospher 100 RP-18, velikost částic 5 μm (Merck, Praha, CZ), vyhřívání kolony (Shimadzu column oven CTO-10AC, Japonsko), UV/VIS detektor (Shimadzu, UV-VIS detector SPD-10AVP, Japonsko), fluorimetrický detektor (Shimadzu diode array detector SPD-10A, Japonsko), autosampler se smyčkou 50 μl (Shimadzu autoinjector SIL-10ADVP, Japonsko), odplyňovač mobilní fáze (Shimadzu degasser DGU-20A5, Japonsko), pumpa

(Shimadzu liquid chromatograph LC-10AT, Japonsko)

Software:

OpenOffice.org 3.2.1

Sigma Plot v. 8.0 (SPSS, Chicago, IL)

Shimadzu CLASS-VP (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

7 Metody

7.1 Izolace mikrosomů z jater potkana

Všechny potřebné nástroje (včetně centrifugy) byly předem vychlazeny, práce s játry byla prováděna na ledu. Játra byla zvážena a nastříhávána na kousky v homogenizačním médiu ($0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ sacharosa, 1 mmol.l^{-1} EDTA, pH 7,4), do kterého bylo těsně před použitím přidáno $0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$ PMSF a $20 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ BHT, zfiltrována přes gázu a následně ještě dvakrát promyta homogenizačním médiem. Poté bylo přidáno homogenizační médium o trojnásobném objemu váhy jater a játra byla homogenizována ponorným nožovým homogenizátorem třikrát 10 vteřin. Homogenizované suspenze byly nality do 50 ml kyvet, kyvety byly vyváženy a centrifugovány při 4000 g 10 minut 4°C . Vzniklý supernatant byl slit a naplněn opět do 50 ml kyvet a kyvety byly vyváženy. Další centrifugace byla prováděna při 11400 g 25 minut 4°C .

Supernatant byl přelit do ultracentrifugačních zkumavek, doplněn homogenizačním médiem po okraj zkumavky a ta byla uzavřena. Zkumavky byly zkontrolovány, zda neobsahují bublinky a pak byly vloženy do ultracentrifugy. Otáčky byly nastaveny na 126000 g po dobu 1 hodiny při 4°C . Po ultracentrifugaci byl supernatant odstraněn a sediment byl resuspendován v homogenizátoru v promývacím pufru (50 mmol.l^{-1} TRIS, $0,15 \text{ mol.l}^{-1}$ KCl, $0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$ PMSF, $20 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ BHT, pH 7,4), v objemu odpovídajícímu váze jater pomocí homogenizátoru podle Pottera a Elvehjema (P-E) s teflonovým pístem. Poté byla provedena další ultracentrifugace při 126000 g 1 hodinu při 4°C . Supernatant byl opět odstraněn, sediment byl skleněnou tyčinkou odstraněn ze stěn zkumavek a resuspendován v rehomogenizačním pufru (20 mmol.l^{-1} K/PO_4 , $0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$ EDTA, 20% glycerol, pH 7,4) o objemu dvou desetin váhy jater v P-E homogenizátoru. Po rehomogenizaci byly odebrány vzorky na stanovení koncentrace proteinů

a CYP a zbytek mikrosomů byl uchován v hluboko mrazícím boxu při -70°C.

7.2 Stanovení koncentrace cytochromů P450 v mikrosomální frakci

Mikrosomální frakce byla dvacetkrát naředěna fosfátovým pufrům (100 mmol.l⁻¹ KH₂PO₄, pH 7,4) a přítomné hemoproteiny byly redukovány dithioničitanem sodným (redukce Fe³⁺ na Fe²⁺). Pak byla suspenze rozdělena do dvou kyvet a obě kyvety pak byly vloženy do spektrofotometru. Po nastavení baseline byla vzorková kyveta probublána slabým proudem CO (vznik komplexu [Fe²⁺CO]). Po vzniku komplexu s CO bylo změřeno absorpční spektrum v oblasti vlnových délek 400 až 490 nm a ze získaných hodnot absorbance při 450 a 490 nm byla vypočítána molární koncentrace CYP v μmol.l⁻¹ (vzorec 2). Molární absorpční koeficient pro CYP je 0,091 M⁻¹.cm⁻¹ (Šípál et al., 1981).

$$c_{P450} = \frac{\Delta A_{450-490}}{0,091} * \check{R} \quad (2)$$

Δ A – rozdíl absorbancí při vlnových délkách 450 a 490 nm

Ř – ředění

7.3 Stanovení koncentrace proteinů v mikrosomální frakci

Ke stanovení obsahu proteinů byl využit komerční kit firmy Pierce (Rockford, Il, USA) s využitím sodné soli kyseliny bicinchoninové (BCA). Metoda je založená na alkalické redukci Cu²⁺ na Cu¹⁺ proteinem a následné chelataci Cu¹⁺ BCA kyselinou za vzniku fialově zbarveného produktu reakce. Tento ve vodě rozpustný komplex absorbuje při 562 nm.

Mikrosomální frakce byla naředěna fosfátovým pufrům (100 mmol.l⁻¹ KH₂PO₄, pH 7,4) a bylo přidáno činidlo A (BCA a vlnan sodný v alkalickém roztoku uhličitanu a hydrogenuhličitanu sodného) a B (4% roztok pentahydrátu síranu měďnatého) v poměru 50:1. Mikrosomy byly inkubovány při 37°C 30 minut a poté ochlazeny na laboratorní teplotu. Absorbance byla měřena při 562 nm a celkové množství proteinů v mg.ml⁻¹ bylo stanoveno z kalibrační přímky (Protein assay-technical handbook, 1999).

7.4 Využití HPLC pro stanovení metabolitů warfarinu

7.4.1 Optimalizace a kalibrace metody

Kalibrace stanovení jednotlivých metabolitů warfarinu

Pro stanovení metabolitů warfarinu bylo použito HPLC (přístroj od firmy Shimadzu). Při vývoji metody se vycházelo z práce Locatelli et al. (2005). Separace byla provedena na chromatografické koloně LiChroCART (250 mm x 4 mm i.d.) s náplní LiChrospher RP-18e (velikost částic 5 μm) od firmy Merck, mobilní fáze měla složení 15 mmol.l^{-1} K/PO_4 (pH 3), methanol a acetonitril v poměru 52:32:16, průtok 1 ml.min^{-1} , teplota 40°C, aplikace 50 μl , detekce UV 306 nm, fluorescenční excitace 320 nm a emise 415 nm. Délka analýzy byla 35 minut.

Kalibrace pro UV detekci vybraných metabolitů warfarinu (4'-OH, 6-OH, 7-OH, 8-OH a 10-H warfarinu) byla provedena pro koncentrace 0,1; 1; 2 a 4 nmol v roztoku, který odpovídal složením reakční směsi. Reakční směs obsahovala 1 mg.ml^{-1} proteinů a dále systém generující NADPH (NADP⁺ 1 mmol.l^{-1} , ISO 7 mmol.l^{-1} , IDH 0,3 units/ml a Mg²⁺ 10 mmol.l^{-1}) a 100 mmol.l^{-1} K/PO_4 (pH 7,4). Reakce byla zastavena přidáním 10 μl 70% HClO_4 . Poté byly vzorky centrifugovány při 18400 g 10 minut při 4°C. 200 μl supernatantu bylo přepipetováno do vialek a následovala chromatografická analýza HPLC systémem. Pro každou koncentraci metabolitů warfarinu byly připraveny dva vzorky.

Později byla provedena další kalibrace, tentokrát pro fluorimetrickou detekci vybraných metabolitů warfarinu (Lang & Böcker, 1995). Reakční směs obsahovala 1 mg.ml^{-1} proteinů a koncentrace 4'-OH, 6-OH, 7-OH, 8-OH a 10-OH metabolitů warfarinu byla 0,1; 1; 2 a 4 nmol. Opět byl přidán systém generující NADPH (NADP⁺ 1 mmol.l^{-1} , ISO 7 mmol.l^{-1} , IDH 0,3 units/ml a Mg²⁺ 10 mmol.l^{-1}), 100 mmol.l^{-1} K/PO_4 (pH 7,4) a reakce byla zastavena 10 μl 70% HClO_4 . Následně byly vzorky centrifugovány (18400 g, 10 min, 4°C) a 200 μl supernatantu bylo pipetováno do vialek. Pak byla provedena HPLC analýza.

Optimalizace podmínek pro stanovení metabolických přeměn warfarinu

Pro určení optimální koncentrace warfarinu v reakční směsi při inhibičních studiích byla stanovena K_m a V_{lim} pro každou enzymatickou přeměnu warfarinu. Zásobní roztok warfarinu pro všechny experimenty v této diplomové práci byl připraven naředěním 50 mmol.l^{-1} roztoku warfarinu v acetonitrilu do fosfátového pufru na koncentraci 2 mmol.l^{-1} . Při sledování parametrů enzymové kinetiky jednotlivé koncentrace warfarinu v reakční směsi byly 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 a 1000 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Reakční směs obsahovala 1 mg.ml^{-1} proteinů a dále byl

přidán systém generující NADPH (NADP^+ 1 mmol.l⁻¹, ISO 7 mmol.l⁻¹, IDH 0,3 units/ml a Mg^{2+} 10 mmol.l⁻¹) a 100 mmol.l⁻¹ K/PO₄. Poté byly vzorky inkubovány ve vodní lázni při 37°C po dobu 25 minut. Reakce byla zastavena 10 μl 70% HClO₄. Vzorky byly důkladně promíchány a centrifugovány (18400 g, 10 minut, 4°C). Pro HPLC analýzu bylo odebráno 200 μl supernatantu do vialek.

Při hledání optimální délky inkubace byl sledován časový průběh reakce při dvou různých koncentracích proteinů. Konkrétně byla inkubace prováděna v délkách 0, 5, 10, 20 a 30 minut a koncentrace proteinů byla 1 mg.ml⁻¹ a 2 mg.ml⁻¹. Koncentrace warfarinu v reakční směsi byla 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Reakční směs dále obsahovala systém generující NADPH (NADP^+ 1 mmol.l⁻¹, ISO 7 mmol.l⁻¹, IDH 0,3 units/ml a Mg^{2+} 10 mmol.l⁻¹) a 100 mmol.l⁻¹ K/PO₄. Inkubace probíhala při 37°C v uvedených časech a reakce byla zastavena 10 μl 70% HClO₄. Vzorky byly důkladně promíchány a centrifugovány při 18400 g 10 minut 4°C. Do vialek bylo odebráno 200 μl supernatantu pro HPLC analýzu.

7.5 Izolace a charakterizace lykopenu

Izolace lykopenu byla prováděna z rajčatového pyré značky Hamé extrakcí do dichlormethanu. Do dělicí nálevky bylo dáno 10 g rajčatového pyré, 20 ml destilované vody a 80 ml dichlormethanu. Tato směs byla vytřepávána třikrát 5 minut, poté se nechal obsah rozdělit a dolní vrstva byla oddělena. Dichlormethanový extrakt byl odpařen pod proudem N₂ při 65°C a znovu rozpuštěn v dichlormethanu. Poté byl přelit do předem zvážené zábrusové zkumavky a opět odpařen pod N₂ při 65°C. Po vychladnutí byla zkumavka zvážena a vypočítán výtěžek extrakce. Izolovaný lykopen byl uskladněn v mrazicím boxu při - 18°C.

Charakterizace získaného lykopenu byla prováděna HPLC analýzou podle prací Xu et al. (2006) a Caris-Veyrat et al. (2003). Vzorek lykopenu byl rozpuštěn v mobilní fázi a chromatograficky analyzován. Mobilní fáze měla složení methanol, acetonitril a THF v poměru 70:25:5, průtok 1,5 ml.min⁻¹, teplota 30°C, aplikace 50 μl , detekce UV 200-550 nm. Délka analýzy byla 35 minut.

Pro inhibiční studie byl zásobní roztok lykopenu o koncentraci 113,7 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ připraven rozpuštěním lykopenu v acetonitrilu. Acetonitril byl vybrán z toho důvodu, že má menší inhibiční vliv na aktivitu studovaných cytochromů P450 než např. DMSO (Easterbrook et al., 2001). Vzorek lykopenu byl také charakterizován spektrofotometricky porovnáním s tabulkovými spektry.

Menší vzorek rozpuštěného lykopenu o koncentraci 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ byl ponechán stranou ve

skleněné uzavřené lahvičky při laboratorní teplotě pro stabilitní studii, která měla určit jak je lykopen stabilní v roztoku. Přibližně jednou za 10 dní bylo prováděno spektrofotometrické stanovení. Do vzorkové i srovnávací kyvety byl odměřen acetonitril a byla změřena baseline. Do vzorkové kyvety bylo pipetováno 50 μl roztoku lykopenu, do srovnávací kyvety stejné množství rozpouštědla a bylo měřeno absorpční spektrum od 200 do 700 nm. Výsledné absorbance za jednotlivá měření byly porovnány, aby byla zjištěna stabilita lykopenu v roztoku.

7.6 Vliv silybinu na metabolické přeměny warfarinu

Zásobní roztok silybinu byl připraven o koncentraci 45 mmol.l^{-1} rozpuštěním silybinu v acetonitrilu. Reakční směs obsahovala mikrosomy ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ proteinů), silybin (0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), fosfátový pufr ($100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4) a systém generující NADPH (NADP^+ 1 mmol.l^{-1} , ISO 7 mmol.l^{-1} , IDH $0,3 \text{ units/ml}$ a Mg^{2+} 10 mmol.l^{-1}). Byly připraveny i kontrolní vzorky, které místo silybinu obsahovaly stejné procentuální zastoupení rozpouštědla (acetonitrilu). Tato kontrola byla dělána proto, aby bylo ověřeno, že k inhibicím docházelo působením silybinu a ne acetonitrilu. Vzorky byly preinkubovány při 37°C 5 minut a pak k nim byl přidán warfarin ($200 \mu\text{mol.l}^{-1}$ v reakční směsi). Další inkubace byla při 37°C 25 minut. Reakce byla zastavena $10 \mu\text{l}$ $70\% \text{ HClO}_4$. Centrifugací (18400 g , 10 minut, 4°C) jednotlivých reakčních směsí byly získány supernatanty, se kterými byla provedena HPLC analýza.

7.7 Vliv lykopenu na metabolické přeměny warfarinu

Reakční směs obsahovala mikrosomy ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ proteinu), lykopen (0; 0,04; 0,2; 2 a $4 \mu\text{mol.l}^{-1}$), fosfátový pufr ($100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4) a systém generující NADPH (NADP^+ 1 mmol.l^{-1} , ISO 7 mmol.l^{-1} , IDH $0,3 \text{ units/ml}$ a Mg^{2+} 10 mmol.l^{-1}). Byly zhotoveny i kontrolní vzorky, které místo lykopenu obsahovaly stejné procentuální zastoupení rozpouštědla (acetonitrilu) a jeden kontrolní vzorek, u kterého byla reakce zastavena ještě před přidáním lykopenu. Vzorky byly preinkubovány při 37°C 10 minut a pak k nim byl přidán warfarin ($200 \mu\text{mol.l}^{-1}$ v reakční směsi). Další inkubace byla při 37°C 25 minut. Centrifugací při 18400 g , 4°C a po dobu 10 minut byly získány supernatanty, které byly přepipetovány do zkumavek. Pro dokončení precipitace biologického materiálu byly vzorky ponechány 20 minut při laboratorní

teplotě. Pak byla provedena druhá centrifugace za stejných podmínek. 200 μl supernatantu bylo pipetováno do vialek a byla provedena HPLC analýza.

7.8 Vliv anthokyanů na metabolické přeměny warfarinu

Reakční směs obsahovala mikrosomy ($1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ proteinu), směs anthokyanů (0; 0,08; 0,025; 0,075 a $0,225 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), fosfátový pufr ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 , pH 7,4) a systém generující NADPH (NADP^+ $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, ISO $7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, IDH $0,3 \text{ units/ml}$ a Mg^{2+} $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Byl připraven jeden kontrolní vzorek, u kterého byla reakce zastavena ještě před přidáním anthokyanů. Vzorky byly preinkubovány při 37°C 10 minut a pak k nim byl přidán warfarin ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v reakční směsi). Další inkubace byla 25 minut při 37°C . Centrifugací při 18400 g , 4°C 10 minut byl získán supernatant, který byl přepipetován do zkumavky. Pro dokončení precipitace biologického materiálu byly vzorky ponechány 20 minut při laboratorní teplotě. Pak byla provedena druhá centrifugace za stejných podmínek. 200 μl supernatantu bylo pipetováno do vialek a byla provedena HPLC analýza.

Kontrolní vzorky na působení organického rozpouštědla zde nebyly nutné, jelikož anthokyany jsou rozpustné ve vodě.

8 Výsledky

První část experimentů byla zaměřena na zavedení a validaci metod *in vitro*, které byly využity a dále budou využívány k testování vlivu přírodních látek na aktivitu enzymů účastnících se metabolismu warfarinu.

8.1 Charakterizace mikrosomální frakce jaterního homogenátu potkana

Mikrosomální frakce jaterního homogenátu potkana byla charakterizována stanovením koncentrace celkových proteinů a cytochromu P450. Koncentrace proteinů byla $20,85 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, koncentrace cytochromu P450 $23,95 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

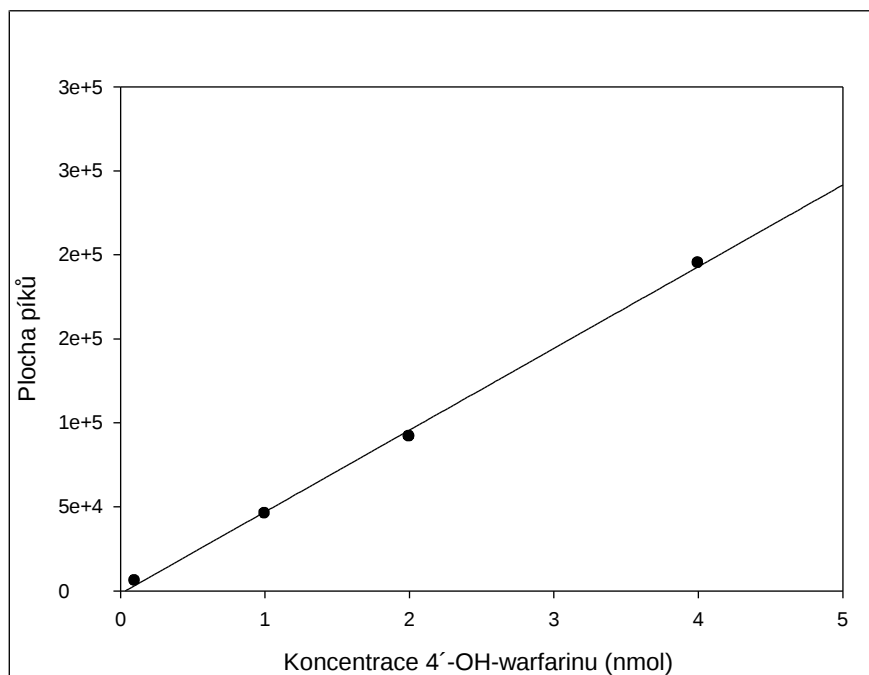
8.2 Optimalizace a kalibrace metody pro stanovení metabolitů warfarinu

8.2.1 Kalibrace jednotlivých metabolitů warfarinu

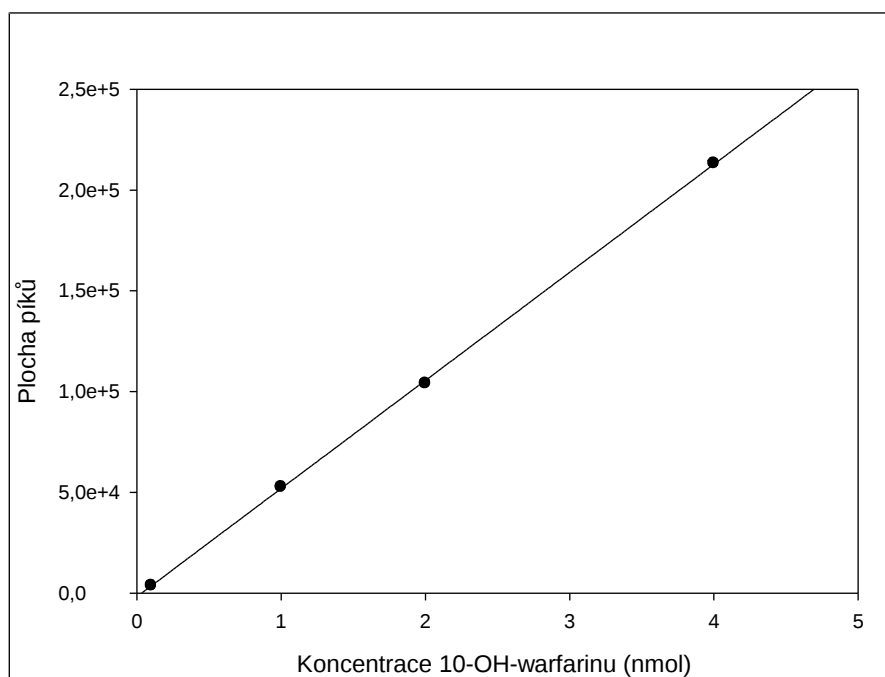
Podmínky analýzy pro kvantifikaci metabolitů warfarinu byly vybrány z preliminárních experimentů tak, jak je uvedeno v popisu použitých metod. Výsledky kalibračních závislostí pro UV detekci jednotlivých hydroxyderivátů jsou průměrem dvou měřených vzorků od každé koncentrace a jsou uvedeny v Tab. 5 a na Obr. 13-17. Ukázka záznamu chromatogramu je na Obr. 18.

Tabulka 5 Získané parametry kalibračních závislostí pro HPLC stanovení s UV detekcí vybraných metabolitů warfarinu.

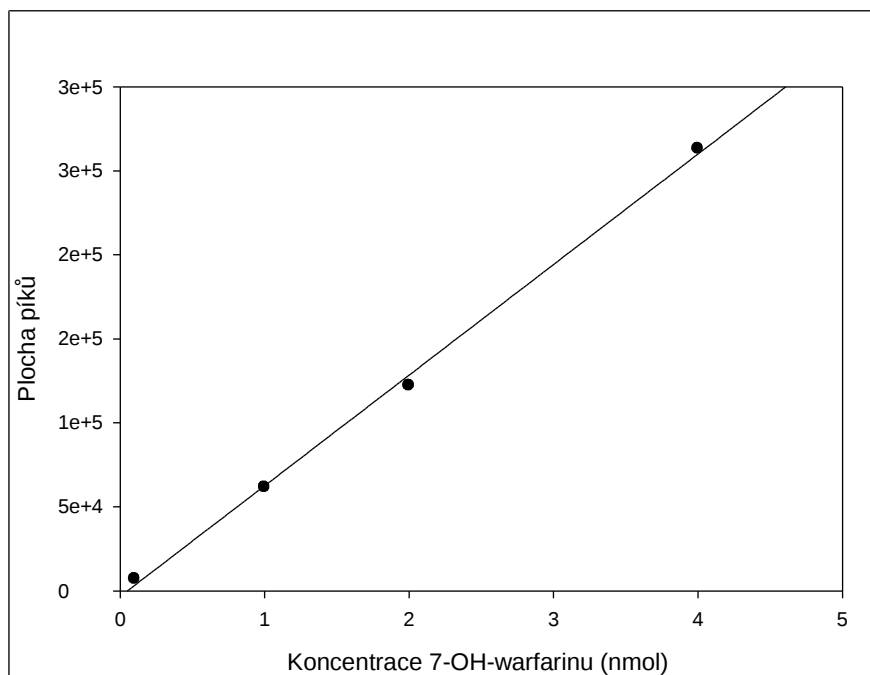
	R²	Rovnice regrese (y = ax + b)
4'-OH-warfarin	0,998	a = 48088, b = 0
10-OH-warfarin	0,999	a = 53031, b = 0
7-OH-warfarin	0,997	a = 64705, b = 0
8-OH-warfarin	0,996	a = 31048, b = 0
6-OH-warfarin	0,999	a = 17585, b = 0



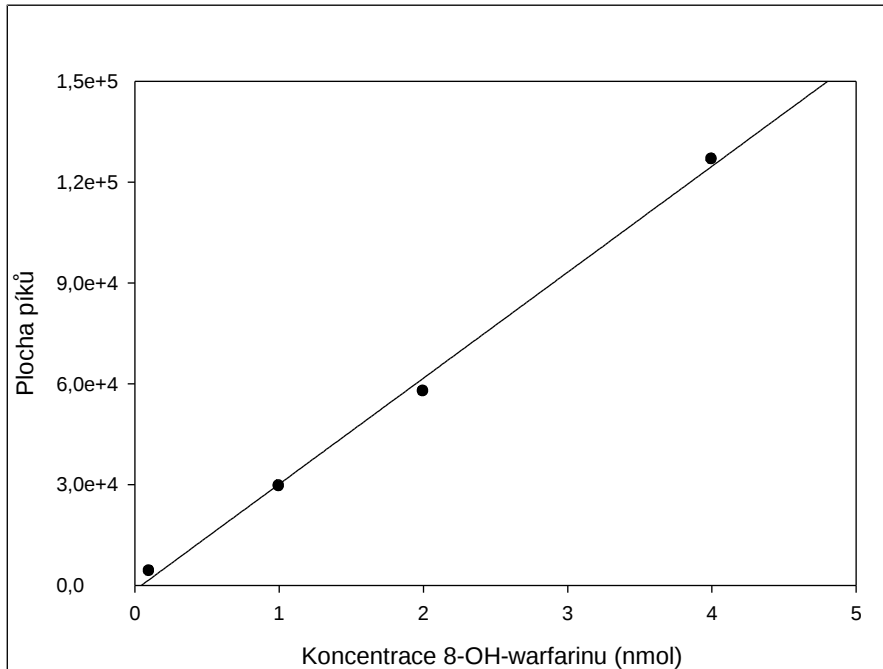
Obrázek 13 Kalibrační závislost pro HPLC stanovení 4'-OH-warfarinu. Na ose x je koncentrace metabolitu warfarinu (0,1, 1, 2 a 4 nmol v reakční směsi) a na ose y plocha píku metabolitu.



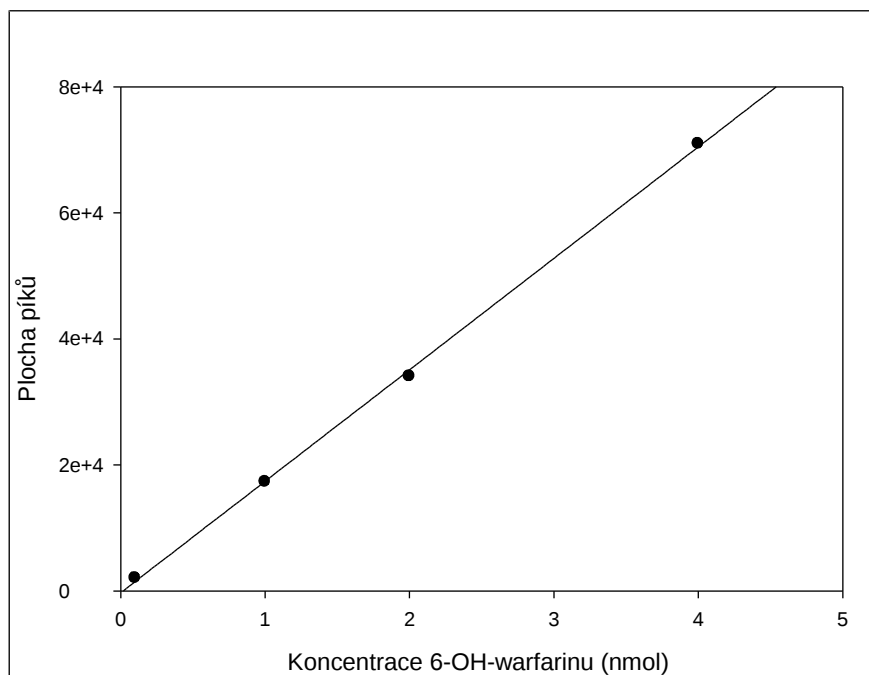
Obrázek 14 Kalibrační závislost pro HPLC stanovení 10-OH-warfarinu. Na ose x je koncentrace metabolitu warfarinu (0,1, 1, 2 a 4 nmol v reakční směsi) a na ose y plocha píku metabolitu.



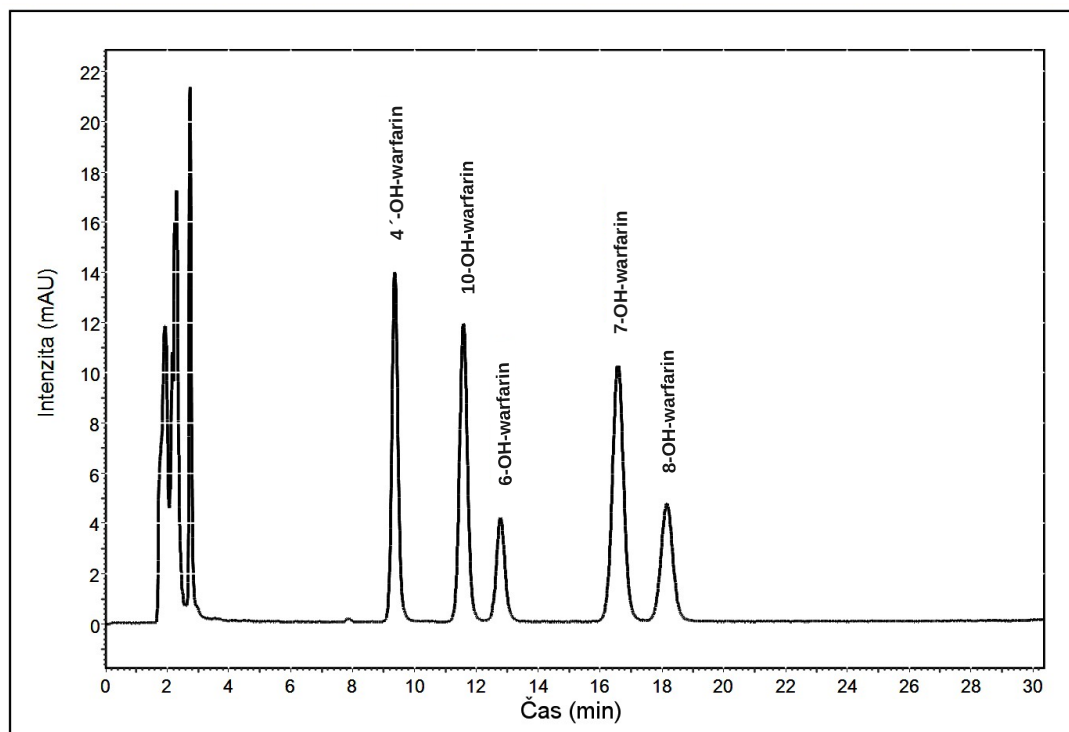
Obrázek 15 Kalibrační závislost pro HPLC stanovení 7-OH-warfarinu. Na ose x je koncentrace metabolitu warfarinu (0,1, 1, 2 a 4 nmol v reakční směsi) a na ose y plocha píku metabolitu.



Obrázek 16 Kalibrační závislost pro HPLC stanovení 8-OH-warfarinu. Na ose x je koncentrace metabolitu warfarinu (0,1, 1, 2 a 4 nmol v reakční směsi) a na ose y plocha píku metabolitu.



Obrázek 17 Kalibrační závislost pro HPLC stanovení 6-OH-warfarinu. Na ose x je koncentrace metabolitu warfarinu (0,1, 1, 2 a 4 nmol v reakční směsi) a na ose y plocha píku metabolitu.

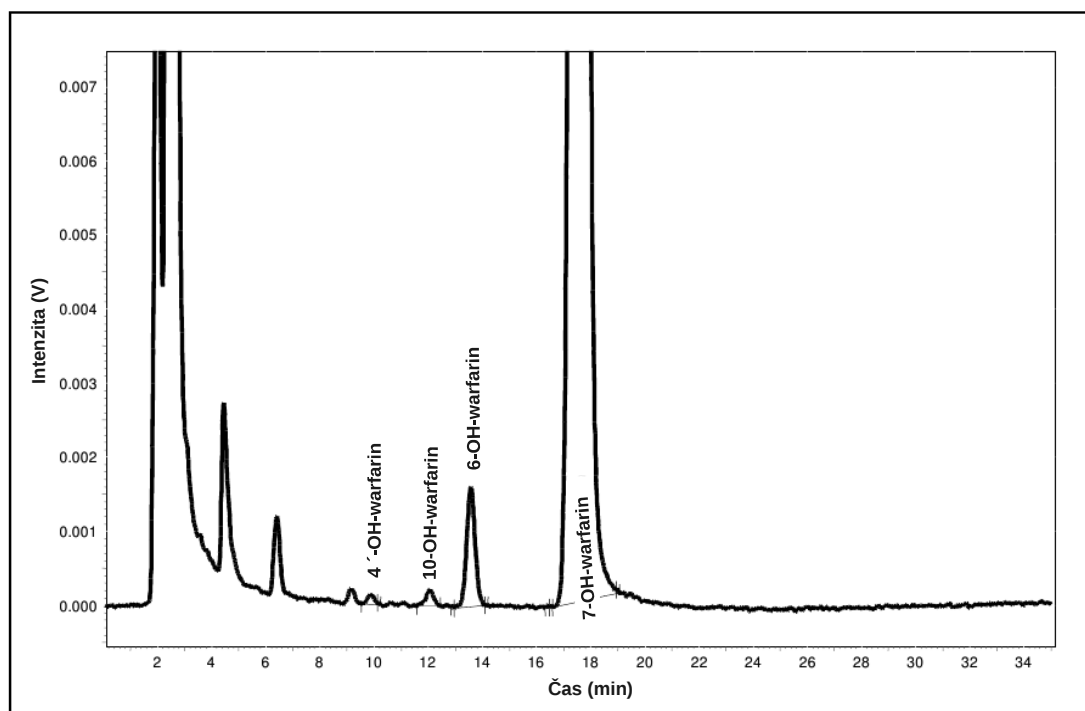


Obrázek 18 Ukázka záznamu chromatogramu ze stanovení kalibrační závislosti metabolitů warfarinu při 306 nm. Koncentrace všech metabolitů byla 2 nmol v reakční směsi.

Pro fluorimetrickou detekci jsou výsledky kalibračních závislostí průměrem dvou měřených vzorků od každé koncentrace a jsou uvedeny v Tab. 6. Hodnoty nebyly stanoveny pro metabolit 8-OH-warfarin, protože jeho množství bylo pod mezí detekce. Na Obr. 19 je ukázka chromatogramu.

Tabulka 6 Kalibrační závislost pro fluorescenční detekci vybraných metabolitů warfarinu.

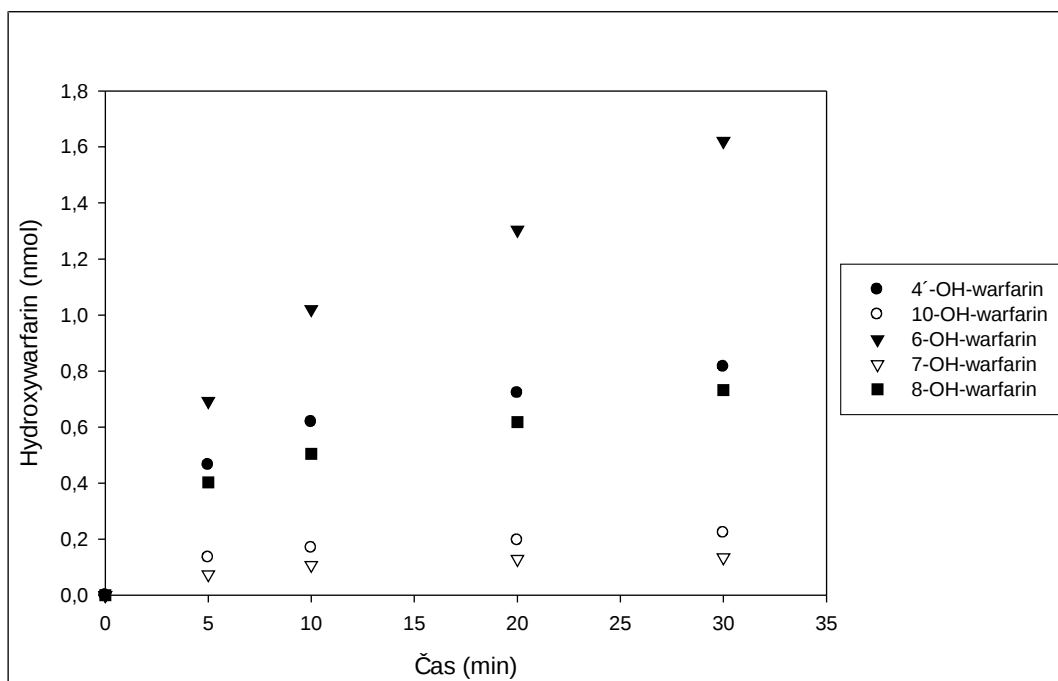
	R^2	Rovnice regrese ($y = ax + b$)
4'-OH-warfarin	0,999	$a = 5,197 \cdot 10^{-5}$, $b = 0$
10-OH-warfarin	0,998	$a = 3,624 \cdot 10^{-5}$, $b = 0$
7-OH-warfarin	0,999	$a = 3,307 \cdot 10^{-8}$, $b = 0$
6-OH-warfarin	0,999	$a = 2,782 \cdot 10^{-6}$, $b = 0$



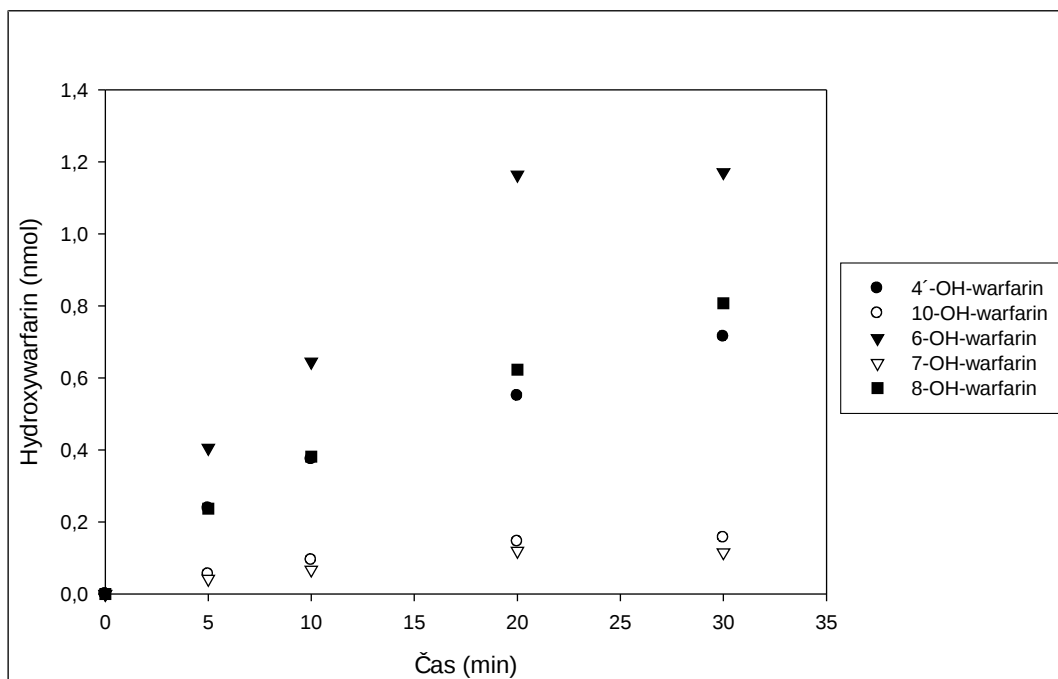
Obrázek 19 Ukázka záznamu chromatogramu ze stanovení kalibrační závislosti metabolitů warfarinu při fluorimetrické detekci. Koncentrace metabolitů byla 0,1 nmol v reakční směsi.

8.2.2 Optimalizace podmínek pro stanovení metabolických přeměn warfarinu v jaterní mikrosomální frakci potkana

4'-OH-warfarin vzniká působením CYP2C11 a CYP2B1, 6-OH-warfarin vzniká hydroxylací warfarinu za účasti CYP2C11 a CYP1A1, 7-OH-warfarin vzniká za účasti CYP2C6, 8-OH-warfarin vzniká působením CYP1A1 a 10-OH-warfarin působením CYP3A2. Všechny uvedené metabolity a současně aktivity všech vyjmenovaných enzymů byly měřeny při jedné inkubaci v jedné reakční směsi a analyzovány v jednom chromatogramu. Při optimalizaci podmínek stanovení jsme měřili aktivitu jednotlivých enzymů při různých experimentálních podmínkách. Závislost na době inkubace reakční směsi při různých koncentracích mikrosomálních proteinů je uvedena na Obr. 20 a 21.



Obrázek 20 Závislost tvorby metabolitů warfarinu na době inkubace (množství proteinů v reakční směsi bylo $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).



Obrázek 21 Závislost tvorby metabolitů warfarinu na době inkubace (množství proteinů v reakční směsi bylo $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Z těchto výsledků (Obr. 21 a 22) jsme se pro další experimenty rozhodli používat koncentraci proteinu $1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v reakční směsi a dobu inkubace 25 minut.

Pro jednotlivé hydroxyderiváty warfarinu jsme za těchto podmínek stanovili K_m a V_{lim} programem Sigma Plot. Hodnoty jsou uvedeny v Tab. 7. Jako optimální koncentrace warfarinu pro inhibiční studie byla zvolena koncentrace $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

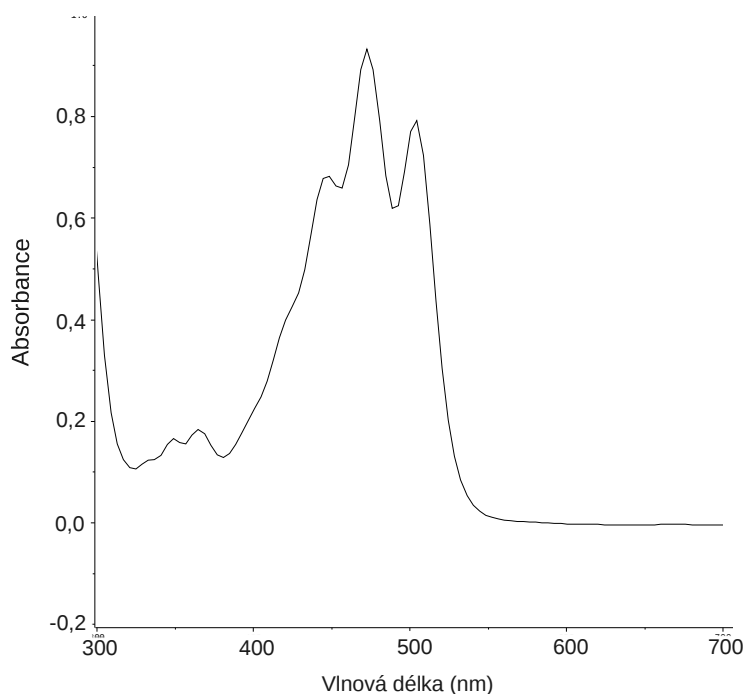
Tabulka 7 Stanovení K_m a V_{lim} pro jednotlivé enzymy (resp. hydroxyderiváty warfarinu).

	K_m (μM)	V_{lim} (nmol/min/mg prot.)
4'-OH-warfarin	$132,6 \pm 13,5$	$0,0856 \pm 0,0028$
10-OH-warfarin	$325,2 \pm 69,1$	$0,0305 \pm 0,0027$
6-OH-warfarin	$241,5 \pm 24,1$	$0,2318 \pm 0,0089$
8-OH-warfarin	$53,3 \pm 18$	$0,0710 \pm 0,0063$
7-OH-warfarin	$2491,6 \pm 655,4$	$0,1051 \pm 0,0211$

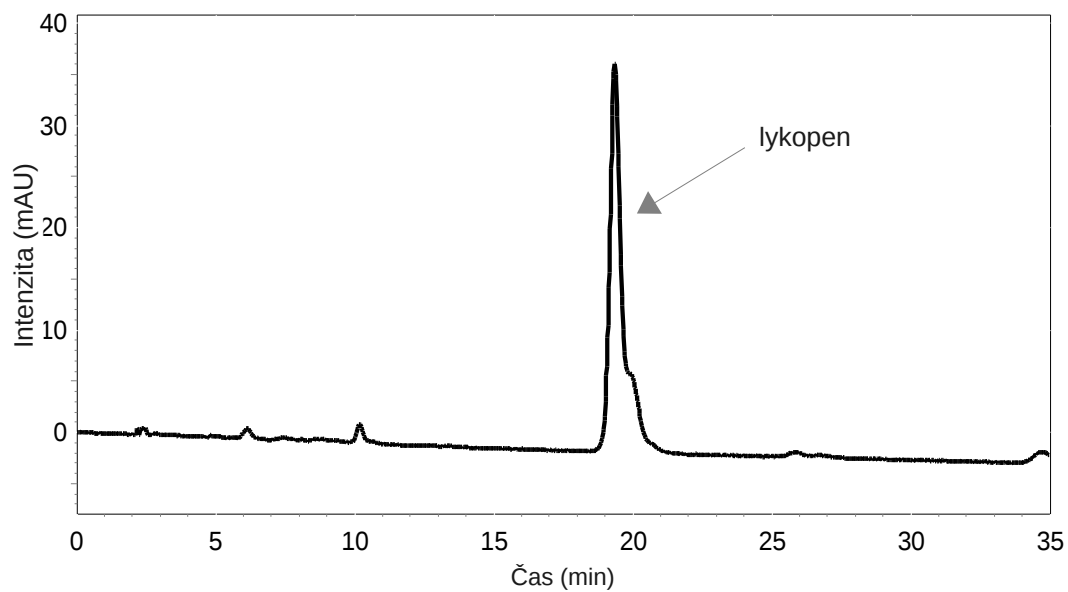
8.3 Izolace lykopenu a jeho charakterizace

Extrakcí do dichlormethanu jsme získali z 10 g rajčatového pyré 98,4 mg lykopenu.

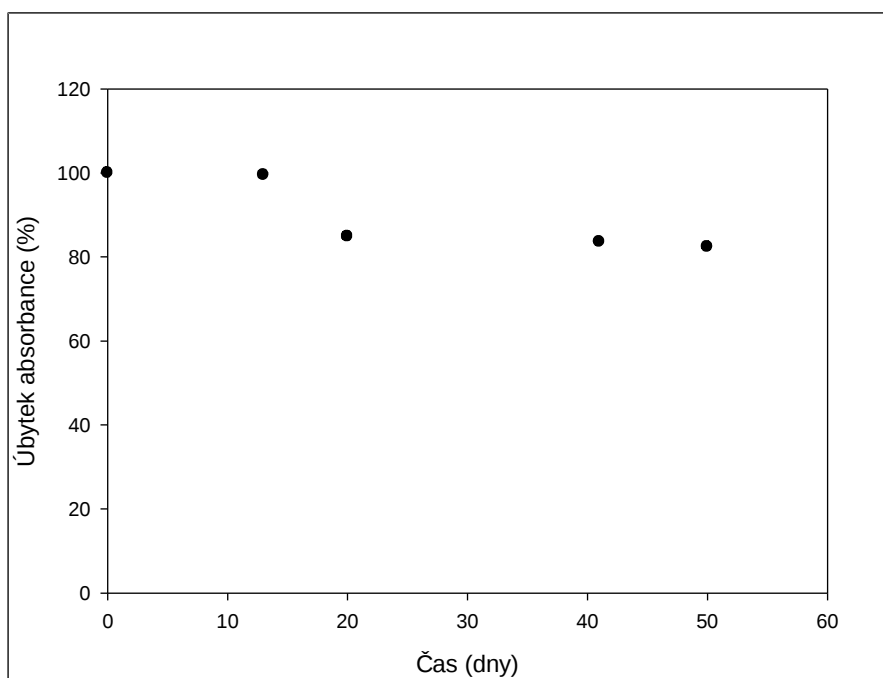
K charakterizaci izolovaného lykopenu jsme použili porovnání charakteristického spektra lykopenu se spektrem našeho vzorku (Obr. 22). S využitím molárního absorpčního koeficientu jsme stanovili koncentraci lykopenu v našem preparátu. Koncentrace izolovaného lykopenu byla $113,7 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Čistota vzorku byla ověřena také HPLC analýzou (Obr. 23). Ze záznamu vyplývá, že lykopen je majoritní složka připraveného preparátu. Stabilita lykopenu v roztoku o koncentraci $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ za laboratorní teploty a denního světla je znázorněna na Obr. 24, ze kterého vyplývá, že lykopen je v roztoku relativně stabilní. Úbytek absorbance odpovídající úbytku lykopenu ve vzorku byl zaznamenán až dvacátý den.



Obrázek 22 Ukázka spektra lykopenu. Absorpční maxima jsou při 448, 472 a 505 nm.



Obrázek 23 Chromatografický záznam analýzy vzorku izolovaného lykopenu při detekci 505 nm. Koncentrace lykopenu byla $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

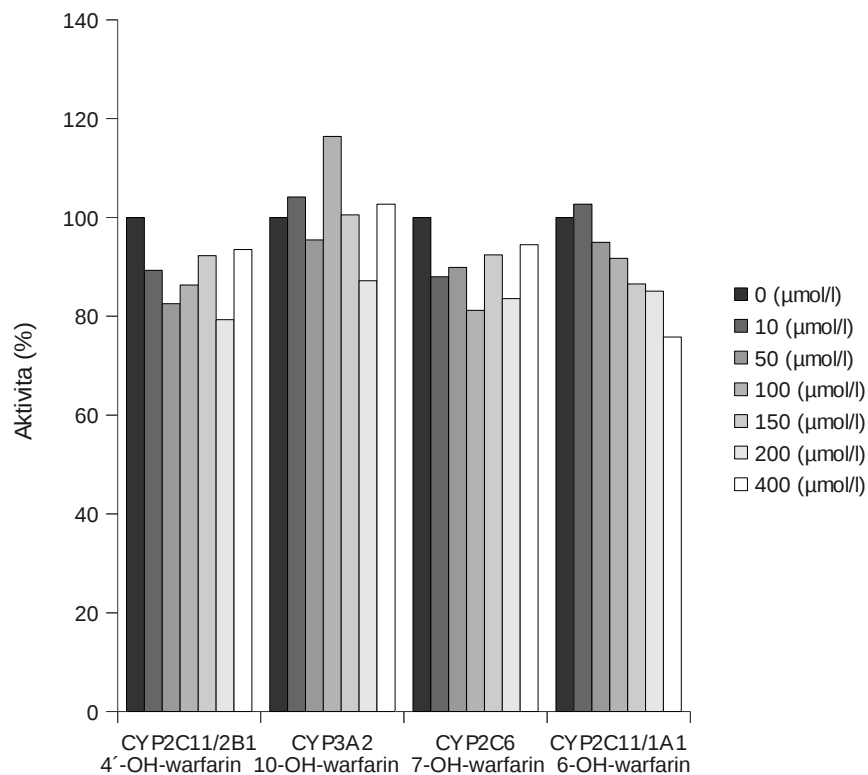


Obrázek 24 Stabilita lykopenu v roztoku - závislost relativního úbytku absorbance na času.

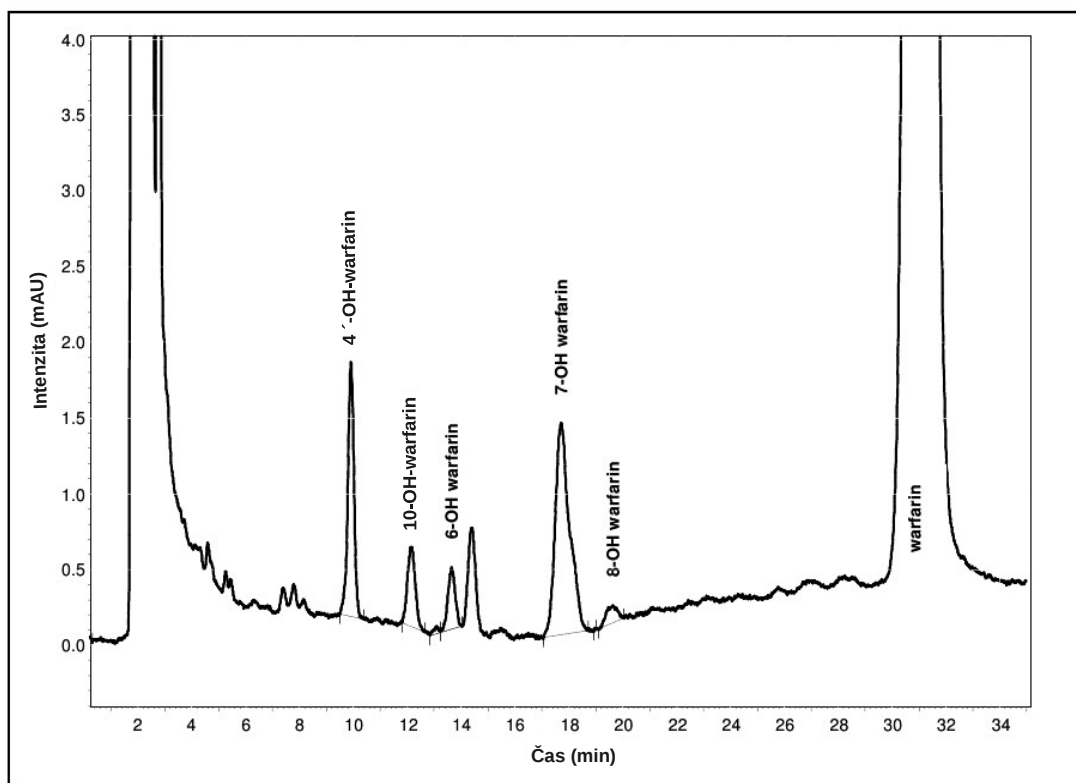
Druhá část experimentů byla zaměřena na testování vlivu vybraných přírodních látek na aktivitu enzymů účastnících se metabolismu warfarinu.

8.4 Vliv silybinu na metabolické přeměny warfarinu

Po optimalizaci metody vhodné ke sledování metabolických přeměn warfarinu za účasti cytochromů P450 jsme přikročili ke studiu inhibičních vlastností vybraných přírodních látek na aktivitu těchto enzymů. Jako první testovanou látku jsme si zvolili flavonolignan silybin. Byla testována jeho interakce s cytochromy P450 při metabolických přeměnách warfarinu. Množství vzniklých metabolitů warfarinu za přítomnosti silybinu v reakční směsi bylo porovnáno se situací, kdy reakce proběhla za stejných podmínek bez přítomnosti silybinu. Na Obr. 25 je uvedena závislost aktivity jednotlivých forem CYP (CYP2C11 a CYP2B1 tvoří 4'-OH-warfarin, CYP3A2 pak 10-OH-warfarin, CYP2C11 a CYP1A1 zase 6-OH-warfarin a CYP2C6 7-OH-warfarin) na přítomnosti zvyšující se koncentrace silybinu v reakční směsi. Z naměřených dat vyplývá, že lze pozorovat mírnou inhibici aktivity (o 24%) u CYP2C11 a CYP1A1, což odpovídá metabolitu 6-OH-warfarinu. Tvorba ostatních metabolitů není zřejmě v přítomnosti silybinu ovlivněna. Na Obr. 26 je ukázka chromatogramu při inhibici cytochromů P450 silybinem.



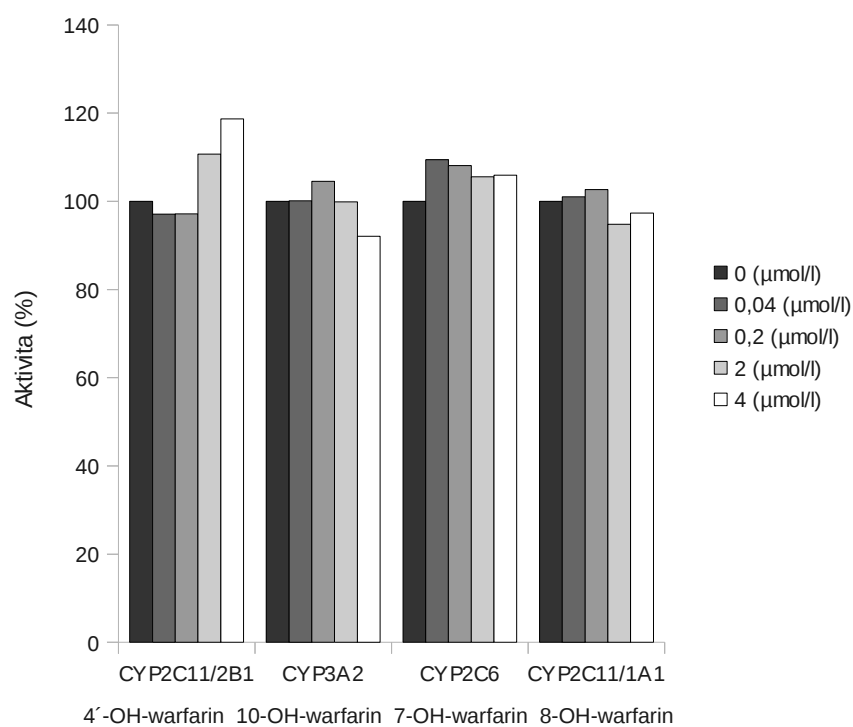
Obrázek 25 Stanovení inhibičního vlivu silybinu na tvorbu metabolitů warfarinu. V legendě vpravo je uvedena koncentrace silybinu ($\mu\text{mol.l}^{-1}$). Na ose y vynesena relativní aktivita forem cytochromů P450, případně dvou forem, podílejí-li se na vzniku metabolitu. Hodnota 100% odpovídá reakci bez přítomnosti silybinu.



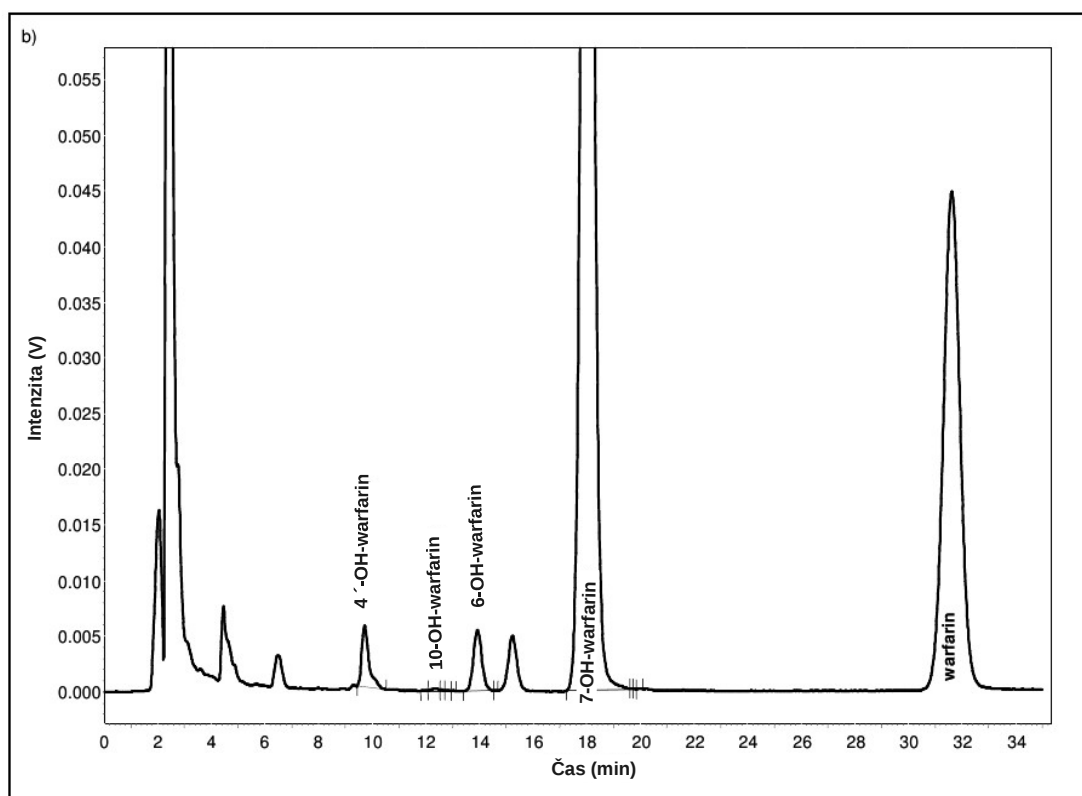
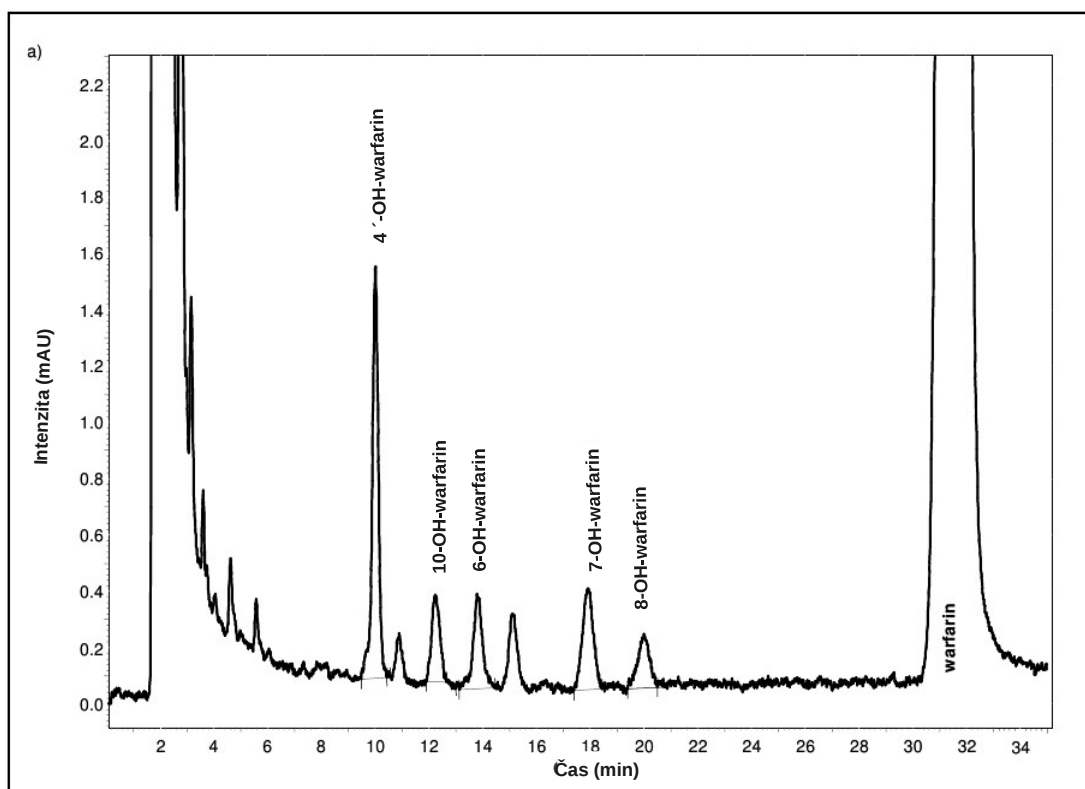
Obrázek 26 Ukázka záznamu chromatogramu při inhibici cytochromů P450 silybinem. Identifikace byla prováděna při 306 nm. Koncentrace silybinu byla $400 \mu\text{mol.l}^{-1}$ v reakční směsi.

8.5 Vliv lykopenu na metabolické přeměny warfarinu

Další studovanou přírodní látkou byl lykopen. Testování probíhalo obdobně jako u silybinu. Obr. 27 znázorňuje závislost aktivity jednotlivých forem cytochromů P450 na zvyšující se koncentraci lykopenu. Metabolity 6-OH-warfarin a 7-OH-warfarin byly detekovány fluorescenčně, 4'-OH-warfarin a 10-OH-warfarin UV detekcí. Ze získaných hodnot inhibičního vlivu lykopenu na tvorbu metabolitů warfarinu nebyla u žádného cytochromu P450 prokázána inhibice. Na Obr. 28 je ukázka chromatogramu při inhibici cytochromů P450 lykopenem a) UV detekcí, b) fluorescenční detekcí.



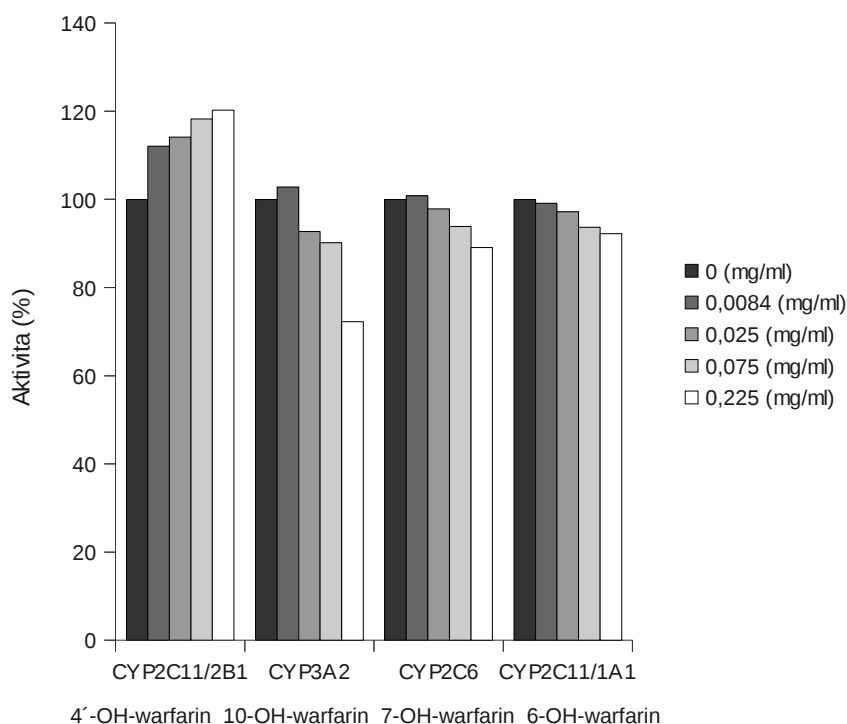
Obrázek 27 Stanovení inhibičního vlivu lykopenu na tvorbu metabolitů warfarinu. Vpravo jsou uvedeny jednotlivé koncentrace lykopenu ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) v reakční směsi. Na ose y je vynesena relativní aktivita forem cytochromů P450, případně dvou forem, podílejí-li se na vzniku metabolitu. Hodnota 100% odpovídá reakci bez přítomnosti lykopenu.



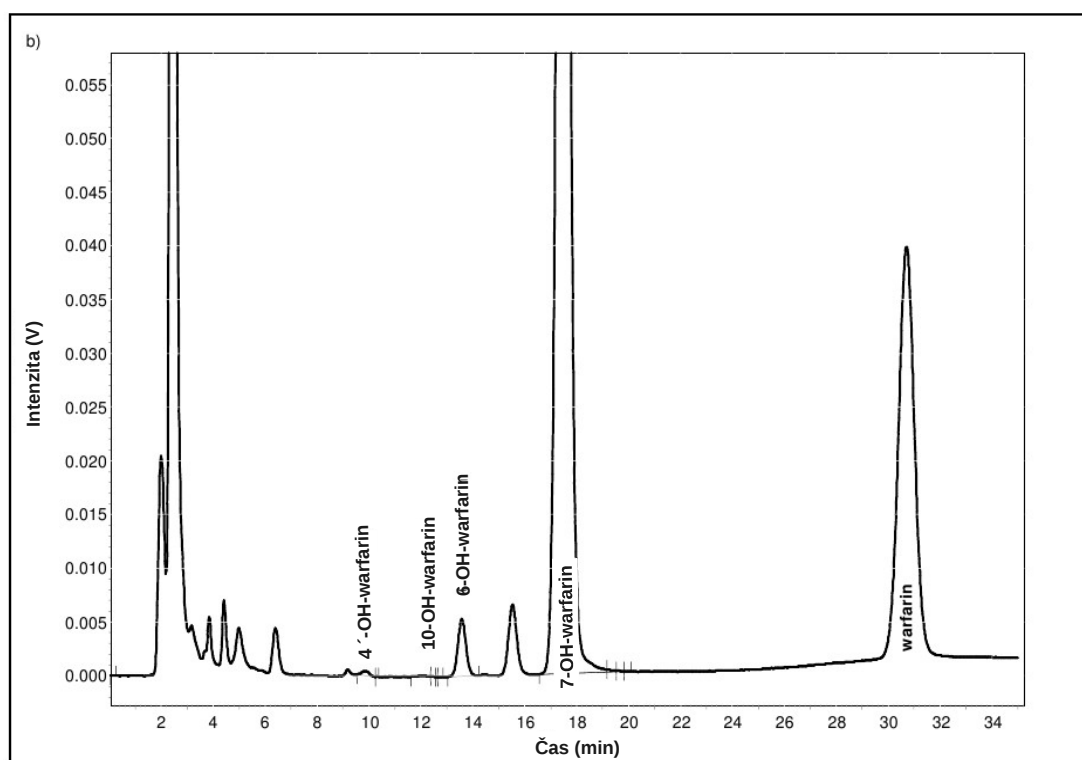
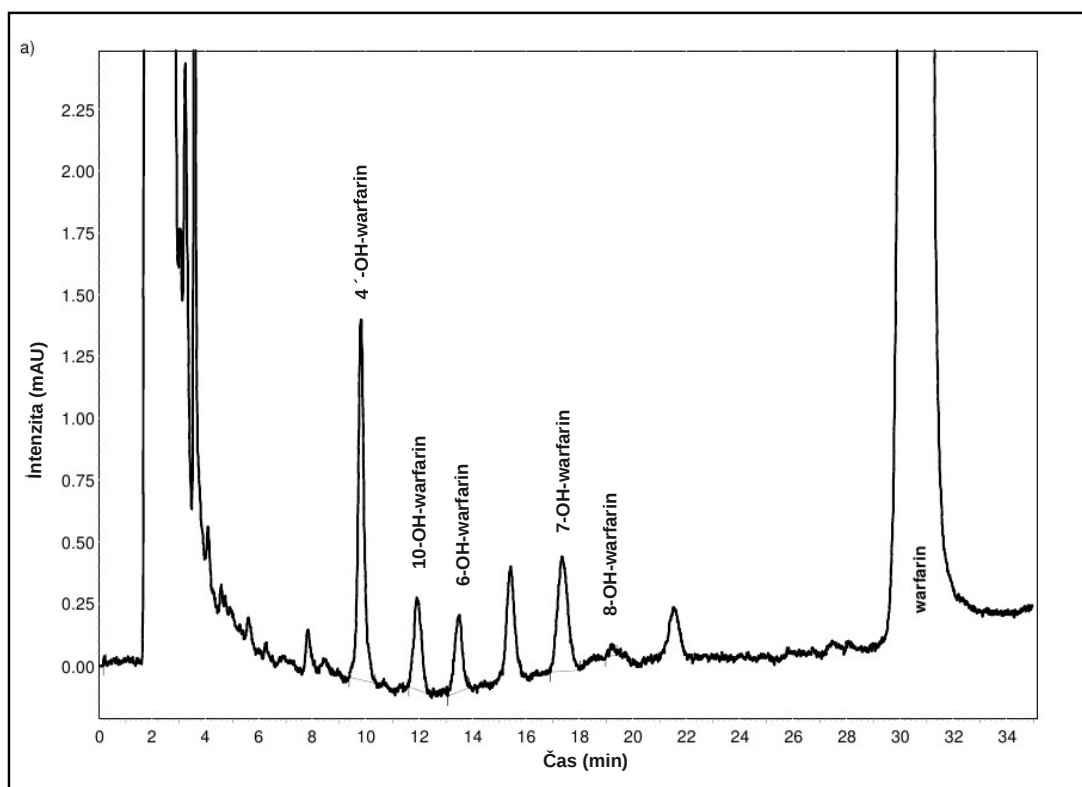
Obrázek 28 Ukázka chromatogramu při inhibici cytochromů P450 lykopenem: a) UV detekcí, b) fluorescenční detekcí. Koncentrace lykopenu byla $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ v reakční směsi.

8.6 Vliv anthokyanů na metabolické přeměny warfarinu

Třetí testovanou přírodní látkou (lépe řečeno směsí přírodních látek) byla směs anthokyanů z klikvy velkoplodé. Vliv vzrůstající koncentrace anthokyanů na jednotlivé formy cytochromů P450 jsou na Obr. 29. 4'-OH-warfarin a 10-OH-warfarin byly detekovány pomocí UV detekce, 6-OH-warfarin a 7-OH-warfarin fluorescenční detekcí. Z našich experimentů vyplývá, že dochází k mírnému zvýšení množství metabolitu (přibližně o 20%) za jehož vznik odpovídají CYP2C11 a CYP2B1 a mírné inhibici (27%) CYP3A2 (10-OH-warfarin). U dalších cytochromů P450 nebylo zaznamenáno žádné výrazné ovlivnění jejich aktivit anthokyanem. Na Obr. 30 je ukázka chromatogramu z inhibice cytochromů P450 anthokyanem a) UV detekcí, b) fluorescenční detekcí.



Obrázek 29 Stanovení inhibičního vlivu anthokyanů na tvorbu metabolitů warfarinu. Legenda uvádí koncentraci anthokyanů ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) v jednotlivých reakcích. Na ose y je vynesena aktivita forem cytochromů P450, případně dvou forem, podílejí-li se na vzniku metabolitu. Hodnota 100% odpovídá reakci bez přítomnosti anthokyanů.



Obrázek 30 Ukázka chromatogramu při inhibici cytochromů P450 anthokyanu a) UV detekcí, b) fluorescenční detekcí. Koncentrace anthokyanů byla $0,0084 \text{ mg.ml}^{-1}$ v reakční směsi.

Diskuse

Cílem předkládané diplomové práce bylo na základě metabolických přeměn warfarinu sledovat aktivitu několika forem cytochromů P450 a inhibiční vliv přírodních látek na metabolismus warfarinu. Z tohoto důvodu se první část diplomové práce zabývala optimalizací a kalibrací metody pro stanovení metabolitů warfarinu pomocí HPLC s UV a fluorescenční detekcí a optimalizací podmínek pro sledování metabolických přeměn warfarinu za účasti CYP. Byly zjištěny optimální koncentrace proteinu a warfarinu v reakční směsi, vhodná doba inkubace a optimální zpracování biologických vzorků před samotnou identifikací.

V druhé části diplomové práce byl zkoumán vliv vybraných přírodních látek na metabolické přeměny warfarinu. Jako první studovanou látkou byl flavonolignan silybin. Dřívější publikace ukazují významnou inhibici lidských CYP3A4 (pro kterou potkani nemají homologní formu) a CYP2C9 (odpovídající potkání formou je CYP2C11) silybinem. Sridar et al. (2004), prováděli experimenty s lidským rekombinantním purifikovaným CYP2C9, CYP3A4 a silybinem. Dospěli k závěru, že silybin inaktivuje CYP2C9, průměrně 35% ztráta aktivity CYP byla zaznamenána při 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ koncentraci silybinu. Jančová et al. (2007) studovali inhibiční vliv silybinu na lidských mikrosomech a nejvýznamnější inhibiční efekty také našli u CYP3A4 a CYP2C9. Vztah mezi silybinem a CYP2B6 (potkání homolog 2B1) označili za slabou interakci. O rok později publikovali Doehmer et al. (2008) inhibiční studii silymarinu a inhibiční vliv zaznamenali až při 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ koncentraci silymarinu – 50% u 1A2 a >80% u CYP2B6, 2C9, 3A4, 2D6, 2C8 a 2C19.

Potkání CYP2C11 metabolizuje warfarin na 4'-OH-warfarin a 6-OH-warfarin, u kterého jsme zaznamenali 25% inhibici, což potvrzuje dosavadní výsledky. Výrazný projev inhibice nastal až u 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ koncentrace silybinu v reakční směsi.

Druhou studovanou látkou byl lykopen. Inhibiční vlivy lykopenu na CYP zatím v literatuře nebyly důkladně popsány. Výjimkou jsou japonští autoři (Sunaga et al., 2012), kteří zkoumali, zda rajčatový džus může inhibovat lidský CYP3A4. Hodnotili inhibiční vliv lykopenu odpovídající koncentraci 7,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ v reakční směsi. Inhibiční aktivita lykopenu byla slabá s inhibicí pouhých 28%, ačkoli při dvojnásobné koncentraci lykopenu byla inhibice již více jak 80%. Zjistili, že ethylacetátový extrakt z rajčatového džusu inhibuje aktivitu CYP3A4 inhibicí závislou na mechanismu. Doposud není žádná klinická studie naznačující nepříznivé interakce

jídlo-léčivo způsobené příjmem rajčatového džusu. Tento nález je tedy proto důležitý a naznačuje, že rajčatový džus by mohl ovlivnit účinek léčiv, která jsou metabolizována CYP3A4, podobně jako grapefruitový džus.

V této diplomové práci byla koncentrace lykopenu zvolena podle známé koncentrace v plazmě, která je udávána v rozmezí 0,5-1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (Sies & Stahl, 1995). V porovnání se zmíněnými studiemi byla nejvyšší koncentrace lykopenu v naší studii 2,15 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, tedy více jak třikrát nižší. Zjištěné údaje o inhibici lykopem nelze porovnat s žádným údajem v literatuře, jelikož jediný publikovaný článek (viz výše) se zabývá lidským CYP3A4. Prvotní výsledky naznačují, že lykopen nevyvolává žádnou významnou inhibici aktivit potkaních CYP, i když je možné, že dochází k mírnému zvýšení aktivity CYP2C11 a CYP2B1. Tuto skutečnost je však nutné ověřit dalšími měřeními, případně použít lidské mikrosomy místo potkaních.

Směs anthokyanů byla třetí studovanou přírodní látkou. Její testování usnadnil fakt, že anthokyany jsou rozpustné ve vodě a tudíž nedocházelo k ovlivnění aktivit CYP vlivem rozpouštědla. Dreiseitel et al. (2008) se zabývali anthokyany a jejich metabolity v souvislosti s inhibicí CYP3A4. Inhibiční potenciál CYP3A4 byl naznačen u brusinkového džusu, nicméně přispívající roli anthokyanů k této inhibici ještě zbývá objasnit. Autoři článku testovali vliv anthokyanů, jejich aglykonů, proanthokyanidinů a fenolických metabolitů na aktivity CYP3A4. Testované látky inhibovaly aktivitu CYP3A4 v koncentrační závislosti enzymové inaktivace. Bylo prokázáno, že anthokyany samy nejsou metabolizovány cytochromy P450. Rychle rostoucí zájem o anthokyany ve stravě ale vyžaduje důkladnější pochopení jejich buněčných cílů a možných rizik vedoucích k ovlivnění metabolismu běžných léčiv. Sand et al. (2010) učinili ve své studii závěr, že přírodní látky běžného bobulovitého ovoce jsou slabými inhibitory CYP2C19 *in vitro*. O indukci cytochromů P450 flavonoidy se zmiňuje článek autorů Guo et al. (2006).

Koncentrace směsi látek z brusinek byla stanovena na základě klinické studie (Valentová et al., 2007). Nejvyšší koncentrace anthokyanů byla 0,225 mg.ml^{-1} . Sledování inhibice CYP anthokyany naznačila indukci CYP2C11 a CYP2B1 o 20%, což odpovídá uvedenému článku o indukci CYP flavonoidy (Guo et al., 2006). Také naznačila možnou inhibici formy CYP3A2. O tomto enzymu nebo jeho lidského orthologu (CYP3A4/5) se literatura v souvislosti s možnou inhibicí anthokyany nezmiňuje.

Provedené experimenty ukazují na možné ovlivnění metabolismu léčiv přírodními látkami a bylo by vhodné v tomto směru pokračovat, nejlépe v *in vitro* studiích s preparáty humánního původu.

Závěr

V rámci diplomové práce byla optimalizována a kalibrována HPLC metoda s UV i fluorescenční detekcí pro stanovení nejvýznamnějších metabolitů warfarinu, které vznikají za účasti cytochromů P450. Na základě studia metabolických přeměn warfarinu byly nalezeny podmínky pro současné sledování aktivit několika forem cytochromů P450. Zavedená metoda bude dále využívána ke sledování inhibičního vlivu dalších přírodních látek na metabolické přeměny warfarinu. Z experimentálního pohledu je významné, že na základě této metody bude možné v jednom analytickém kroku sledovat současně aktivitu několika forem CYP.

Dále byla provedena *in vitro* analýza vlivu přírodních látek na potkaní jaterní cytochromy P450. Vliv jednotlivých přírodních látek byl následující: silybin mírně inhiboval formu CYP2C11, lykopen neměl výraznější účinky, anthokyany inhibovaly CYP3A2. Jelikož potkaní CYP2C11 odpovídá lidskému CYP2C9, který metabolizuje kromě warfarinu i jiná běžně užívaná léčiva (ibuprofen, diklofenak), mělo by být jeho ovlivnění přírodními látkami jako je např. silybin důkladněji zmapováno. Obdobně i inhibice potkaního CYP3A2, který svou substrátovou specifitou odpovídá do značné míry lidskému CYP3A4, by z pohledu možných lékových interakcí mohlo způsobit pacientům zdravotní komplikace. Pro potvrzení těchto předpokladů by se všechny provedené experimenty s lykopenem a anthokyany měly ověřit na lidské mikrosomální frakci a hepatocytech, jelikož potkan není z pohledu biotransformace ideální modelový organismus.

Výsledky získané při vypracování této diplomové práce přispějí metodicky i konkrétními daty k poznání vlivu přírodních látek na aktivitu cytochromů P450.

Seznam literatury

- Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 737-747.
- Anzenbacherová E., Bec N., Anzenbacher P., Hudeček J., Souček P., Jung C., Munro A. W. Lange R. (2000) Flexibility and stability of the structure of cytochromes P450 3A4 and BM-3. *European Journal of Biochemistry* **267** (10), 2916-2920.
- Arab L., Steck-Scott S., Fleishauer A. T. (2002) Lycopene and the lung. *Exp. Biol. Med.* **227**, 894-899.
- Bernhardt R. (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of biotechnology* **124**, 128-145.
- Caris-Veyrat C., Schmid A., Carail M., Böhm V. (2003) Cleavage products of lycopene produced by in vitro oxidations: Characterization and mechanisms of formation. *J.Agric. Food Chem.*, **51**, 7318-7325.
- Clifford M. N. (2000) Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1063-1072.
- Comoglio A., Tomasi A., Malandrino S., Poli G., Albano E. (1995) Scavenging effect of silipide, a new silybin-phospholipid complex, on ethanol-derived free radicals. *Biochemical Pharmacology* **50** (8), 1313-1316.
- Davis A. R., Fish W. W., Perkins-Veazie P. (2003) A rapid spectrophotometric method for analyzing lycopene content in tomato and tomato products. *Postharvest Biology and Technology* **28**, 425-430.
- Doehmer J., Tewes B., Klein K.-U., Gritzko K., Muschick H., Mengs U. (2008) Assessment of drug-drug interaction for silymarin. *Toxicology in Vitro* **22**, 610-617.

- Dreiseitel A., Schreier P., Oehme A., Locher S., Hajak G., Sand P. G. (2008) Anthocyanins and their metabolites are weak inhibitors of cytochrome P450 3A4. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**, 1428-1433.
- Easterbrook J., LU Ch., Sakai Y., Li A. P. (2001) Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **29** (2), 141-144.
- Gažák R., Walterová D., Křen V. (2007) Silybin and silymarin – new and emerging applications in medicine. *Curr. Med. Chem.* **14** (3), 315-338.
- Giovannucci E. (2002) A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Exp. Biol. Med.* **227**, 852-859.
- Guengerich F. P. (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *The AAPS Journal* **8** (1), E101-E111.
- Guo J., Nikolic D., Chadwick L. R., Pauli G. F., van Breemen R. B. (2006) Identification of human hepatic cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of 8-phenylnaringenin and isoxanthohumol from hops. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 1152-1159.
- Habermeyer M., Fritz J., Barthelmes H. U., Christensen M. O., Larsen M. K., Boege F., Marko D. (2005) Anthocyanidins modulate the activity of human DNA topoisomerases I and II and effect cellular DNA integrity. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 1395-1404.
- Hendrychová T., Anzenbacherová E., Hudeček J., Skopalík J., Lange R., Hildebrandt P., Otyepka M., Anzenbacher P. (2011) Flexibility of human cytochrome P450 enzymes: Molecular dynamics and spectroscopy reveal important function-related variations. *Biochimica et Biophysica Acta* **1814**, 58-68.
- Ishizuka M., Okajima F., Tanikawa T., Min H., Tanaka K. D., Sakamoto K. Q., Fujita S. (2007) Elevated warfarin metabolism in warfarin-resistant roof rats (*Rattus rattus*) in Tokyo. *Drug Metab. Dispos.* **35**, 62-66.

- Janča J., Zentrich J. A. (1995) *Herbář léčivých rostlin 3.díl*, pp. 216-219, Eminent, Praha, Česká republika.
- Jančová P., Anzenbacherová E., Papoušková B., Lemr K., Lužná P., Veinlichová A., Anzenbacher P., Šimánek V. (2007) Silybin is metabolized by cytochrome P450 2C8 in vitro. *Drug Metab. Dispos.* **35** (11), 2035-2039.
- Jones D. R., Moran J. H., Miller G. P. (2009) Warfarin and UDP-glucuronosultransferases: writing a new chapter of metabolism. *Drug metabolism reviews* **42**, 53-59.
- Kong K.-W., Khoo H.-E., Prasad K. N., Ismail A., Tan Ch.-P., Rajab N. F. (2010) Revealing the power of the natural red pigment lycopene. *Molecules* **15**, 959-987.
- Kowalczyk E., Krzesiński P., Kura M., Szmigiel B., Błaszczak J. (2003) Anthocyanins in medicine. *Pol.J. Pharmacol.* **55**, 699-702.
- Lang D., Böcker R. (1995) Highly sensitive and specific high-performance liquid chromatographic analysis of 7-hydroxywarfarin, a marker for human cytochrome P-450C9 activity. *J. Chromatogr. B* **672**, 305-309.
- Locatelli I., Kmetec V., Mrhar A., Grabnar I. (2005) Determination of warfarin enantiomers and hydroxylated metabolites in human blood plasma by liquid chromatography with achiral and chiral separation. *J. Chromatogr. B* **818**, 191-198.
- Macholán L. (2003) *Sekundární metabolity*, pp. 84-86, ,Brno, Česká republika.
- Martínková J., Chládek J., Mičuda S., Chládková J. (2007) *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*, pp. 80-81, 262-263, Grada Publishing, Praha, Česká republika.
- McGhie T. K., Walton M. C. (2007) The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 702-713.
- Monti D., Gažák R., Marhol P., Biedermann D., Purchartová K., Fedrigo M., Riva S., Křen V. (2010) Enzymatic kinetic resolution of silybin diastereoisomers. *J. Nat. Prod.* **73**, 613-619.

- Morazzoni P., Bombardelli E. (1995) *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). *Fitoterapia* **66** (1), 3-42.
- Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. (2002) Harperova biochemie, pp. 743-748, H+H, Jinočany, Česká republika.
- Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z. (2003) Základní analytická chemie, pp. 165-167, Karolinum, Praha, Česká republika.
- Pradhan S. C., Girish C. (2006) Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian. J. Med. Res.* **124**, 491-504.
- Protein assay-technical handbook (1999), pp. 3.
- Radjabian T., Rezazadeh SH., Fallah Hussein H. (2008) Analysis of silymarin components in the seed extracts of some milk thistle ecotypes from Iran by HPLC. *Iranian Journal of Science & Technology, Trans. A* **32** (A2), 141-146.
- Rao A. V., Rao L. G. (2007) Carotenoids and human health. *Pharmacological Research* **55**, 207-216.
- Sand P. G., Dreiseitel A., Stang M., Schreier P., Oehme A., Locher S., Hajak G. (2010) Cytochrome P450 2C19 inhibitory activity of common berry constituents. *Phytother. Res.* **24**, 304-307.
- Sies H., Stahl W. (1995) Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 1315S-1321S.
- Souček P., Gut I. (1992) Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica* **22** (1), 83-103.
- Sridar CH., Goosen T. C., Kent U. M., Williams J. A., Hollenberg P. F. (2004) Silybin inactivates cytochromes P450 3A4 and 2C9 and inhibits major hepatic glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Dispos.* **32** (6), 587-594.

- Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy* **93**, 229-237.
- Sunaga K., Ohkawa K., Nakamura K., Ohkubo A., Harada S., Tsuda T. (2012) Mechanism-based inhibition of recombinant human cytochrome P450 3A4 by tomato juice extrakt. *Biol. Pharm. Bull.* **35** (3), 329-334.
- Šípál Z., (1981) Pokročilé cvičení z biochemie, pp. 71-77, Univerzita Karlova, Praha, Česká republika.
- Škottová N., Krečman V. (1997) Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug. *Physiol. Res.* **47**, 1-7.
- Valentová K., Stejskal D., Bednář P., Vostálová J., Číhalík C., Večeřová R. (2007) Biosafety, antioxidant status, and metabolites in urine after consumption of dried cranberry juice in healthy women: A pilot double-blind placebo-controlled trial. *J Agric. Food Chem.* **55**, 3217-3224.
- Vodrážka Z. (2007) Biochemie - Kniha třetí, pp. 130, 145-146), Academia, Český Těšín, Česká republika.
- White B. L., Howard L. R., Prior R. L. (2010) Proximate and polyphenolic characterization of cranberry pomace. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 4030-4036.
- Xu F., Yuan Q. P., Dong H. R. (2006) Determination of lycopene and β -carotene by high-performance liquid chromatography using sudan I as internal standard. *J. Chromatogr. B* **838**, 44-49.
- Zuber R., Anzenbacherová E., Anzenbacher P. (2002) Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J. Cell. Mol. Med.* **6** (2), 189-198.

Seznam zkratek

BCA	kyselina bincinoninová
BHT	butylovaný hydroxytoluen
CYP	cytochrom P450
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová dihydrát
ER	endoplazmatické retikulum
FMO	flavinmonooxygenasa
GIT	gastrointestinální trakt
GST	glutathion-S-transferasa
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IDH	isocitráthedrogenasa
ISO	DL-isocitronová kyselina
K_m	Michaelisova konstanta
MAO	monoaminoxidasa
MS	mikrosomální frakce
NADH	redukováná forma β -nikotinamidadenindinukleotidu
NADP ⁺	β -nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	redukováná forma β -nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
NAT	<i>N</i> -acetyltransferasa
PCB	polychlorované bifenyly
PMSF	phenylmethylsulfonylfluorid
ROS	reaktivní formy kyslíku
SULF	sulfotransferasa
THF	tetrahydrofuran
TRIS	Trizma base
UDP	uridindinukleotidfosfát
UDPGT	uridindifosfoglukuronyltransferasa
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa
UV	ultrafialové záření
V_{lim}	limitní rychlost enzymové reakce při nadbytku substrátu
VIS	oblast viditelného záření