

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**



VLIV PŘÍRODNÍCH ANTHOKYANŮ NA BIOTRANSFORMAČNÍ  
A ANTIOXIDAČNÍ ENZYMY

DISERTAČNÍ PRÁCE

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**



Jiří Prokop

**VLIV PŘÍRODNÍCH ANTHOKYANŮ NA BIOTRANSFORMAČNÍ  
A ANTIOXIDAČNÍ ENZYMY**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

Školitelka: Doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.

Obor: Lékařská chemie a klinická biochemie

Disertační práce byla vypracována během prezenční formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2015 – březen 2021.

## **Bibliografické informace**

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Jiří Prokop
Název disertační práce:	Vliv přírodních anthokyanů na biotransformační a antioxidační enzymy
Název disertační práce anglicky:	The Effect of Natural Anthocyanins on Biotransformational and Antioxidat Enzymes
Studijní program:	Lékařská chemie a klinická biochemie
Školitel:	Doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.
Rok obhajoby:	2021
Klíčová slova v češtině:	anthokyany, biotransformace xenobiotik, faktory oxidačního stresu, cytochromy P450 , králík, potkan, slepice
Klíčová slova v angličtině:	anthocyanins, biotransformation of xenobiotics, factors of oxidative stress, cytochromes P450, rabbit, rat, hen

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury, kterou cituji. Spoluautoři souhlasí s použitím uvedených výsledků.

V Olomouci dne

.....  
Jiří Prokop

Děkuji všem pracovníkům Ústavu lékařské chemie a biochemie za rady, připomínky a vytvoření konstruktivního pracovního prostředí. Největší díky chci vyjádřit své školitelce doc. RNDr. Evě Anzenbacherové, CSc. za pomoc a rady poskytnuté mi v průběhu mého postgraduálního studia a při sepisování disertační práce. Prof. RNDr. Pavlu Anzenbacherovi, DrSc. za rady a připomínky k sepisování článků, tvorbě posterů a sepisování disertační práce. Mgr. Lence Jourové, Ph.D. za uvedení do problematiky celé řady experimentálních metod a připomínky k disertační práci. Mgr. Veronice Tománkové, Ph.D. za *in vitro* experimenty, na kterých část této práce staví. Mgr. Pavlu Kosinovi, Ph.D. za uvedení do problematiky celé řady experimentálních metod.

Ing. Petru Martinkovi, CSc. (Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o.) za poskytnutí vyšlechtěných pšenic pro naše experimenty.

Doc. Mgr. *et.* Ing. Evě Mrkvicové, Ph.D. a Bc. *et.* Ing. Ondřeji Šťastníkovvi, Ph.D. za přípravu a organizaci krmných experimentů s různými odrůdami pšenic.

Prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc., přednostce Ústavu lékařské chemie a biochemie, LF UP, za podporu a poskytnutí výborného pracovního zázemí po celou dobu mého působení na tomto pracovišti.

Tato práce byla podpořena vnitřními granty IGA UPOL (IGA\_LF\_2016\_12; IGA\_LF\_2017\_011; IGA\_LF\_2018\_012; IGA\_LF\_2019\_015; IGA\_LF\_2020\_022) Grantovou agenturou České republiky (projekt 303/12/G163), projektem Ministerstva zemědělství České republiky (NAZV No QJ1510206) a projektem Toxikologie-infrastruktura (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_017/0002310).

Děkuji rovněž rodině za pochopení, trpělivost a podporu při studiu.

## Souhrn

Předkládaná disertační práce se zabývá vlivem anthokyanů, látek řazených mezi polyfenoly, na vybrané jaterní mikrosomální enzymy metabolismu léčiv a faktory oxidačního stresu u potkana, slepice a králíka. Anthokyany jsou přírodní antioxidanty, které mohou mimo jiné ochraňovat organismus před buněčným stárnutím a vznikem zánětů.

V první části byly anthokyany podávány potkanům *Wistar albino* ve formě pelet připravených z pšenice bohatých na anthokyany (ARW) odrůdy Skorpion nebo UC66049 po dobu 72 dní. Předmětem této studie bylo posoudit možný vliv nejen anthokyanů, ale i dalších polyfenolů (popř. fenolových kyselin) spolu s látkami v pšenici běžně obsaženými na jaterní cytochromy P450 (CYP) a faktory oxidačního stresu. Konzumace pelet obsahujících ARW způsobila 20% zvýšení celkové antioxidační kapacity (FRAP) plazmy a rovněž nárůst relativního množství –SH skupin, mezi něž řadíme nízkomolekulární a cysteinové thioly; 40% nárůst exprese mRNA a aktivity CYP1A2 spolu s 50% poklesem aktivity a exprese mRNA CYP2B2 u experimentálních zvířat.

V druhé části byly anthokyany podávány potkanům *Wistar albino* ve formě nápoje připraveného rozpuštěním borůvkového extraktu (*Vaccinium myrtillus* L.) o dvou koncentracích ( $0,15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) v pitné vodě po dobu 29 a 58 dní. Naměřené hodnoty byly srovnány s kontrolou, která byla napájena pouze pitnou vodou. Hodnota FRAP měřená v plazmě byla o 20 % nižší u skupiny napájené nižší koncentrací borůvkového nápoje. Expres mRNA a aktivita CYP2E1 byly mírně zvýšené u obou skupin napájených borůvkovým nápojem po dobu 29 dní, ale po 58 dnech byly naopak některé aktivity mírně sníženy (CYP1A2, CYP2C11 a CYP2E1) u skupiny napájené vyšší koncentrací borůvkového nápoje.

Ve třetí části byly pelety připravené z jiné odrůdy ARW (Karkulka) podávány samicím králíka *Oryctolagus cuniculus* po dobu 61 dní. Naměřené výsledky, vyjma aktivity glutathion-S-transferasy (pokles o 20 %) se významně nelišily od kontroly.

V závěrečné části byly pelety připravené z ARW (Arasajta RU 687-12) podávány nosnicím (*Gallus gallus* f. *domestica*) před ukončením jejich snůšky po dobu 63 dní. Hlavním záměrem studie bylo sledovat vliv anthokyanů na starší organismus a s tím spojené možné pozitivní efekty. Slepice krmené peletami obsahující ARW vykazovaly zvýšené hodnoty antioxidační kapacity (tj. FRAP) v plazmě; aktivity enzymů podrodin CYP2D a CYP3A měly zvýšené o více než 40 %.

Ve všech výše provedených experimentech byly sledované změny parametrů oxidačního stresu a aktivit CYP většinou mírné a konzumace anthokyanů nezpůsobila

žádné změny zdravotního stavu experimentálních zvířat, který byl po celou dobu experimentů pečlivě sledován a byl vždy hodnocen jako dobrý.

**Klíčová slova:** anthokyany, biotransformace xenobiotik, cytochromy P450, faktory oxidačního stresu, králík, potkan, slepice

## Summary

The aim of this work is to study effects of anthocyanins, substances classified among polyphenols, on selected liver microsomal enzymes known to metabolize foreign substances (xenobiotics) and on factors of oxidative stress of rat, chicken and rabbit. Anthocyanins are natural antioxidants with many positive effects e.g. protecting organism against aging of cells and inflammation.

In the first experiment, anthocyanins were administered to *Wistar albino* rats as pellets composed of anthocyanin rich wheats (ARW) of varieties Skorpion or UC66049 variety for 72 days. The objective of this study was to evaluate possible effects of anthocyanins and some polyphenols (such as phenolic acids) together with other substances common to wheats on liver cytochromes P450 (CYP) and factors of oxidative stress. The consumption of pellets containing ARW caused increase in ferric reducing antioxidant power (FRAP) and relative values describing amounts of thiol groups of plasma by 20 %. The mRNA expression and activity of CYP1A2 were increased by 40 %. Experimental animals exhibited lowered activity and mRNA expression of CYP2B2 by 50 %.

In the second experiment anthocyanins were given to *Wistar albino* rats in a drink prepared by dissolution of bilberry extract (BE; *Vaccinium myrtillus* L.) in the tap water. Prepared drinks containing  $0,15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  or  $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  of anthocyanins or tap water (control) were administered to experimental animals for 29 or 58 days. FRAP measured in plasma was lowered by 20 % in experimental group drinking lower concentration of bilberry beverage. mRNA expression and activity was slightly increased in rats from the 29 day experiment. On the other hand rats drinking  $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  of bilberry beverage for 58 days had lowered activities of CYP1A2, CYP2C11 and CYP2E1.

In the next experiment were pellets composed of ARW (variety Karkulka) administered to female rabbits *Oryctolagus cuniculus* for 61 days. Results obtained with rabbits consuming ARW were similar to control. The only exception was glutathion *S*-transferase activity, which was lowered by 20 %.

In the final experiment, the laying hens (*Gallus gallus f. domestica*) were, at the end of their laying period, fed by pellets containing ARW (Arasajta RU 687-12) for 63 days. The aim of this study was observation of effects of anthocyanins on older organism together with their possible beneficial impact. Hens fed by ARW pellets exhibited increased values of FRAP in plasma and increased activity of CYP2D together with CYP3A by more than 40 %.



Parameters of oxidative stress and CYP activities of all above mentioned experiments only mildly deviated from control and consumption of anthocyanins did not caused any changes in health status of experimental animals, which was followed for the whole experiment and was always good.

**Keywords:** anthocyanins, biotransformation of xenobiotics, cytochrome P450, factors of oxidative stress, rabbit, rat, hen

## Obsah

1) Úvod .....	1
2) Teoretická část.....	2
a) Studované látky přírodního původu – anthokyany .....	2
b) Antioxidační parametry .....	4
c) Metabolismus cizorodých látek .....	6
I. Cytochromy P450 .....	7
II. Mezidruhové rozdíly CYP mezi člověkem, potkanem, králíkem a kurem .....	15
3) Cíle práce.....	23
a) Podávání barevných pšenic UC66049 a Skorpion samcům potkana.....	23
b) Podávání borůvkového nápoje ( <i>Vaccinium myrtillus</i> L.) samcům potkana .....	23
c) Podávání barevné pšenice Karkulka samicím králíka .....	23
d) Podávání barevné pšenice Arasajta RU 687-12 slepicím.....	23
4) Experimentální část .....	24
a) Použité chemikálie.....	24
b) Přístroje.....	24
c) Použitá zvířata .....	25
d) Krmiva a složky stravy .....	25
e) Ostatní materiál.....	26
f) Metody .....	26
I. Průběh in vivo experimentu.....	26
II. Příprava mikrosomální subcelulární frakce .....	28
III. Příprava plazmy a erytrocytů z odebrané krve .....	29
IV. Stanovení faktorů oxidačního stresu.....	29
V. Stanovení aktivit CYP.....	32
VI. Stanovení proteinové exprese CYP .....	45
VII. Stanovení genové exprese CYP .....	45
VIII. Statistická analýza.....	45
5) Výsledky.....	46
a) Podání barevných pšenic UC66049 a Skorpion samcům potkana .....	46
I. Celková antioxidační kapacita potkaní plazmy .....	46
II. Parametry oxidačního stresu potkaní plazmy .....	47
III. Parametry oxidačního stresu potkaních erytrocytů.....	47
IV. Aktivity potkaních jaterních CYP .....	48
V. Exprese mRNA potkaních jaterních CYP.....	49
b) Podání borůvkového nápoje ( <i>Vaccinium myrtillus</i> L.) samcům potkana.....	50
I. Celková antioxidační kapacita potkaní plazmy .....	50

II. Parametry oxidačního stresu potkaní plazmy .....	50
III. Parametry oxidačního stresu potkaních erytrocytů.....	51
IV. Aktivity potkaních jaterních CYP .....	52
V. Expese mRNA potkaních jaterních CYP.....	54
c) Podání barevné pšenice Karkulka samicím králíka .....	56
I. Celková antioxidační kapacita plazmy samic králíka .....	56
II. Parametry oxidačního stresu erytrocytů králíčích samic .....	56
III. Aktivity králíčích jaterních CYP .....	57
d) Podání barevné pšenice Arasajta RU 687-12 slepicím.....	58
I. Celková antioxidační kapacita slepičí plazmy .....	58
II. Aktivity slepičích jaterních CYP .....	58
III. Expese mRNA slepičích jaterních CYP .....	59
IV. Proteinová expese vybraných forem slepičích jaterních CYP .....	60
6) Diskuze .....	61
a) Podávání barevných pšenic UC66049 a Skorpion samcům potkana.....	61
I. Ovlivnění faktorů oxidačního stresu u potkanů.....	61
II. Ovlivnění aktivit a expese mRNA potkaních CYP .....	62
b) Podávání borůvkového nápoje ( <i>Vaccinium myrtillus</i> L.) samcům potkana .....	63
I. Ovlivnění faktorů oxidačního stresu u potkanů.....	63
II. Ovlivnění aktivit a expese mRNA potkaních CYP .....	63
c) Podávání barevné pšenice Karkulka samicím králíka .....	64
I. Ovlivnění faktorů oxidačního stresu u králíčích samic .....	64
II. Ovlivnění aktivit králíčích jaterních CYP .....	64
d) Podávání barevné pšenice Arasajta RU 687-12 slepicím.....	65
I. Ovlivnění faktorů oxidačního stresu u nosnic .....	65
II. Ovlivnění aktivit, mRNA a proteinové expese CYP u nosnic.....	65
7) Závěry.....	66
a) Podávání barevných pšenic UC66049 a Skorpion samcům potkana.....	66
b) Podávání borůvkového nápoje ( <i>Vaccinium myrtillus</i> L.) samcům potkana .....	66
c) Podávání barevné pšenice Karkulka samicím králíka .....	67
d) Podávání barevné pšenice Arasajta RU 687-12 slepicím.....	67
8) Seznam prací vztahujících se k disertaci .....	68
9) Ostatní práce .....	69
10) Reference .....	71

## Seznam zkratek

1ABT	deriváty 1-aminobenzotriazolu
2IMA	2-isopropenyl-2-methyladamantan
3IMDA	3-isopropenyl-3-methyldiadamantan
3MC	3-methylcholantren
3OHDZ	3-hydroxydiazepam
4'OHDF	4'-hydroxydiklofenak
4NF	4-nitrofenol
5OHDF	5-hydroxydiklofenak
6 $\beta$ OHTST	6 $\beta$ -hydroxytestosteron
7 $\alpha$ OHTST	7 $\alpha$ -hydroxytestosteron
7OHKUM	7-hydroxykumarin
7OHWARF	7-hydroxywarfarin
ADH	alkoholdehydrogenasa
AhR	Arylhydrovodičkový receptor
$\alpha$ NF	$\alpha$ -naftoflavon
angl.	anglický
APAP	paracetamol (z angl. acetaminophen)
ARW	pšenice bohaté na anthokyany (z angl. anthocyanin rich wheats)
BaP	benzo[a]pyren
$\beta$ NF	$\beta$ -naftoflavon
BROD	7-Benzoyloxy- <i>O</i> -resorufin
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
BUF	bufuralol
BUPR	bupropion
CAT	katalasa (z angl. catalase)
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzen
CIS	cisplatina
CLX	chlorzoxazon
CPD	cyklofosfamid (z angl. cyclophosphamide)
CYB5R	NADH:cytochrom b <sub>5</sub> oxidoreduktasa
CYP	cytochromy P450
CYPOR	NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa
DDC	diethyldithiokarbamát

ddH <sub>2</sub> O	destilovaná, deionizovaná voda
DEX	dexametason
DF	diklofenak
DIAZ	diazepam
DMD	<i>N</i> -desmethyldiazepam
dNTP	deoxynukleotid trifosfátová směs
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoová kyselina)
E2	17 $\beta$ -estradiol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EFC	7-ethoxy-4-(trifluormethyl)kumarin
ETRR	7-Ethoxy- <i>O</i> -resorufin
exp. konst.	experimentální konstanta
F 1/1	fyzilogický roztok
F5	pentafluorofenyl
FRAP	celková antioxidační kapacita (z angl. ferric reducing antioxidant power)
FUR	furafyllin
GSR	glutathion reduktasa
GSD	gestoden
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
GST	glutathion- <i>S</i> -transferasa
HFC	7-hydroxy-4-(trifluormethyl)kumarin
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
HPRT1	hypoxanthin fosforibosyltransferasa 1
IDH	isocitrátdehydrogenasa
ISO	trisodná sůl kyseliny isocitronové
K3G	kyanidin-3- <i>O</i> -glukosid
KET	ketokonazol
KUM	kumarin
MAO	monoaminoxidasa
MDZ	midazolam
MEP	<i>S</i> -mefenytoin (z angl. <i>S</i> -mephenytoin)
MET	metyrapon

MIAN	mianserin
MROD	7-Methoxy- <i>O</i> -resorufin
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NADPH + H <sup>+</sup>	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NAPQI	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -amino-benzochinon imin
NBT	2,2'-bis(4-nitrofenyl)-5,5'-difenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-difenylen)ditetrazolium chlorid (z angl. nitro blue tetrazolium)
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
OM	omeprazol
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PB	fenobarbital (z angl. phenobarbital)
PCB	polychlorované bifenyly
PCN	pregnenolon 16 $\alpha$ -karbonitril
PHEN	fenacetin (z angl. phenacetin)
PILO	pilokarpin
PMS	fenzain methosulfát (z angl. phenazine methosulfate)
PROD	7-Pentoxy- <i>O</i> -resorufin
PYR	pyrazol
QND	chinidin (z angl. quinidine)
QNN	chinin (z angl. quinine)
RESV	resveratrol
RIF	rifampicin
RNS	reaktivní formy dusíku (z angl. reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
SDS	dodecylsírán sodný
s.o.	směrodatná odchylka
SOD	superoxiddismutasa
SULF	sulfafenazol
TAM	tamoxifen
TAO	triacetyloleandomycin
TBARS	reaktivní sloučeniny kyseliny thiobarbiturové (z angl. thiobarbituric acid reactive substances)

TBZ	thiabendazol
TCA	trichloroctová kyselina (z angl. triacetic acid)
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TCP	tranlylcypromin
TEPA	<i>N,N,N'</i> -triethylthiofosforamid
TMS	2,4,3',5'-tetramethoxystilben
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRM	tryptamin
TST	testosteron
URO	uroporfyrinogen
WARF	warfarin

# 1) Úvod

Anthokyany, podtřída flavonoidů, jsou přírodní sloučeniny, které způsobují červenou nebo dokonce fialovou barvu ovoce a zeleniny. Předpokládá se, že konzumace anthokyanů dokáže zmírnit následky stárnutí<sup>1</sup> a zánětů, které probíhají v organismu<sup>2,3</sup>, snížit obezitu<sup>3,4</sup> a s ní spojené metabolické problémy, léčit některá poškození zraku<sup>3,5</sup> a zlepšit prostorovou paměť<sup>6</sup>. Mezi plodiny bohaté na anthokyany patří borůvky, červené zelí, brusinky, ředkvičky, maliny, černý rybíz, višně a červená jablka, ale také vybrané odrůdy barevné pšenice. Cílem pěstování pšenic bohatých na anthokyany (ARW), které působí v organismu jako antioxidanty, je snaha o pozitivní vliv na zdravotní stav konzumentů. Pšenice jsou kříženy tak, aby mohly poskytnout zdroj antioxidantů i v běžně konzumovaném pečivu jako je chleba<sup>7</sup>. I když je dnes pšenice bohatá na anthokyany v západních zemích běžně dostupná, dosud nebyly detailně prozkoumány střednědobé účinky konzumace anthokyanů na zvířecí i lidský organismus. Závěry některých studií naznačují, že vyšší koncentrace polyfenolů mohou v přítomnosti autoxidantů působit prooxidačně<sup>8,9</sup>, což může ovlivnit naše zdraví.

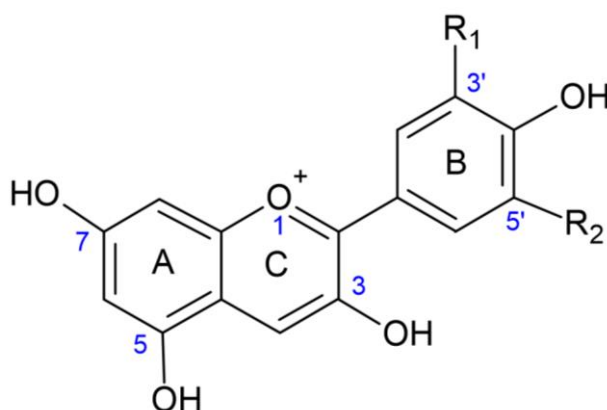
Tato disertační práce je zaměřena na studium vlivu konzumace potravy s vyšším obsahem anthokyanů na jaterní biotransformační enzymy, zejména na cytochromy P450 (CYP) a také na sledování změn antioxidačních parametrů u potkanů, kura domácího a králíků. CYP metabolizují cizorodé látky na polárnější metabolity, které obvykle dále vstupují do konjugačních reakcí za vzniku polárních konjugátů, které jsou pak vyloučeny z organismu močí nebo žlučí. Pokud dojde k negativnímu ovlivnění aktivit těchto enzymů, může se projevit toxický efekt xenobiotik. Kumulace škodlivých látek v těle může způsobit celou řadu zdravotních problémů. Naopak při zvýšené aktivitě těchto enzymů se mohou rychleji metabolizovat některá léčiva, jako warfarin (WARF), diazepam (DIAZ), paracetamol (APAP) a může se tak snížit jejich účinnost. Zvýšená aktivita CYP má za následek také rychlejší přeměnu některých prokarcinogenů na aktivní karcinogenní molekuly například u polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) a mykotoxinů<sup>10</sup>. Při vyšší aktivitě CYP mohou být produkovány volné radikály<sup>11</sup>, které při vyšší koncentraci negativně působí na náš organismus. Úlohou antioxidantů je udržení redoxní rovnováhy v organismu a zabránění oxidačnímu stresu. Sledování antioxidačních parametrů nám umožňuje sledovat schopnost našeho organismu bojovat s volnými radikály, což může pomoci snížit riziko vzniku chronických zánětů<sup>2,3</sup> a snížit rozvoj buněčného stárnutí<sup>1</sup>.



## 2) Teoretická část

### a) Studované látky přírodního původu – anthokyany

Anthokyany jsou ve vodě rozpustná barviva přírodního původu s antioxidačními účinky. Jsou tvořeny anthokyanidiny (Obrázek 1) a cukernou složkou (např. *O*-glykosid)<sup>12</sup>, která je většinou připojena v pozici 3- kruhu C. V některých případech může být cukerná složka navázána i v poloze 5- nebo 7- na kruhu A. Mezi cukry nejčastěji se vážící na anthokyanidiny patří glukóza, galaktóza, ramnóza, arabinóza a xylóza ve formě mono-, di- nebo tri- sacharidů<sup>13</sup>.



**Obrázek 1: Struktura anthokyanidinů.** Flavyliový kation tvořený kruhy A, B a C je při  $\text{pH} \leq 2$  zodpovědný za červenou barvu anthokyanidinů<sup>14</sup>.

Jednotlivé anthokyanidiny se navzájem liší pouze v substituentech  $R_1$  a  $R_2$ , které představují atomy vodíku, hydroxylové nebo methoxy skupiny.

ANTHOKYANIDINY	$R_1$	$R_2$
KYANIDIN	-OH	-H
DELFINIDIN	-OH	-OH
PELARGONIDIN	-H	-H
MALVIDIN	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>
PEONIDIN	-OCH <sub>3</sub>	-H
PETUNIDIN	-OH	-OCH <sub>3</sub>

**Tabulka 1: Tabulka anthokyanidinů (anthokyanů bez cukerné složky).**

Anthokyany mohou v závislosti na pH prostředí měnit svou barvu od červené barvy flavyliového kationtu v kyselém prostředí ( $\text{pH} < 3$ ), přes fialovou barvu neutrální chinoidní

báze ve slabě kyselém prostředí (pH 6 - 7)<sup>15</sup> až po modrou barvu aniontu chinoidní báze ve slabě zásaditém prostředí (pH 8,1 u petainu)<sup>16</sup>.

Složení běžné diety je u jednotlivců značně variabilní, a s tím souvisí i variabilita konzumace polyfenolických látek, např. anthokyanů. Denní příjem anthokyanů závisí na ročním období, zeměpisné poloze, i na způsobu stravování každého jednotlivce. Podle Národního průzkumu zdraví a výživy „National Health and Nutrition Examination Survey“ (NHANES, USA) provedeného v období 2007-2008 byl průměrný příjem anthokyanů  $11,6 \pm 1,1$  mg za den<sup>17</sup>.

Anthokyanany jsou stejně jako jiné flavonoidy přijímány do organismu ve formě glykosidů<sup>18,19</sup>. Většina anthokyanů je velmi rychle absorbována přes žaludeční stěnu do krve<sup>20</sup> a vyloučena do žluči (první anthokyanany už po 20 minutách) jak v původní podobě, tak v podobě metabolitů. Celková biodostupnost anthokyanů je zdánlivě malá, protože organismus je schopen přijmout jen malé množství podaných anthokyanů (350  $\mu$ mol)<sup>21</sup>.

González-Barrio a kol.<sup>22</sup> srovnali vstřebávání anthokyanů do organismu mezi dobrovolníky a pacienty s ileostomií. Jejich výsledky prokázaly, že anthokyanany nejsou do organismu vstřebávány přes tenké střevo a jsou metabolizovány převážně v tlustém střevě. Hodinu a půl od konzumace stravy bohaté na kyanidin-3-*O*-glykosidy byla hladina anthokyanů v plazmě v řádech desítek  $\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ <sup>21</sup>. Myši dostávaly anthokyanany perorálně nebo intravenózně a po 30 minutách byla hladina anthokyanů vstřebovaných ve žluči 3,3 % celkového množství anthokyanů obsažených v potravě<sup>23</sup>. Talavéra a kol.<sup>24</sup> podali potkanům v potravě extrakt z černého rybízu a sledovali orgánovou distribuci a metabolismus anthokyanů. Žaludek potkanů obsahoval pouze původní anthokyanany. V ledvinách, lačnicku a játrech byly přítomny původní, methylované i konjugované anthokyanany, ale jejich koncentrace se orgán od orgánu lišily. V potkaních játrech byly nejhojněji zastoupeny methylované anthokyanany. V lačnicku (střední část tenkého střeva) a plazmě se nacházely anthokyanidiny. V mozku se nacházelo více původních anthokyanů (okolo 0,25 %) než bylo vyloučeno v moči (zhruba 0,19 %). Zatímco po orálním podání byl dominantním anthokyanem v játrech a mukóze trávicího traktu kyanidin-3-*O*-glukosid (K3G), po intravenózní aplikaci byly v těch samých tkáních přítomny jeho methylované a glukuronidované metabolity. Doba, za jakou se odbourá polovina K3G, se v závislosti na orgánu pohybuje někde mezi 0,3 a 1,8 h. Nejvyšší dávky anthokyanů (stále v řádech desetin procenta původního množství) se v moči objevují do 6 hodin od konzumace jídla<sup>25</sup>.

Konzumace přírodních antioxidantů (mezi které řadíme i anthokyanany) prokázala pozitivní vliv na živý organismus<sup>26</sup>. Příkladem může být studie, ve které měli dobrovolníci

konzumující denně polyfenoly zvýšenu průchodnost cév<sup>27</sup>. Dalším příkladem může být snížení hladiny volných radikálů a růstu nádorů u experimentálních zvířat krmených anthokyany<sup>28</sup>. Potkani krmení batáty (obsahující anthokyany) měli po jídle oproti kontrole nižší hladinu cukru v krvi<sup>29</sup>.

## b) Antioxidační parametry

V poslední době vzrůstá zájem o studium vlivu volných radikálů a oxidačního stresu na živé organismy. Na jednu stranu mají volné radikály celou řadu významných fyziologických funkcí, jsou například využívány v boji proti bakteriím. Naproti tomu nadbytek reaktivních forem kyslíku (ROS) nebo dusíku (RNS) může způsobit vznik řady onemocnění<sup>30</sup>.

Mezi volné radikály patří např. hydroxylový radikál ( $\bullet\text{OH}$ ), superoxidový radikál ( $\text{O}_2\bullet^-$ ), peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a oxid dusnatý ( $\text{NO}\bullet$ ). Hlavním intracelulárním zdrojem ROS je mitochondrie, která přemění něco mezi 1 - 2 % přijatého molekulárního kyslíku právě na volné radikály<sup>31</sup>. V mitochondrii se na tvorbě ROS podílí 9 systémů: Komplexy I (NADH:ubichinon-oxidoreduktasa), II (substrát:ubichinonoxidoreduktasa) a III (ubichinol:ferricytochrom-c-oxidoreduktasa) dýchacího řetězce, NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasa (CYB5R), monoaminoxidasy (MAO), dihydroorotát dehydrogenasa, glycerol-3-fosfát dehydrogenasa, akonitasa a pyruvátdehydrogenasový komplex<sup>32</sup>. Pokud tvorba volných radikálů převažuje nad antioxidační kapacitou organismu, tak se organismus dostane do stavu oxidačního stresu. Vlivem čehož jsou poškozovány lipidy, proteiny, DNA, zvyšuje se buněčné stárnutí<sup>33</sup> a mohou se rozvinout různé nemoci<sup>34</sup> (artritida, lupus). Oxidační stres může být příčinou ischemických chorob (infarkt, mrtvice), vysokého krevního tlaku, neurologických nemocí (Alzheimerova a Parkinsonova choroba, svalová dystrofie)<sup>35</sup> a rakoviny<sup>34</sup>.

ROS ( $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{O}_2\bullet^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , HOCl) mají i pozitivní roli v organismu, protože ve fagolysozomu pomáhají prostřednictvím respiračního vzplanutí odstraňovat imunitním systémem zachycené mikroorganismy, cizorodé částice a části poškozených buněk<sup>30</sup>. Zvýšené hladiny reaktivních forem kyslíku mohou vyvolávat apoptózu rakovinných buněk v rámci cílené terapie nádorových onemocnění<sup>36</sup>.

Při studiu efektu přírodních antioxidantů na oxidační stres u živých organismů se sledují antioxidační parametry systému. Antioxidační parametry můžeme rozdělit na enzymatické a neenzymatické. Superoxiddismutasa (SOD), glutathion-S-transferasa

(GST), glutathion peroxidasa (GPx), glutathion reductasa (GSR) jsou zástupci enzymů oxidačního stresu a jsou stanovovány v erytrocytech. Neenzymatické antioxidační parametry popisují změnu hladiny malondialdehydu (TBARS), -SH skupin, redukovaného glutathionu (GSH) a jsou stanovovány v plazmě popřípadě v erytrocytech.

Peroxidasy jsou enzymy oxidující různé substráty (donory) pomocí peroxidu vodíku (akceptoru), který je v průběhu reakce přeměněn na vodu. Peroxidasy mohou místo peroxidu vodíku použít i organické peroxidy, které přeměňují na alkoholy. Patří do třídy oxidoreduktas a mohou být rozděleny podle kofaktoru aktivního místa na hemové a nehemové peroxidasy, jejichž aktivní místo obsahuje namísto hemu cysteinový nebo selenocysteinový zbytek.

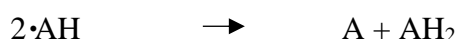
Mezi zástupce hemových peroxidas patří katalasa, která se takřka výhradně nachází v peroxisomu. U živočichů je katalasa (CAT) tvořena čtyřmi podjednotkami, z nichž každá obsahuje hemové železo ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Prostřednictvím hemového železa CAT přeměňuje dvě molekuly peroxidu vodíku na vodu a kyslík.



Tato reakce je důkazem, že katalasa je jedinečným zástupcem peroxidas, protože peroxid vodíku zde vystupuje jako donor i akceptor elektronů.

Rozsáhlá skupina hemových peroxidas je u savců dále rozdělena na eosinofilní peroxidasy, myeloperoxidas, laktoperoxidasu a thyroïdní peroxidasu. Všechny savčí peroxidasy mají hem v aktivním místě kovalentně vázaný.

Mechanismus oxidace substrátů pomocí hemových peroxidas je možné zapsat následujícími rovnicemi:



Reakční mechanismus oxidace substrátů katalasou a peroxidasami je několikastupňový proces<sup>37</sup>. Hem  $\text{Fe}^{3+}$  katalasy redukuje jednu molekulu peroxidu vodíku na vodu za vzniku kovalentního  $\text{Fe}^{4+}$  oxyferryly a kationtu porfyrinového radikálu, a právě tento intermediát stojí za peroxidačními vlastnostmi katalasy. Intermediát v druhém kroku

oxiduje jeden kyslík peroxidu vodíku za vzniku molekulárního kyslíku a druhé molekuly vody<sup>38</sup>.

Mezi zástupce nehemových peroxidas patří GPx. Dva glutathiony ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycin) poskytují volné elektrony a sami se oxidují na oxo formu (GSSG). Peroxid vodíku je redukován GPx 1 na vodu a organický hydroperoxid, který je redukován GPx 4 na alkohol<sup>39</sup>. GSSG je redukována GSR, která jako zdroj energie pro reakci používá redukovaný nikotinamidadeninukleotid fosfát ( $\text{NADPH} + \text{H}^+$ )<sup>40</sup>.

GST, patřící do skupiny transferas, funguje jako „neselenová GPx“, kdy přeměňuje lipidové hydroperoxydy na alkoholy, a zároveň jako enzym druhé fáze metabolismu xenobiotik, kdy GST konjuguje karcinogeny nebo látky znečišťující životní prostředí s glutathionem, a tím umožňuje jejich snazší odstranění z organismu<sup>41</sup>.

Posledním enzymem charakterizujícím oxidační stav organismu je SOD, která je řazena mezi oxidoreduktasy a katalyzuje přeměnu  $\text{O}_2^{\cdot-}$  na peroxid vodíku a kyslík<sup>42</sup>.

TBARS jsou reaktivní formy kyseliny thiobarbiturové, které slouží k stanovení míry peroxidace lipidů (množství malondialdehydu) v plazmě, erytrocytech nebo v tkáňovém homogenátu<sup>43</sup>.

GSH je jedním z nejdůležitějších endogenních antioxidantů a díky své dobré rozpustnosti ve vodě je nejhojněji zastoupen v buněčném cytosolu<sup>44</sup>. Stanovení hladiny glutathionu v organismu je velice důležité, protože, jak již bylo uvedeno dříve, glutathion prostřednictvím GPx redukuje peroxidy<sup>39</sup> a prostřednictvím GST tvoří s cizorodými látkami konjugáty, které jsou snadněji odstraňovány z těla<sup>41</sup>.

### c) Metabolismus cizorodých látek

Cizorodé látky (xenobiotika) bývají většinou hydrofobní povahy. Po absorpci do organismu jsou přeměňovány na polárnější metabolity, aby mohly být vyloučeny např. močí. Tato přeměna probíhá obvykle ve dvou fázích a příslušné enzymy se nazývají enzymy I. a II. fáze metabolismu xenobiotik. Mezi enzymy I. fáze patří hlavně CYP<sup>45,46</sup>, ale také alkoholdehydrogenasa (ADH), esterasy, NADPH:chinon dehydrogenasy, epoxid hydrolasy a jiné v menší míře se vyskytující enzymy<sup>47</sup>. CYP jsou hem-obsahující monooxygenasy podílející se na metabolismu jak endogenních látek (prostaglandiny, steroly a mastné kyseliny), tak látek pro organismus cizích. Cizorodé látky jsou rozmanitou skupinou, do které patří léčiva (DIAZ, fenacetin, ...), (potenciální) karcinogeny

(akrylamid), složky stravy, škodlivé látky znečišťující přírodu (PAU, pesticidy) a celá řada dalších substancí<sup>48</sup>.

Ve II. fázi metabolismu xenobiotik metabolit vstupuje do konjugačních reakcí, kdy se na něj naváže polární molekula těla vlastní (např. kyselina glukuronová nebo kyselina octová) a dojde ke vzniku konjugátů, které jsou pak vyloučeny z organismu nejčastěji močí nebo žlučí. Mezi enzymy II. fáze metabolismu xenobiotik patří například *N*-acetyltransferasy, UDP-glukuronyltransferasy, GST a methyltransferasy<sup>49</sup>.

### *I. Cytochromy P450*

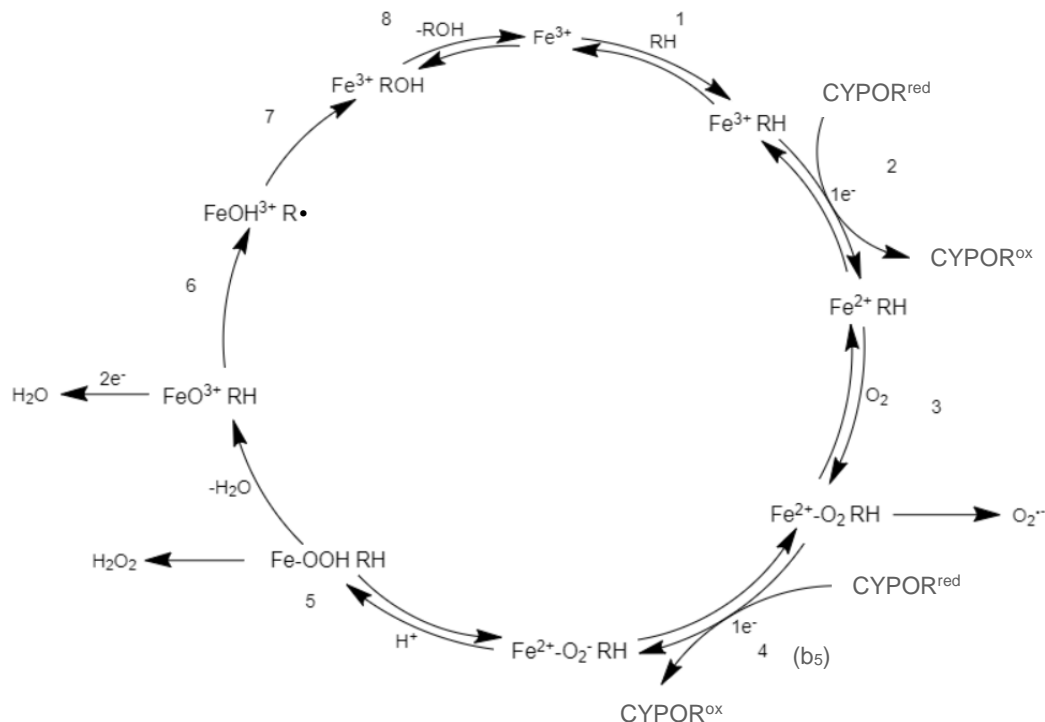
CYP přeměňují xenobiotika na polárnější látky, které jsou ve vodě lépe rozpustné. CYP se nacházejí v mnoha tkáních a buňkách. Nejvýznamnější výskyt je v membráně endoplazmatického retikula jaterních buněk<sup>50</sup>. Vedle detoxifikační funkce CYP jsou známy situace, kdy tyto enzymy mohou působit na organismus i negativně. Některé látky podezřelé z karcinogenity (např. akrylamid) jsou právě CYP přeměňovány na karcinogenní meziprodukty (např. glycidamid)<sup>51</sup>. Jsou známy vážné následky způsobené spolužíváním přírodních látek jako je grepový džus nebo třezalka s léčivými<sup>45</sup>. Zvýšená aktivita CYP může také zvyšovat koncentraci volných radikálů<sup>52</sup>, které mohou způsobovat záněty, stárnutí organismu a neurologické poruchy.

Studie publikované v nedávné době prokázaly, že anthokyany mohou mírně ovlivňovat aktivity CYP<sup>53,54</sup>.

### *Jak CYP fungují?*

Předtím, než je možné cizorodé látky z těla odstranit, tak je potřeba zvýšit jejich polaritu. Celý mechanismus, kdy CYP katalyzují reakce oxidativní přeměny, je znázorněn na schématu (Obrázek 2). Prvním krokem je navázání substrátu na protein do vazebného místa pro substráty, které je součástí aktivního místa spolu s hemem. Druhým krokem je redukce komplexu RH-(Fe<sup>3+</sup>) na komplex RH-(Fe<sup>2+</sup>). Elektron potřebný pro redukci je přenesen NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou z NADPH + H<sup>+</sup>. V redukovaném stavu mohou CYP vázat na centrální atom železa některé ligandy a nejvýznamnějším z nich je oxid uhelnatý (CO). Komplex CYP s CO poskytuje absorpční maximum při 450 nm a právě podle této vlnové délky získala celá rodina enzymů název - cytochromy P450. Ve třetím kroku je molekulární kyslík navázán na komplex RH-(Fe<sup>2+</sup>) za vzniku ternárního komplexu. Formální oxidační stav kyslíku ani železa v tomto komplexu ani v dalších

krocích není doposud přesně znám. Ve čtvrtém kroku je na ternární komplex prostřednictvím NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy (nebo NADH:cytochrom b<sub>5</sub> oxidoreduktasy a cytochromu b<sub>5</sub>) přenesen druhý elektron. V pátém kroku dojde k následnému uvolnění molekuly vody. V šestém kroku je pravděpodobně na kyslíkový atom komplexu navázán vodík odštěpený ze substrátu. V sedmém kroku je celý komplex přestavěn za vzniku hydroxylovaného produktu. V osmém kroku je hydroxylovaný produkt uvolněn a oxidovaná forma CYP je připravena na další cyklus oxidace cizorodých látek<sup>55</sup>.



**Obrázek 2: Základní schéma popisující sérii oxidačních reakcí katalyzovaných CYP.** RH, substrát; CYPOR, NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa; b<sub>5</sub>, cytochrom b<sub>5</sub>; ROH, produkt. Schéma s drobnými úpravami převzato z Dorokhov a kol<sup>56</sup>.

Celý proces katalyzovaný CYP je možno zapsat následující chemickou reakcí:



*Názvosloví*

*Rozdělení CYP na podrodiny:*

Názvosloví CYP, které je v současné době používáno, je založeno na shodnosti aminokyselinové sekvence apoproteinu (pořadí aminokyselin). Jednotlivé CYP jsou

rozděleny na rodiny, podrodiny a nakonec na jednotlivé enzymy. Způsob klasifikace zavedli Nebert a Nelson<sup>57</sup>. Jako příklad pro vysvětlení nomenklatury bude v následujícím textu použit enzym CYP1A1. První v názvu je zkratka CYP (superrodina), která označuje cytochromy P450. Druhá část názvu enzymu je arabská číslice např. 1, která řadí daný enzym do rodiny 1. Jednotlivé CYP patřící do jedné rodiny mají minimálně 40 % shody ve své sekvenci aminokyselin. Podle Cytochrome P450 Knowledgebase (2006) existuje 292 různých rodin CYP<sup>58</sup>. Po první arabské číslici následuje písmeno latinské abecedy např. A, které řadí zvolený enzym do podrodiny A. Ovšem u některých cytochromů P450 je podrodina značena i dvojicí písmen (např. CYP4AD u *Drosophily Melanogaster*). Enzymy patřící do jedné podrodiny mají sekvenci aminokyselin totožnou minimálně z 55 %. Jednotlivé enzymy se od sebe liší v pořadí druhou arabskou číslicí např. 1 označující konkrétní enzym CYP1A1. Jednotlivé enzymy např. CYP1A1 a CYP1A2 se od sebe musí lišit alespoň 3 % ve své sekvenci aminokyselin. Lidé mají 57 genů (včetně pseudogenů) CYP<sup>59</sup>. V dalších podkapitolách budou blíže popsány podrodiny CYP 1A, 1B, 2A, 2B, 2C, 2D, 2E a 3A, které se největší měrou podílejí na metabolismu xenobiotik a jejichž aktivita a/nebo genová/proteinová exprese byla předmětem zájmu této práce.

### *1. Podrodina CYP1A*

Podrodina CYP1A je tvořena dvěma enzymy a to CYP1A1 a CYP1A2. CYP1A1 se nachází v plicích, v několika extrahepatálních tkáních, lymfocytech, monocytech<sup>60</sup> a v nižší koncentraci v játrech<sup>61</sup>. Naopak CYP1A2 se vyskytuje hlavně v játrech<sup>62</sup> a tvoří asi 13 % všech CYP v tomto orgánu obsažených<sup>63,64</sup>. Podobnost sekvencí enzymu CYP1A1 a CYP1A2 je kolem 70 %.

Mezi první používané substráty pro stanovení aktivity CYP1A1 patřil benzo[a]pyren (BaP; 3-hydroxylace)<sup>65</sup>. Specifickým substrátem CYP1A1 je 7-Ethoxy-O-resorufin (ETRR), který podléhá deethylaci za vzniku fluorescenčního produktu resorufinu<sup>66,67</sup>. Expres mRNA CYP1A1 v játrech je oproti CYP1A2 velmi malá, a proto nemá roli významného metabolizátora podávaných léčiv<sup>68</sup>.

CYP1A2 metabolizuje APAP<sup>69</sup>, theofylin<sup>70</sup>, kofein<sup>71</sup>, fenacetin (PHEN)<sup>72</sup>, a celou řadu aromatických a heterocyklických aminů. Nespecifickým substrátem CYP1A2 je R-WARF, který je metabolizován na 6- a 8-hydroxywarfarin<sup>73</sup>. CYP1A2 metabolizuje zhruba 4 % léčiv na trhu<sup>74</sup>.

CYP1A2 je snáze indukovatelný ve srovnání s CYP1A1 při použití nižších koncentrací induktorů<sup>75</sup>. Oba enzymy mohou být v různých organismech indukovány



cigaretovým kouřem<sup>76</sup>, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinem (TCDD), heterocyklickými aminy, mezi něž patří omeprazol (OM)<sup>77</sup> a polychlorovanými bifenyly (PCB)<sup>78</sup>. Kouření cigaret, konzumace pečeného masa nebo rostlin z čeledi brukvovité, PAU, heterocyklických aminů a usilovné cvičení<sup>79</sup> patří mezi induktory enzymů podrodiny CYP1A.

Příkladem inhibitorů obou enzymů jsou  $\alpha$ -naftoflavon ( $\alpha$ NF) a ellipticin<sup>68</sup>. Mezi inhibitory specifické pouze pro CYP1A1 patří 1-(propyn-1-yl)pyren a 2-(propyn-1-yl)fenanthren<sup>80</sup>.

## 2. Podrodina CYP1B

Podrodina CYP1B má jediného zástupce a to CYP1B1, který může být zodpovědný za vznik nádorů sleziny, prostaty, plic, prsu, vaječníků, střev, dělohy nebo brzlíku<sup>81</sup>.

Pro stanovení aktivity tohoto enzymu je možno použít substrát  $17\beta$ -estradiol (E2), který je právě CYP1B1 metabolizován na 4-hydroxyestradiol<sup>82</sup>. Aktivita CYP1B1 může být rovněž stanovena společně s CYP1A1, pomocí inhibitorů 1-(propyn-1-yl)pyrenu nebo 2-(propyn-1-yl)fenanthrenu<sup>80</sup>, a po podání substrátu ETRR je možno stanovit *O*-deethylační aktivitu CYP1B1. Katalytická aktivita CYP1B1 se pohybuje mezi aktivitami enzymů CYP1A1 a CYP1A2<sup>80</sup>. Podobně jako enzymy podrodiny CYP1A metabolizuje CYP1B1 PAU, nitro-PAU, aromatické a heterocyklické aminy<sup>81</sup> na karcinogeny<sup>83</sup>.

CYP1B1 může být indukován PCB<sup>81</sup> a cigaretovým kouřem, který ale způsobuje řádově nižší hodnoty indukce CYP1B1 oproti enzymům podrodiny CYP1A<sup>76</sup>.

Inhibitory CYP1B1 jsou  $\alpha$ NF (v závislosti na koncentraci)<sup>80</sup>, 2-ethynylpyren<sup>80</sup>, resveratrol (RESV)<sup>84</sup> a 2,4,3',5'-tetramethoxystilben (TMS)<sup>85</sup>.

## 3. Podrodina CYP2A

Podrodinu lidských CYP2A tvoří tři enzymy CYP2A6, CYP2A7 a CYP2A13. Enzymy podrodiny CYP2A jsou lokalizovány v játrech, ale i v jiných extrahepatálních tkáních. Genová podobnost mezi jednotlivými enzymy podrodiny CYP2A je velice vysoká. Gen CYP2A6 je z 97 % shodný s CYP2A7 a z 85 % s CYP2A13<sup>86</sup>.

CYP2A6 tvoří okolo 4 % všech CYP přítomných v játrech<sup>87</sup>. Specifickým substrátem pro CYP2A6 je kumarin (KUM)<sup>88</sup>. Stanovit aktivitu CYP2A6 *in vivo* je možné po podání kofeinu a mírou aktivity je v tomto případě poměr metabolitů 1,7-dimethylxantinu a 1,7-dimethyl močové kyseliny<sup>89</sup> v moči. Mezi další substráty

CYP2A6 patří průmyslové chemikálie jako alkoxyétery (*tert*-butyl methyl éter)<sup>90</sup>, 1,3-butadien (karcinogen, rovněž metabolizovaný CYP2E1)<sup>91</sup>.

CYP2A6 a CYP2A7 jsou schopny metabolizovat *N*-nitrosodiethylamin<sup>92,93</sup>.

Enzymy podrodiny CYP2A jsou indukovatelné rifampicinem (RIF)<sup>94</sup>, PB<sup>95</sup>, nikotinem a DEX<sup>63</sup>, ale jsou velmi málo indukovány barbituráty<sup>95</sup>.

Mezi inhibitory CYP2A6 patří diethyldithiokarbamát (DDC)<sup>93</sup>, tranlycypromin (TCP) a tryptamin (TRM)<sup>96</sup>. 8-methoxypsoralen inhibuje aktivitu CYP2A6<sup>97</sup> a CYP2A13<sup>98</sup>, ale ne CYP2A7.

#### 4. Podrodina CYP2B

U člověka existují dva zástupci podrodiny CYP2B, a to CYP2B6 a CYP2B7. CYP2B6 je nejvíce exprimován v játrech<sup>99</sup> a je rovněž přítomen v plicích<sup>100</sup>.

CYP2B6 zaujímá něco mezi 2 až 10 % všech CYP přítomných v játrech<sup>101</sup> a ženy mají oproti mužům vyšší aktivitu, expresi mRNA a proteinovou expresi tohoto enzymu<sup>102</sup>. Substráty používanými k stanovení aktivity CYP2B6 jsou 7-Pentoxy-*O*-resorufin (PROD)<sup>103</sup> a 7-ethoxy-4-(trifluormethyl) kumarin (EFC)<sup>104</sup>. Enzym CYP2B6 je významným metabolizátorem cyklofosfamidu (CPD)<sup>105</sup>.

Sloučeniny schopné indukovat podrodinu CYP2B jsou fenobarbitaly (PB)<sup>106</sup>, efavirenz (antivirotikum proti HIV/AIDS)<sup>107</sup>, isofluoran (anestetikum)<sup>108</sup>, *S*-mefenytin (MEP; lék proti úzkosti)<sup>109</sup>.

Specifickým inhibitorem lidského CYP2B6 je *N,N,N'*-triethylthiofosforamid (TEPA)<sup>110</sup>, dalšími specifickými inhibitory jsou 2-isopropenyl-2-methyladamantan (2IMA), CPD<sup>110</sup>, ketamin<sup>111</sup>, propofol<sup>111</sup>, tamoxifen (TAM)<sup>112</sup> a 3-isopropenyl-3-methyldiadamantan (3IMDA)<sup>113</sup>. Protilátka proti potkaní CYP2B1 inhibuje rovněž aktivitu metabolismu EFC u lidí<sup>114</sup>.

#### 5. Podrodina CYP2C

Enzymy CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19 jsou součástí podrodiny CYP2C<sup>115</sup>, která tvoří okolo 20 % všech CYP přítomných v játrech<sup>63</sup> a metabolizuje zhruba 16 % všech na trhu dostupných léčiv<sup>116</sup>.

Mezi substráty CYP2C8 patří paklitaxel ( $\alpha$ -hydroxylace)<sup>117,118</sup>.

Aktivita lidského CYP2C9 je stanovena pomocí diklofenaku (DF; 4'-hydroxylace)<sup>119</sup>. CYP2C9 je druhým nejvíce exprimovaným CYP vyskytujícím se

v játrech<sup>63</sup>. Fenylobutazon je inhibítozem CYP2C9<sup>120</sup>. Velké opatrnosti je potřeba při užívání WARF, protože je kromě CYP2C9 metabolizován rovněž CYP1A2 a CYP3A4<sup>73</sup>. Vzhledem ke genovému polymorfismu CYP2C9, je nutné při dávkování WARF zohlednit genotyp pacienta<sup>121</sup>. CYP2C9 rovněž metabolizuje některé karcinogeny např. BaP<sup>65</sup>.

Aktivita CYP2C19 se stanovuje s pomocí DIAZ (*N*-demethylace)<sup>122</sup>. Léčivo thalidomid, původně podávané jako sedativum a antiemetikum, též označované jako Contergan, známé svým teratogenním efektem je 5- a 5'-hydroxylováno CYP2C19<sup>123</sup>. V neposlední řadě CYP2C19 metabolizuje steroidy<sup>124</sup>. CYP2C19 je polymorfní a obzvláště u Asiatů se projevuje jeho snížená aktivita<sup>125</sup>. Při podávání léčiv musí být postupováno individuálně u každého pacienta (např. podávání OM pacientům s onemocněním trávicího traktu)<sup>126</sup>.

CYP2C8, CYP2C9 a CYP2C19 jsou podobně jako celá řada výše zmíněných enzymů CYP indukovány PB a RIF<sup>58</sup>.

OM, inhibitor protonových pump užívaný při gastrointestinálních potížích, a *trans*-retinová kyselina jsou metabolizovány všemi výše uvedenými zástupci podrodiny CYP2C<sup>58</sup>.

Některé deriváty sulfafenazolu (SULF) inhibují většinu enzymů podrodiny CYP2C<sup>127</sup>.

## 6. Podrodina CYP2D

Podrodina CYP2D je u lidí tvořena enzymem CYP2D6, který je lokalizován především v játrech a v menším množství je přítomen též v mozku<sup>128</sup> a plicích<sup>129</sup>. Je jedním z hlavních enzymů podílejících se na I. fázi metabolismu xenobiotik a byl prvním CYP, u kterého byl nalezen genetický polymorfismus s četnými alelickými variantami<sup>130</sup>. Tento enzym zaujímá sice jen okolo 5 % všech CYP obsažených v játrech<sup>63</sup>, ale je schopen katalyzovat přeměnu zhruba 25 až 30 % všech léčiv metabolizovaných CYP<sup>74</sup>. Rozdíly v aktivitě tohoto enzymu mezi jednotlivci jsou způsobeny genetickým polymorfismem<sup>131</sup>. Velké rozdíly v genetické variabilitě CYP2D6, např. u jednotlivých etnik, mohou způsobovat nemalé komplikace při podávání léčiv. Z tohoto důvodu je na místě obezřetnost při předepisování látek s úzkým terapeutickým oknem jako je debrisochin (antihypertensivum)<sup>132</sup>. Zvláště při podávání antipsychotik a neuroaktivních látek<sup>133</sup> je potřeba zohledňovat genotyp a fenotyp každého jednotlivce.

CYP2D6 je jediným enzymem superrodiny CYP, u kterého nebyla indukce přesvědčivě prokázána<sup>134</sup> (snad jen stimulace haloperidolem)<sup>135</sup>.

Mezi substráty CYP2D6 je možno zařadit bufuralol (BUF; 1'-hydroxylace)<sup>136</sup>, desmethylcitalopram (*N*-demethylace)<sup>137</sup>, debrisochin (hydroxylace)<sup>132</sup> a mianserin (MIAN) metabolizovaný na 8-hydroxy-*N*-desmethylnianserin<sup>138</sup>.

Inhibitorem CYP2D6 je chinidin (QND)<sup>139</sup>, 5-fluoro-2-[4-[(2-fenyl-1*H*-imidazol-5-yl)methyl]-1-piperazinyl]pyrimidin někdy označovaný i SCH66712 (nekompetitivní inhibice)<sup>140</sup>.

### 7. Podrodina CYP2E

Podrodina CYP2E je tvořena jediným zástupcem, a to enzymem CYP2E1, který metabolizuje zhruba 2 % všech léčiv na trhu<sup>74</sup>. Tento enzym je přítomný v plicích<sup>100</sup>, jícnu, tenkém střevě<sup>141</sup>, mozku<sup>142</sup> a nejhorněji v játrech, kde tvoří okolo 6 % všech přítomných CYP<sup>74</sup>.

Pro stanovení aktivity tohoto enzymu *in vitro* je často používán jako specifický substrát chlorzoxazon (CLX, svalový relaxant), který je hydroxylován na 6-hydroxychlorzoxazon (6-OHCLX)<sup>143,144</sup>, mezi další substráty patří 4-nitrofenol (4NF; hydroxylace)<sup>145</sup>.

CYP2E1 se účastní metabolismu endogenních látek i xenobiotik. Příkladem endogenních substrátů jsou mastné kyseliny (jako je kyselina arachidonová<sup>146</sup>). Tento enzym metabolizuje i některé další běžně se vyskytující látky, například ethanol (EtOH). Zde získává na významu obzvláště při silné intoxikaci, kdy dojde k saturaci ADH nebo u jedinců s jejím deficitem<sup>147</sup>. CYP2E1 metabolizuje jen malou skupinu nízkomolekulárních léčiv, jako jsou halotan<sup>148</sup> a isofluoran<sup>149</sup> (anestetika).

Látky indukující CYP2E1 u lidí jsou ethanol a aceton<sup>87</sup>.

Inhibitory CYP2E1 jsou 4-methylpyrazol<sup>93</sup> nebo methylen chlorid<sup>150</sup>. Inhibitory ADH a aldehyd dehydrogenasy (např. antabus-disulfiram) jsou schopny inhibovat rovněž CYP2E1<sup>151</sup>. Dokonce některé látky obsažené v brukvovité zelenině, česneku nebo cibuli působí jako inhibitory CYP2E1<sup>152,153</sup>. Podáním protilátky proti potkaní CYP2E1 byl u lidí metabolismus CLX středně inhibován (30 – 60 %) <sup>114</sup>.

Problémy, které může v organismu způsobovat CYP2E1 jsou zvýšený oxidační stres<sup>154,155</sup> a přeměna APAP na hepatotoxický *N*-acetyl-*p*-amino-benzochinon imin (NAPQI)<sup>156</sup>.

## 8. Podrodina CYP3A

Mezi zástupce podrodiny CYP3A u člověka patří enzymy CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 a CYP3A43. CYP3A4 je v těle nejrozšířenějším enzymem CYP a vyskytuje se v žaludku, tlustém střevě<sup>141</sup> a méně v nadledvinkách<sup>157</sup>. Ze všech CYP obsažených v játrech je něco mezi 25 až 30 % tvořeno právě CYP3A4<sup>74</sup> a podíl podrodiny CYP3A v tenkém střevě je ještě vyšší<sup>158</sup>.

V současnosti nejde vyvrátit, ani potvrdit, jestli je exprese nebo aktivita CYP3A4 ovlivněna pohlavím. Příkladem popisující nulový vliv je studie Shimady a kol.<sup>63</sup>, zatímco jiné studie pozorovaly vyšší aktivitu CYP3A4 u žen způsobenou hladinami hormonů v období menstruace, těhotenství a menopauzy<sup>159,160</sup>.

Pro studium aktivity CYP3A4 *in vitro* se využívá jako specifický substrát testosteron (TST; 6 $\beta$ -hydroxylace)<sup>161</sup>. Pro *in vivo* studie se často používá midazolam (1'-hydroxylace)<sup>162</sup>.

Substrátů CYP3A4 je nepřehledné množství. Příkladem mohou být léčiva dihydropyridiny<sup>163</sup>, některá antiarytmika (amiodaron, QND)<sup>164</sup>, imunosupresiva (cyklosporin)<sup>165</sup>, léky proti početí (17 $\alpha$ -ethynylestradiol)<sup>166</sup>, statiny (lovastatin)<sup>167</sup> nebo antivirotika (indinavir)<sup>168</sup>. Mezi substráty CYP3A4 je možné řadit i karcinogeny (aflatoxin B<sub>1</sub>)<sup>169</sup>. Nespecifickým substrátem je WARF, který působením CYP3A4 podléhá 10-hydroxylaci<sup>73</sup>.

DEX je látka potvrzená jako induktor<sup>170</sup>, substrát<sup>171</sup> i inhibitor (v tenkém střevě<sup>172</sup> a játrech<sup>173</sup>). Podobně je na tom prenylovaný floroglucinol hyperforin, obsažený v třezalce, způsobující jak indukci, tak inhibici<sup>174</sup> CYP3A4.

Induktory CYP3A4 jsou efavirenz (antivirotikum)<sup>175</sup>, RIF (antibiotikum)<sup>176</sup>, barbituráty<sup>177</sup>, ale i látky obsažené v ženšenu<sup>178</sup>.

Selektivním inhibitorem CYP3A4 je gestoden (GSD)<sup>179</sup>, který snižuje aktivitu CYP o 60 %. Dalšími inhibitory jsou ketokonazol (KET)<sup>180</sup>, triacetyloleandomycin (TAO)<sup>181</sup>. Protilátka proti potkaní CYP3A2 způsobila u lidí střední inhibici (30 - 60 %) metabolismu TST<sup>114</sup>.

CYP3A4 metabolizuje více než 50 % léčiv vyskytujících se na trhu, a proto je nezbytné při podávání léčiv zohledňovat interakce s přírodními látkami (grepový džus, třezalka) a s dalšími léčivy<sup>182,183</sup>.

## II. Mezidruhové rozdíly CYP mezi člověkem, potkanem, králíkem a kurem

### 1. Podrodina CYP1A

Podrodina CYP1A má velkou mezidruhovou podobnost. Podobnost mezi lidským a potkaním CYP1A1 je 83 % a CYP1A2 je 80 %<sup>87</sup>. Podobnost mezi lidským a králíčím CYP1A1 je 88 % a CYP1A2 je 90 %<sup>184</sup>. Oba enzymy jsou studovány z důvodu jejich účasti na metabolismu karcinogenů, zejména PAU a arylamidů.

CYP1A1 je jak u lidí, tak u potkanů obsažen v játrech v malém množství a je ve vyšším množství součástí extrahepatálních tkání jako tenké střevo<sup>185-187</sup> (u potkanů dominantní)<sup>188</sup>, plíce<sup>62</sup>, placenta<sup>189</sup> a ledviny<sup>190</sup>. U lidí byla nalezena velká variabilita v aktivitě CYP1A1, která může být způsobena indukcí látkami přítomnými v cigaretovém kouři, nebo také látkami přijímanými s potravou<sup>191</sup>.

CYP1A2 je u potkanů i lidí nejvíce zastoupen v játrech a v extrahepatálních tkáních se nachází v nižším množství<sup>190,192</sup>. Stejně jako u lidí jsou u potkanů enzymy podrodiny CYP1A indukovány PAU<sup>87</sup>. OM u potkanů, na rozdíl od lidí<sup>193</sup>, neindukuje hladinu CYP1A proteinů<sup>194</sup>. Způsobený efekt je, stejně jako u CYP3A, příkladem regulace genové exprese závislé na druhu živočicha<sup>87</sup>. Schopnost inhibice CYP1A2 furafyllinem (FUR) je u potkanů až tisícinásobně nižší než u lidí<sup>195</sup>.

U kura je CYP1A4 podobný substrátovou specifitou lidskému CYP1A1 (metabolizuje ETRR; 7-Benzylxy-*O*-resorufin, BROD<sup>196</sup>), zatímco CYP1A5 je podle metabolizovaných substrátů podobnější lidskému CYP1A2 (7-Methoxy-*O*-resorufin, MROD; uroporfyrinogen, URO<sup>197</sup>; arachidonová kyselina; TAM<sup>196</sup>)<sup>198,199</sup>. Sekvence aminokyselin kuřecích CYP1A5 a CYP1A4 jsou bližší lidskému CYP1A1, ale ani jeden z nich není s lidským CYP1A ortologní<sup>197,198</sup>.

Králíci jsou stejně jako lidé schopni metabolizovat ETRR<sup>185</sup> a kofein<sup>74</sup>. Při aplikaci protilátek proti lidskému CYP1A nebo  $\alpha$ NF, inhibitor podrodiny CYP1A, došlo jak u lidí, tak u králíků k velmi silné inhibici (80 - 100 %) metabolismu ETRR<sup>114</sup>. Naopak FUR (specifický inhibitor lidské CYP1A2)<sup>200</sup> inhiboval metabolismus ETRR u králíků pouze slabě (15 - 30 %). Z toho může plynout, že králíci metabolizují ETRR více prostřednictvím CYP1A1.

## 2. Podrodina CYP1B

CYP1B1 je více exprimovaná v nádorech než ve zdravé tkáni<sup>201,202</sup>. U potkanů je exprese mRNA CYP1B1 prokázána v játrech a plicích<sup>203</sup>. U lidí a hlodavců může CYP1B1 přeměňovat látky jako PAU (BaP) na látky vyvolávající poškození DNA a toxicitu<sup>203</sup>. Stále není dostatek informací pro podrobnější srovnání lidského a potkaního CYP1B1. Lidé<sup>82</sup>, stejně jako potkaní samice<sup>204</sup> metabolizují E2.

Studie Kietzové a kol.<sup>205</sup> provedená na králíčích blastocystách starých 5 a 6 dnů, prokázala, že podání PCB může podle stádia vývinu embrya ovlivnit expresi mRNA CYP1B1. Výše uvedená studie potvrzuje, že králíci mají CYP1B1.

Studie Goldstonea a kol.<sup>206</sup> provedená na kuřatech prokázala přítomnost sekvence mRNA připomínající sekvenci lidského CYP1B1. Experiment provedený na křepelkách<sup>207</sup> potvrdil schopnost živočichů řazených stejně jako kur do podtřídy ptáci transformovat substráty běžně metabolizované lidskými CYP1A1, 1A2 a 1B1 (ETRR, MROD)<sup>208</sup>.

## 3. Podrodina CYP2A

U potkanů má podrodina CYP2A (CYP2A1, 2A2, 2A3) odlišnou substrátovou specifitu než u lidí, metabolizuje steroidy (7 $\alpha$ - a 15 $\alpha$ -hydroxylace)<sup>209</sup>. Potkani měli po podání 3-methylcholantrenu (3MC) a pyrazolu (PYR) indukovanou expresi mRNA v jícnu, ledvinách a vzdálené části tenkého střeva<sup>210</sup>.

Aktivita kuřecího CYP reagujícího na protilátku proti lidskému CYP2A6 byla stanovena prostřednictvím KUM (7-hydroxylace)<sup>211</sup>.

Králíci mají v podrodině CYP2A dva zástupce CYP2A10 a CYP2A11, kteří se podílejí na metabolismu KUM<sup>212</sup>. V *in vitro* experimentu došlo při použití protilátky proti lidskému CYP2A6 u králíčích CYP2A pouze k střední inhibici (30 - 60 %) metabolismu KUM oproti velmi silné inhibici (80 - 100 %) u lidí<sup>114</sup>. Pokud byl podáván pilokarpin (PILO; inhibitor a substrát CYP2A6 a CYP3A4)<sup>213</sup>, tak byl metabolismus KUM velmi silně inhibován (80 - 100 %) pouze u králíků<sup>114</sup>.

## 4. Podrodina CYP2B

Podrodina CYP2B je u potkanů tvořena enzymy CYP2B1, 2B2, 2B3. Potkaní CYP2B1 a CYP2B2 jsou téměř totožné a mají velmi podobnou substrátovou specifitu<sup>214</sup>. Některé substráty CYP2B6 jsou běžně využívány jako substráty potkaních enzymů CYP2B1 a králíčích CYP2B4<sup>215,216</sup>. PROD je substrát CYP2B1/2 u potkanů<sup>217</sup>.

Selektivním substrátem pro studium *in vitro* aktivity CYP2B1 je bupropion (BUPR)<sup>218</sup>, dalším substrátem je EFC<sup>219</sup>. Expres podrodiny CYP2B v játrech je vyšší u samců<sup>220</sup>. Podrodina potkaních CYP2B je silně indukována PB a DEX (ligand PXR)<sup>221</sup>. 2IMA a 3IMDA inhibují aktivitu CYP2B2<sup>113</sup>.

Studie zabývající se vlivem metalaxylu (pesticid) na různé kultury hepatocytů potvrdila, že kuřecí primární hepatocelulární rakovinné buňky vytvořené podáváním diethylnitrosaminu<sup>222</sup> jsou schopny metabolizovat PROD (substrát CYP2B1) a BROD (substrát CYP2B2)<sup>223</sup>.

Protilátka proti potkanímu CYP2B1 středně inhibovala (30 - 60 %) u králíků metabolismus EFC<sup>114</sup>. U králíků je za metabolismus EFC zodpovědný CYP2B4, který je indukován PB<sup>74,224</sup>.

### 5. Podrodina CYP2C

U potkanů je podrodina CYP2C tvořena enzymy CYP2C6, 2C7, 2C11, 2C12, 2C13, 2C22 a 2C23<sup>87</sup>. Potkani mají oproti lidem v játrech nejhojněji zastoupeny enzymy právě podrodiny CYP2C, které metabolizují látky od steroidů (hydroxylace), přes dihydropyridiny (oxidace) a diazepiny (*N*-demethylace)<sup>225</sup> až po DF (hydroxylace)<sup>226</sup>. U potkanů se zastoupení jednotlivých enzymů CYP2C liší mezi pohlavími. Dospělé potkani samice mají oproti dospělým samcům v játrech vyšší koncentraci CYP2C12 a CYP2C7<sup>227</sup>. U samců jsou naopak více exprimovány enzymy CYP2C11<sup>228</sup> a CYP2C13<sup>229</sup>. CYP2C11 je ve významných množstvích obsažen i v potkaním mozku<sup>229</sup>. Naopak CYP2C6 a CYP2C23 jsou rovnoměrně zastoupeny jak u samic, tak u samců<sup>230</sup>. Zatímco CYP2C6 je exprimován v játrech a méně v tenkém střevě potkanů<sup>188</sup>, tak CYP2C23 je ve vysoké koncentraci obsažen v ledvinách. Expres potkaní podrodiny CYP2C může být potlačena podáváním léků proti rakovině jako jsou CPD<sup>231</sup> a cisplatina (CIS)<sup>232</sup>. Látky ovlivňující hladinu TST v krvi, jako je DEX, PB<sup>233</sup> a ethanol snižují expresi potkaního CYP2C11 v játrech<sup>87</sup>.

Podrodina CYP2C u ptáků obsahuje i enzymy původně označované CYP2H1 a CYP2H2<sup>59</sup>, protože při jejich objevu se předpokládalo, že jsou specifické pro podtřídu ptáci, ale později Kubota a kol.<sup>234</sup> prokázali, že se svou sekvencí nejvíce podobají podrodině CYP2C u lidí. Ptáci obecně jsou schopni metabolizovat diklofenak a u kura domácího jsme pozorovali pík odpovídající 4'-hydroxydiklofenaku (4'OHDF), ale podávání tohoto léčiva ptákům, obzvláště masožravým (např. *Gyps bengalensis*), může zvíře usmrtit<sup>235</sup>. PB indukuje ptačí CYP2C45<sup>236</sup>.



Králíci podobně jako potkani metabolizují velké množství substrátů prostřednictvím enzymů podrodiny CYP2C (u lidí je to CYP3A)<sup>74</sup>. Nejvýznamnějším příkladem je 6 $\beta$ -hydroxylace TST, za kterou je u králíků zodpovědný CYP2C3<sup>185</sup>. Králíci podobně jako lidé metabolizují DF na 4'OHDF, enzymem zodpovědným za tuto přeměnu je CYP2C5<sup>237</sup>. Zatímco metabolismus DF na 4'OHDF byl u lidí podáním SULF silně inhibován (60 - 80 %), tak králíci metabolizovali DF pořád stejně<sup>114</sup>.

## 6. Podrodina CYP2D

Potkaní podrodinu CYP2D tvoří enzymy CYP2D1, 2D2, 2D3, 2D4, 2D5 a 2D18<sup>238</sup>. Sekvence DNA jednotlivých zástupců CYP2D u lidí a potkanů je podobná z více než 70 %<sup>239</sup>. Potkaní CYP2D5 a CYP2D1 mají navzájem podobnou aminokyselinovou sekvenci jako CYP2D18 a CYP2D4 a to více než z 95 %<sup>240</sup>. V játrech, ledvinách a mukóze tenkého střeva jsou nejvíce zastoupeny enzymy CYP2D2 a CYP2D3. Naopak CYP2D4 a CYP2D18 jsou navíc přítomny v mozku, nadledvinkách, vaječnicích a varlatech<sup>241</sup>. Celá potkaní podrodina CYP2D je schopna metabolizovat bufuralol na 1'-hydroxybufuralol<sup>241</sup>. Potkaní CYP2D4 metabolizuje MIAN na 8-hydroxy-*N*-desmethylmianserin. MIAN je u podrodiny potkaní CYP2D metabolizován na různé produkty podle převažující isoformy CYP2D<sup>138</sup>. U potkanů stejně jako u lidí není podrodina CYP2D indukována<sup>87</sup>. Specifický inhibitor lidských CYP2D6 QND u potkanů takřka vůbec nesnižoval metabolismus BUF (1'-hydroxylace), specifického substrátu CYP2D6<sup>136</sup>. Naopak isomer chininu (QNN) u potkanů prokázal slabé inhibiční působení na CYP2D<sup>114</sup>.

U slepic je hlavním zástupcem podrodiny CYP2D enzym CYP2D49, který má z 52 - 57 % podobnou sekvenci aminokyselin jako ostatní zástupci podrodiny CYP2D. Metabolizuje BUF na 1'-hydroxybufuralol. Slepíčí CYP2D49 nemetabolizuje debrisochin. Chinon u kuřecího CYP2D49 neprokázal žádné inhibiční účinky<sup>242</sup>.

Podrodina enzymů CYP2D je u králíků tvořena dvěma zástupci CYP2D23 a CYP2D24, kteří metabolizují BUF<sup>243</sup>. Králíci stejně jako lidé metabolizují BUF na 1'-hydroxybufuralol. Při podání QND nebo protilátky proti lidskému CYP2D6 nebyl metabolismus bufuralolu u králíků nijak ovlivněn<sup>114</sup>.

## 7. Podrodina CYP2E

Tuto podrodinu tvoří pouze jediný zástupce a to CYP2E1. Sekvence myší DNA CYP2E1 je z 92 % shodná s potkaní, ze 79 % s lidskou a z 80 % s králíčí<sup>244</sup>. Aktivita

CYP2E1 je u potkanů indukována ethanolem a acetonem<sup>87,109</sup>. Potkani metabolizují prostřednictvím CYP2E1 organická rozpouštědla, APAP a nitrosaminy, z tohoto důvodu jsou potkani dobrým modelem pro studium ovlivnění CYP2E1 u lidí<sup>74</sup>. Experimenty na potkanech také prokázaly, že obezita nebo cukrovka mohou ovlivňovat expresi CYP2E1<sup>245</sup>. DDC je účinný (nekompetitivní) inhibitor metabolismu CLX jak u potkanů, tak u jiných živočišných druhů<sup>246</sup>.

Studie Sinclairové a kol.<sup>247</sup> prokázala, že kuřata jsou schopna stejně jako jiní obratlovci metabolizovat 4NF<sup>145</sup>. Protože byl metabolismus 4NF indukován acetonem<sup>248</sup> a ethanolem<sup>249</sup>, ale nebyl indukován glutethimidem (induktor CYP2D6)<sup>250</sup>, tak bylo prokázáno, že CYP2E1 byl zodpovědný za jeho metabolizaci. Dalším substrátem metabolizovaným CYP2E1 u celé řady živočichů je CLX. Experiment provedený na kačenách<sup>251</sup> prokázal, že minimálně jedna skupina podtřídy ptáci je schopna tento substrát metabolizovat.

U králíků může CYP2E1 metabolizovat anilin<sup>252</sup>, i když dojde k delecii 3 až 29 aminokyselin<sup>253,254</sup>. Podobný jev byl pozorován i u lidí, kde došlo k delecii 21 aminokyselin<sup>255</sup>. CLX je u králíků stejně jako u lidí metabolizován na 6-OHCLX<sup>74</sup>. Induktory králičí CYP2E1 jsou ethanol a PB<sup>256</sup>. Pokud je do reakční směsi přidána protilátka proti potkaní CYP2E1, tak je u králíků metabolismus CLX pouze slabě inhibován<sup>114</sup>.

## 8. Podrodina CYP3A

U potkanů je tato podrodina tvořena enzymy CYP3A1, 3A2, 3A9, 3A18, 3A23 a 3A62<sup>257-261</sup>. Podle srovnání genetické sekvence je CYP3A1 totožná s CYP3A23<sup>262</sup>. Podobně jako enzymy podrodiny CYP2C i enzymy CYP3A jsou rozdílně exprimovány u samců a samic potkanů. CYP3A2<sup>263</sup> a CYP3A18<sup>264</sup> jsou CYP specifické pro samce, zatímco CYP3A9 je více zastoupena u samic<sup>264</sup>. Dalším významným enzymem z podrodiny CYP3A je CYP3A62. Je přítomný v trávicím ústrojí, a je velice podobný lidskému CYP3A4 a potkanímu CYP3A9. CYP3A1 a CYP3A2 byly nalezeny jen v játrech<sup>87</sup>, ale CYP3A9 a CYP3A18 jsou zastoupeny jak v játrech, tak v tenkém střevě<sup>265</sup>. Pro studium metabolismu léčiv lidskými CYP3A nejsou potkani nejvhodnějším zvířecím modelem, protože např. RIF indukuje podrodinu jaterních CYP3A u lidí a u králíků, ale ne u potkanů a kuřat (dokonce i při koncentraci  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )<sup>194,266</sup>. Dalším důkazem nevhodnosti použití potkanů pro studium metabolismu lidských CYP3A je fakt, že jeden ze specifických substrátů lidského CYP3A4 nifedipin (blokátor kalciových kanálů), není

metabolizován potkaním jaterním CYP3A1<sup>267</sup>. Potkani na rozdíl od lidí metabolizují midazolam na 4-hydroxymidazolam<sup>268</sup>. Mezi induktory potkaních CYP3A patří DEX a pregnenolon 16 $\alpha$ -karbonitril (PCN) (oba silné aktivátory PXR)<sup>269</sup>. Rozdíly v indukci CYP3A mezi druhy jsou způsobeny 70 – 75 % odlišnostmi v doméně PXR vázící ligandy, proto je velice obtížné snažit se ze studie na jiném živočišném druhu (např. potkan) předpokládat metabolismus dané látky u člověka<sup>269</sup>. *In vitro* a *in vivo* inhibitorem CYP3A u potkanů je stejně jako u člověka KET<sup>270</sup>.

PB a MET indukují aktivitu kuřecího CYP3A37<sup>266</sup>. Podobně jako u potkanů je i u kuřat substrátem CYP3A ERY a TAO<sup>252</sup>. Kuřata metabolizují rovněž TST (6 $\beta$ -hydroxylace)<sup>266</sup> a MDZ (1'-, 4- hydroxylace)<sup>271</sup>. Sekvence aminokyselin lidského CYP3A4 vykazuje 60% podobnost s kuřecím CYP3A37<sup>266</sup>. KET u kuřat inhiboval 1'-hydroxylaci midazolamu (ovšem při násobné koncentraci než u lidí)<sup>271</sup>.

Podrodina CYP3A je u králíků indukována podáním RIF<sup>272</sup> nebo DEX<sup>273</sup>. U králíků je CYP2C3 hlavním enzymem zodpovědným za 6 $\beta$ -hydroxylaci TST. Přeměna TST na 6 $\beta$ -hydroxytestosteron (6 $\beta$ OHTST) nebyla u králíků podáním protilátky proti potkanímu CYP3A2 nijak ovlivněna<sup>185</sup>. Naopak podání KET<sup>270</sup> způsobilo u králíků, podobně jako u lidí, střední inhibici 6 $\beta$ -hydroxylace TST<sup>114</sup>. Králíci podobně jako lidé metabolizují midazolam na 1'-hydroxymidazolam prostřednictvím enzymů podrodiny CYP3A<sup>274</sup>. Rovněž jsou schopni metabolizovat ERY<sup>275</sup>.

	CYP1A	CYP1B	CYP2A	CYP2B	CYP2C	CYP2D	CYP2E	CYP3A	
člověk	PAU <sup>87</sup> OM <sup>193</sup> TCDD <sup>78</sup>	PCB <sup>81</sup>	PB <sup>95</sup> RIF <sup>94</sup>	PB <sup>106</sup> MEP <sup>109</sup>	PB RIF <sup>276</sup>		ethanol aceton <sup>87,109</sup>	RIF <sup>176</sup> ,DEX <sup>170</sup>	ind
	ETRR <sup>66,67</sup> ,PHEN <sup>72</sup> MROD <sup>208</sup>	E2 <sup>82</sup> PAU <sup>81</sup>	KUM <sup>88</sup> kofein <sup>89</sup>	EFC <sup>104</sup> PROD <sup>103</sup>	DF <sup>119</sup> DIAZ <sup>122</sup> S-WARF <sup>73</sup>	BUF <sup>136</sup> MIAN <sup>138</sup>	CLX <sup>143,144</sup> 4NF <sup>145</sup>	TST <sup>161</sup> ,MDZ <sup>162</sup> ERY <sup>277</sup>	sub
	FUR <sup>195</sup> KET <sup>191</sup> , $\alpha$ NF <sup>68</sup>	$\alpha$ NF <sup>80</sup> ,TMS <sup>85</sup> RESV <sup>84</sup>	DDC <sup>93</sup> TCP,TRM <sup>96</sup>	TEPA <sup>110</sup> 2PMADA <sup>113</sup>	SULF <sup>127,278</sup>	QND <sup>139</sup>		GSD <sup>179</sup> KET <sup>180</sup> TAO <sup>181</sup>	inh
králík	TCDD <sup>78</sup> RIF <sup>279</sup>	$\beta$ NF,3MC <sup>205</sup>		PB <sup>221</sup>			ethanol PB <sup>256</sup>	RIF <sup>272</sup> DEX <sup>273</sup>	ind
	ETRR,PHEN <sup>185</sup> kofein <sup>74</sup> ,TBZ <sup>272</sup>		KUM <sup>212</sup>	EFC <sup>219</sup>	DF <sup>237</sup> TST <sup>185</sup>	BUF <sup>243</sup>	CLX <sup>74</sup> anilin <sup>252</sup>	MDZ <sup>274</sup> ERY <sup>275</sup>	sub
	FUR <sup>200</sup> $\alpha$ NF <sup>114</sup>		PILO <sup>114</sup>	1ABT <sup>280</sup> 2PMADA <sup>113</sup>				KET <sup>114</sup>	inh

**Tabulka 2a: Mezidruhové srovnání induktorů, substrátů a inhibitorů CYP u člověka a králíka obecného.** PAU, polycyklické aromatické uhlovodíky; OM, omeprazol; PCB, polychlorované bifenyly; PB, fenobarbital; RIF, rifampicin; MEP, mefenytoin; HAL, haloperidol; DEX dexametason; ETRR, 7-Ethoxy-*O*-resorufin; PHEN, fenacetin; MROD, 7-Methoxy-*O*-resorufin; E2, 17 $\beta$ -estradiol; KUM, kumarin; EFC, 7-ethoxy-4-(trifluormethyl)kumarin; PROD, 7-Pentoxy-*O*-resorufin; DF, diklofenak; DIAZ, diazepam; BUF, bufuralol; MIAN, mianserin; CLX, chlorzoxazon; TST, testosteron; MDZ, midazolam; ERY, erythromycin; FUR, furafyllin; KET, ketokonazol;  $\alpha$ NF,  $\alpha$ -naftoflavon; TMS, 2,4,3',5'-tetramethoxystilben; RESV, resveratrol; DDC, diethyldithiokarbamat; TCP, tranlylcypromin; TRM, tryptamin; TEPA, *N,N,N'*-triethylen-thiofosforamid; 2PMADA, 2-isopropenyl-2-methyladamantan; SULF, sulfafenazol; QND, chinidin; GSD, gestoden; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; TBZ, thiabendazol;  $\beta$ NF,  $\beta$ -naftoflavon; PILO, pilokarpin; 1ABT, deriváty 1-aminobenzotriazolu; 4NF, 4-nitrofenol.

	CYP1A	CYP1B	CYP2A	CYP2B	CYP2C	CYP2D	CYP2E	CYP3A	
kur	CHX TCDD <sup>281</sup> 3MC <sup>282</sup>				PB <sup>236</sup>			MET PB <sup>266</sup>	ind
	ETRR <sup>196</sup> MROD,URO BROD <sup>197</sup>	ETRR MROD <sup>207</sup>	KUM <sup>211</sup>	PROD BROD <sup>223</sup>	DF <sup>235</sup>	BUF <sup>242</sup>	CLX <sup>251</sup> 4NF <sup>247</sup>	ERY,TAO <sup>252</sup> TST <sup>266</sup>	sub
	NaAsO <sub>2</sub> <sup>283</sup>							KET <sup>271</sup>	inh
potkan	PAU <sup>87</sup>	TCDD <sup>204</sup>	3MC PYR <sup>210</sup>	PB DEX <sup>221</sup>			ethanol aceton <sup>87,109</sup>	PCN <sup>269</sup> DEX <sup>269</sup>	ind
	ETRR <sup>66</sup>	E2 <sup>204</sup> PAU <sup>284</sup>	TST <sup>210</sup>	PROD <sup>217</sup> EFC <sup>219</sup> BUPR <sup>218</sup>	DF <sup>226</sup> DIAZ <sup>225</sup>	BUF <sup>241</sup>	CLX <sup>246</sup>	MDZ <sup>268</sup> ERY,TAO <sup>252</sup>	sub
	FUR <sup>195</sup>		TAM <sup>285</sup>	3PMDIA <sup>113</sup> 2PMADA <sup>113</sup>	CIS <sup>232</sup> CPD <sup>231,286</sup>	QNN <sup>114</sup>	DDC <sup>287</sup>	KET <sup>270</sup>	inh

**Tabulka 2b: Mezidruhové srovnání induktorů, substrátů a inhibitorů CYP u potkanů a kura domácího.** 3MC, 3-methylcholantren; CHX, cyklohexidin; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; PB, fenobarbital; MET, metyrapon; ETRR, 7-Ethoxy-*O*-resorufin; BROD, 7-Benzyloxy-*O*-resorufin; MROD, 7-Methoxy-*O*-resorufin; URO, uroporfyrinogen; KUM, kumarin; PROD, 7-Pentoxy-*O*-resorufin; DF, diklofenak; 3OHDZ, 3-hydroxydiazepam; BUF, bufuralol; CLX, chlorzoxazon; 4NF, 4-nitrofenol; ERY, erythromycin; TAO, triacetyloleandomycin; TST, testosteron; KET, ketokonazol; PAU, polycyklické aromatické uhlovodíky; PYR, pyrazol; DEX, dexametason; QNN, chinin; PCN, pregnenolon 16 $\alpha$ -karbonitril; E2, 17 $\beta$ -estradiol; EFC, 7-ethoxy-4-(trifluormethyl)kumarin; BUPR, bupropion; DIAZ, diazepam; MDZ, midazolam; FUR, furafyllin; CPD, cyklofosfamid; TAM, tamoxifen; 3PMDIA, 3-isopropenyl-3-methyladamantan; 2PMADA, 2-isopropenyl-2-methyladamantan; CIS, cisplatina; DDC, diethyldithiokarbamat.

### 3) Cíle práce

Cílem předkládané disertační práce bylo stanovit, jestli příjem potravy bohaté na anthokyany obsažené v barevných pšenících nebo borůvkovém extraktu ovlivní faktory oxidačního stresu, aktivity a expresi vybraných enzymů CYP u potkana, králíka nebo kura domácího. Stanovení vlivu podávání dvou rozdílných koncentrací anthokyanů, lišících se desetinásobně, potkanům bylo rovněž součástí jedné z provedených studií.

#### Experimenty *in vivo*

##### a) Podávání barevných pšenic UC66049 a Skorpion samecům potkana

vliv konzumace pelet připravených z pšenic Bohemia (kontrola), Skorpion nebo UC66049, bohatých na anthokyany, na parametry oxidačního stresu v plazmě a erytrocytech, aktivity a expresi mRNA CYP v jaterní mikrosomální frakci potkanů

##### b) Podávání borůvkového nápoje (*Vaccinium myrtillus* L.) samecům potkana

vliv konzumace extraktu z borůvky o koncentraci  $0,15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  nebo  $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  na parametry oxidačního stresu v plazmě a erytrocytech, aktivity a expresi mRNA CYP v jaterní mikrosomální frakci potkanů

##### c) Podávání barevné pšenice Karkulka samicím králíka

vliv konzumace pelet připravených z pšenic Vanessa (kontrola) nebo Karkulka, bohatá na anthokyany, na parametry oxidačního stresu v plazmě a v erytrocytech a aktivity CYP v jaterní mikrosomální frakci samic králíka

##### d) Podávání barevné pšenice Arasajta RU 687-12 slepicím

vliv konzumace pelet připravených z pšenic Bohemia (kontrola) nebo Arasajta RU 687-12, bohatá na anthokyany, na celkovou antioxidační kapacitu plazmy, aktivity, expresi mRNA a proteinů CYP v jaterní mikrosomální frakci nosnic

## 4) Experimentální část

### a) Použité chemikálie

Redukovaný glutathion (GSH), oxidovaný glutathion (GSSG), bufuralol (BUF), kumarin (KUM), testosteron (TST), midazolam (MDZ), diazepam (DIAZ), diklofenak (DF), warfarin (WARF), nikotinamidadenindinukleotid fosfát (NADP<sup>+</sup>), redukovaný nikotinamidadenindinukleotid fosfát (NADPH + H<sup>+</sup>), redukovaný nikotinamidadenindinukleotid (NADH), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), trisodná sůl kyseliny isocitronové (ISO), isocitrátdehydrogenasa (IDH), 7-hydroxy-4-(trifluormethyl)kumarin (HFC) a EFC byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, ČR.

Ethoxyresorufin (ETRR), resorufin, 7-hydroxykumarin, 4'-hydroxydiklofenak (4'OHDF), luminiscenční látka Western Blotting Luminol Reagent a sekundární protilátky konjugované s křenuvou peroxidázou byly zakoupeny od Santa Cruz Biotechnology, Německo.

6-hydroxychlorzoxazon (6-OHCLX) a 4-hydroxymidazolam byly zakoupeny od firmy Toronto Research Chemicals, Kanada.

Paracetamol (APAP) byl zakoupen od firmy Fagron a.s., ČR.

Coomassie Brilliant Blue G-250 byl zakoupen od firmy Serva, Německo.

N-desmethyldiazepam (DMD) a 3-hydroxydiazepam (3OHDZ) byl zakoupen od firmy Lipomed, Německo.

1'-hydroxymidazolam byl zakoupen od firmy Cayman Chemical, ČR.

Všechny další chemikálie použité v experimentech popsáných v této práci byly minimálně čistoty pro analytická měření.

### b) Přístroje

Ultracentrifuga *Optima 8000 XPN* (Beckman Coulter, ČR)

Chlazená centrifuga *Mikro 22R* (Hettich Zentrifugen, ČR)

Chlazená centrifuga *Rotina 38R* (Hettich Zentrifugen, ČR)

Centrifugy *MiniSpin<sup>®</sup> Plus* (Eppendorf, ČR)

Multifunkční modulární reader *Infinite M200 pro* (Tecan, ČR)

UV/VIS spektrofotometr *UV-2401PC* (Shimadzu, ČR)

Personální vortex *V-1 plus* (BioTech, ČR)

Termomixer *Comfort* (Eppendorf, ČR)

pH metr *inoLab Level 1* (Schoeller Instruments, ČR)

Elektroda *SenTix41* (WTW, ČR)  
Váhy *AX105 Delta Range*<sup>®</sup> (Mettler Toledo, ČR)  
HPLC *Prominence* (Shimadzu, ČR)  
Kolona *LiChrospher*<sup>®</sup> *RP-18, 250-4 (5 μm)* (Merck, ČR)  
Kolona *Kinetex*<sup>®</sup> *F5 (2,6 μm) 100 Å* (Phenomenex, ČR)  
Turbo Thermo Shaker *TMS-200* (Labmark, ČR)  
Spektrofotometr *NanoPhotometer*<sup>®</sup> *C40* (Implen, ČR)  
Homogenizátor *Ultra-Turrax T 25 basic* (IKA-Werke, Německo)  
Homogenizátor *Precellys Evolution* (Bertin instruments, ČR)  
Laminární box pro RT-PCR *Topsafe 1.8* (BioAir Instruments, ČR)  
Real-time PCR termocyklér *LightCycler 480* (Roche, ČR)  
Filtreační aparatura *SolVac*<sup>®</sup> *Filter Holder* (Pall, USA)  
Zařízení pro přenos proteinů *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad, ČR)

#### c) Použitá zvířata

Potkani *Wistar* (Chovné a uživatelské zařízení laboratorních zvířat, ČR)  
Potkani *Wistar* (AnLab s.r.o, ČR)  
Králice *HYLA* (Kočárovi králíci, ČR)  
Slepice *Bowans Brown* (Výkrm Třebíč s.r.o., ČR)

#### d) Krmiva a složky stravy

Potkaní granule *Biokron Blučina* (Biokron s.r.o., ČR)  
Borůvkový extrakt (*Walmark*, ČR)  
Barevná pšenice *Skorpion* (sklizeň 2016)  
Barevná pšenice *UC66049* (sklizeň 2016)  
Barevná pšenice *PS Karkulka* (sklizeň 2016)  
Barevná pšenice *Arasajta RU 687-12* (sklizeň 2015)  
Kontrolní pšenice *Vanessa* (sklizeň 2016)  
Kontrolní pšenice *Vánek* (sklizeň 2016)  
Kontrolní pšenice *Bohemia* (sklizeň 2015)  
Všechny výše uvedené pšenice pocházely od Agrotest Fyto s.r.o., ČR.



### e) Ostatní materiál

světlocitlivý film *Carestream Kodak BioMax light*, fotografická vývojka a ustalovač *Kodak GBX* (Eastman Kodak, USA)

světlocitlivý film *Fuji medical x-ray* (FujiFilm, Japonsko)

plastové mikroskopické skúmavky (Eppendorf, ČR)

membránové filtry 0,45  $\mu\text{m}$ , průměr 47 mm, polypropylen (Pall, ČR)

injekční stříkačka plastová (Braun, ČR)

injekční jehla (IBS Stock Items, ČR)

Sada pro izolaci a přečištění celkové RNA *RNeasy Plus Mini kit* (Quiagen, ČR)

### f) Metody

#### *I. Průběh in vivo experimentu*

##### *a) Vliv konzumace barevných pšenic UC66049 a Skorpion na potkaní jaterní CYP a faktory oxidačního stresu*

Samci potkana kmene *Wistar* (30 zvířat) o hmotnosti  $194,6 \pm 21,4$  g (Chovné a užitelské zařízení laboratorních zvířat, ČR) byli krmeni po dobu 9 denní aklimatizace komerčními granulami pro potkany Biokron Blučina (Biokron s.r.o., ČR). První skupina byla krmena peletami připravenými z kontrolní pšenice Bohemia (sklizeň 2015), která neobsahovala žádné anthokyany. Druhá skupina byla krmena peletami obsahujícími barevnou pšenici UC66049 (sklizeň 2016). Třetí skupina byla krmena peletami obsahujícími barevnou pšenici Skorpion (sklizeň 2016). V každé skupině bylo 10 potkanů. Obsah dusíku v jednotlivých pšenicích byl doplněn lepkem. Po celou dobu 72 denního experimentu měli potkani volný přístup k pšeničným peletám a vodě. Po ukončení experimentu byli potkani uvedeni do celkové anestézie a usmrceni. Vzorky krve byly zpracovány na plazmu a erytrocyty. Odebraná játra byla zamrazena v kapalném dusíku a uložena v mrazicím boxu na  $-80$  °C.

##### *b) Vliv konzumace borůvkového nápoje na potkaní jaterní CYP a faktory oxidačního stresu*

Samci potkana kmene *Wistar* (36 zvířat) vážící  $212,5 \pm 12,5$  g (AnLab, ČR) byli po uplynutí 7 dní potřebných pro jejich aklimatizaci rozděleni do 6 skupin po šesti potkanech. První tři skupiny byly zařazeny do experimentu trvajícího 29 dní. Další tři skupiny pokračovaly ve stejném experimentu do 58. dne. Kontrolní skupina byla krmena standardní

dietou a napájena pitnou vodou podle libosti. Skupiny označené jako 0,15 nebo 1,5 byly napájeny nápojem připraveným rozpuštěním borůvkového extraktu v pitné vodě o výsledné koncentraci  $0,15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  nebo  $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  po dobu 29 dní (první tři skupiny) nebo 58 dní (zbytek experimentálních zvířat). Potkani dostávali denně nové krmivo a čerstvě připravený borůvkový nápoj, aby se předešlo možnému kolísání obsahu anthokyanů přítomných v připraveném borůvkovém nápoji. Denně byl sledován zdravotní stav, chování, vzhled a konzistence výkalů, spotřeba krmiva a nápoje podávaného potkanům. Po 29 popřípadě 58 dnech byli potkani zváženi, uvedeni do celkové anestézie a usmrceni. Odebraná krev byla zpracována na plazmu a erytrocyty, které se dále použily pro měření faktorů oxidačního stresu. Potkaní játra byla zamražena v kapalném dusíku a ihned přesunuta do mrazicího boxu na  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

*c) Vliv konzumace barevné pšenice Karkulka na králičí jaterní CYP a faktory oxidačního stresu*

Experiment byl proveden na 18 samicích králíka HYLA, zakoupených na farmě pana Kočára (Kočárovi králíci, ČR), vážících od  $1\,445,5 \pm 215,5 \text{ g}$ . Po 7 denní aklimatizaci byly samice králíka rozděleny podle hmotnosti rovnoměrně do dvou skupin, kdy každá skupina obsahovala 9 zvířat. Králičí samice staré 41 dní byly krmeny po dobu 62 dní peletami tvořenými z 15 % (w/w) barevnou pšenicí Karkulka (sklizeň 2016) nebo kontrolní pšenicí Vanessa (sklizeň 2016). Experimentální zvířata mohla konzumovat pšeničné pelety a pitnou vodu dle libosti. Králice byly po 62 dnech usmrceny jateční střelou do hlavy. Krev byla odebrána z krční tepny a zpracována do dvou hodin na plazmu a erytrocyty. Játra byla prudce zamražena v kapalném dusíku a přesunuta do mrazicího boxu na  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

*d) Vliv konzumace barevné pšenice RU 687-12 na slepičí jaterní CYP*

Do experimentu bylo zařazeno 30 nosnic plemene *Bovans Brown* (Výkrm Třebíč s.r.o., ČR) starých 69 týdnů. Nosnice byly rovnoměrně rozděleny do dvou skupin. První skupině byla podávána krmná směs tvořená z 60 % (w/w) pšenicí s vyšším obsahem anthokyanů RU 687-12 (sklizeň 2015). Krmná směs podávaná kontrolní skupině měla téměř totožné složení. Jediným rozdílem bylo nahrazení pšenice RU 687-12 za pšenicí Bohemia (sklizeň 2015) s velmi nízkou koncentrací anthokyanů. Diety byly sestaveny tak, aby obě poskytovaly experimentálním zvířatům stejné množství energie i dusíku. Nosnice byly po 9 týdnech (ve věku 78 týdnů) utraceny dekapitací. Odebraná játra byla prudce

zmražena v kapalném dusíku a následně uložena v mrazicím boxu na -80 °C. Vzorky krve byly odebrány a do dvou hodin zpracovány na plazmu, která byla uložena v mrazicím boxu na -80 °C.

## II. Příprava mikrosomální subcelulární frakce

Játra každého zvířete/zvířat byla použita k přípravě mikrosomální frakce. Játra byla zhomogenizována v homogenizačním roztoku (0,25 M sacharóza; 1 mmol · l<sup>-1</sup> kyselina ethylendiamintetraoctová, EDTA; pH 7,4) s použitím homogenizátoru *Ultra-Turrax T 25 basic* (IKA-Werke, Německo). Jednotlivé subcelulární frakce byly odseparovány použitím různých rychlostí centrifugace jaterního homogenátu<sup>288</sup>. Takto připravené mikrosomy byly rozděleny na alikvoty a zamraženy na -80 °C. Mikrosomální frakce byla charakterizována stanovením koncentrace proteinů a cytochromů P450.

Stanovení koncentrace CYP byla provedena metodou publikovanou Omurou a Satem<sup>289</sup>. Mikrosomy byly zředěny fosfátovým pufrům o pH 7,4, po přidání dithioničitanu sodného (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, silné redukční činidlo) byly rozděleny na dva stejné alikvoty do křemenných kyvet. Tyto kyvety byly i s roztoky mikrosomů umístěny do UV/VIS spektrofotometru. Hodnota jejich absorbance byla nastavena jako základní linie. Jedna kyveta byla probublána CO, který se váže na zredukované CYP. Absorbance při 500 a 450 nm byly použity pro stanovení koncentrace CYP připravených mikrosomů podle rovnice:

$$c(CYP) = \frac{A(450) - A(500)}{0,091} \quad [\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}] \quad (1)$$

, kde  $A(450)$  je absorbance při vlnové délce 450 nm a  $A(500)$  je absorbance při vlnové délce 500 nm.

Stanovení koncentrace proteinů v připravených mikrosomech bylo provedeno metodou s využitím kyseliny bicinchoninové (BCA)<sup>290</sup>. Měďné ionty spolu s BCA vytvoří v zásaditém prostředí fialový komplex, jehož absorbance byla změřena při 562 nm pomocí 96-jamkového spektrofotometru.

### *III. Příprava plazmy a erytrocytů z odebrané krve*

Odebraná krev byla celkem 3× centrifugována v centrifuze vychlazené na 4 °C při 1 125 × g po dobu 10 minut. Po první centrifugaci byla odebrána plazma. Před druhou centrifugací byly erytrocyty ve zkumavce promyty 4 ml fyziologického roztoku (F 1/1). Po druhé centrifugaci byl supernatant odstraněn a erytrocyty byly opět promyty stejným objemem F 1/1. Po třetí centrifugaci a odsátí F 1/1 byly promyté erytrocyty zamraženy v marazicím boxu na -80 °C.

### *IV. Stanovení faktorů oxidačního stresu*

Pro stanovení oxidačního stresu byly měřeny tyto parametry: celková antioxidační kapacita plazmy (FRAP), TBARS, GSH (redukovaný glutathion), SOD, GST, GPx (glutathion peroxidasa), GSR (glutathion reductasa).

V plazmě byly stanoveny hladiny TBARS a -SH (thiolové) skupiny. Změřené hodnoty byly vztaženy na koncentraci proteinu. Ve vzorcích plazmy byla také stanovena přítomnost hemoglobinu<sup>291</sup> s cílem ověřit, zda nedošlo k hemolýze vzorku.

V erytrocytech byly stanoveny hladiny GSH a TBARS a aktivity enzymů GST, GSR, SOD, GPx. Získané hodnoty byly vztaženy na koncentraci přítomného hemoglobinu.

Měření bylo naplánováno tak, aby byly všechny parametry u jednotlivých vzorků změřeny v průběhu jednoho dne. Všechny výše uvedené vzorky musí být před přidáním do reakční směsi uchovávány na ledu nebo v chladičích bločcích.

### *Stanovení malondialdehydu*

Malondialdehyd vzniklý právě peroxidací polynenasycených mastných kyselin reaguje s TBARS za vzniku oranžovo-červeného zbarvení, metoda dle Buega a Austa<sup>43</sup>. Směs thiobarbiturové kyseliny (0,47%, w/v) a trichloroctové kyseliny (15%, w/v) byla promíchána se vzorky plazmy/erytrocytů a rozdělena na tři stejné alikvoty. Dva z nich byly zahřáty po dobu 30 minut na 95 °C. Následně byly vzorky ochlazeny a centrifugovány (1 100 × g, 10 min, 4 °C). Absorbance supernatantu byla měřena při 535 nm na multifunkčním readeru. Peroxidace lipidů byla vyjádřena jako relativní hodnota skupiny přijímající anthokyany vztažená na kontrolní skupinu v %.

### *Stanovení thiolových skupin*

Stanovení -SH skupin bylo provedeno podle Ellmana<sup>292</sup>. Vzorky plazmy jsou smíseny s methanolem a DTNB nebo s puftrem 0,8 M Tris s 20 mmol · l<sup>-1</sup> EDTA a pH 8,9. Vzorky byly promíchány pomocí vortexu a centrifugovány (3 000 × g, 10 min, 25 °C). Intenzita žlutého zbarvení odpovídala množství přítomných -SH skupin. Absorbance supernatantu v mikrotitračních destičkách byla změřena při 412 nm na multifunkčním readeru. Stanovení -SH skupin bylo vyjádřeno jako relativní hodnota skupiny přijímající anthokyany vztažená na kontrolní skupinu v %.

### *Stanovení hemoglobinu*

Stanovení erytrocytů bylo provedeno podle Drabkina<sup>291</sup>. Vzorek 10× nebo 100× zředěných erytrocytů byl smísen s Drabkinovým činidlem a po 10 minutách byla změřena absorbance při 540 nm na multifunkčním readeru. Výsledky byly použity k přepočtu oxidačních parametrů stanovených v erytrocytech na 1 g hemoglobinu před jejich vztažením na kontrolní skupinu v %. K jejich výpočtu byl použit vzorec:

$$c(Hb) = \frac{A(540)}{44} * \text{ředění} * \text{exp. konst.} \quad [g \cdot l^{-1}] \quad (2)$$

, kde A(540) je absorbance směsi erytrocytů s Drabkinovým činidlem při 540 nm, exp. konst. je experimentální konstanta (68 g · l<sup>-1</sup>).

### *Stanovení proteinů dle Bradfordové*

Vzorky plazmy byly promíchány na vortexu s důkazovým činidlem a srovnány s kalibrační řadou připravenou z hovězího sérového albuminu (BSA) v rozsahu 0 až 1 mg/ml. Absorbance proteinů s brilantovou modří (Coomassie Brilliant Blue G-250) byla měřena po 5 minutách při 595 nm na multifunkčním readeru<sup>293</sup>. Výsledek byl použit k přepočítání parametrů oxidačního stresu stanovených v plazmě na 1 g proteinu před jejich vztažením na kontrolní skupinu v %.

### *Stanovení redukovaného glutathionu*

Stanovení bylo provedeno podle metody Ellamna a kol.<sup>292</sup> modifikované Sedlakem a Lindsym<sup>294</sup>. Hladina GSH byla měřena v erytrocytech. Pro vysrážení erytrocytů byla použita 25% (v/v) trichloroctová kyselina (TCA). Po promíchání na vortexu a centrifugaci

( $8\ 000 \times g$ , 15 min,  $4\ ^\circ\text{C}$ ), byl supernatant smísen s pufrem použitým pro stanovení -SH skupin a s DTNB. Absorbance byla změřena na multifunkčním readeru po 4 minutách při 412 nm. Výsledek byl vyjádřen jako relativní hodnota skupiny přijímající anthokyaniny vztážená na kontrolní skupinu v %.

#### *Stanovení glutathion-S-transferasy*

Měření bylo provedeno podle metody Habig a kol.<sup>295</sup>. Vzorek erytrocytů byl smísen s  $20\ \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  GSH, pufrem ( $0,1\ \text{M}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$  o pH 6,5) a  $20\ \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  1-chloro-2,4-dinitrobenzenem (CDNB), který sloužil jako substrát. Ihned po spuštění enzymové reakce přidavkem CDNB byla změřena absorbance reakční směsi při 340 nm na multifunkčním readeru. Enzymová aktivita GST byla vyjádřena jako relativní hodnota skupiny přijímající anthokyaniny vztážená na kontrolní skupinu v %.

#### *Stanovení superoxiddismutasy*

Aktivita SOD v erytrocytech byla změřena podle metody Ewinga a Janera<sup>42</sup>. Pro toto měření byl použit pufr ( $0,1\ \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  EDTA,  $50\ \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,4). Směs redukovaného nikotinamidadeninukleotidu (NADH) a fenazinu methosulfátu (PMS) spolu s 2,2'-bis(4-nitrofenyl)-5,5'-difenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-difenylen)ditetrazolium chloridem (NBT) tvoří superoxid ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Vzniklý  $\text{O}_2^{\cdot-}$  byl ve vzorcích erytrocytů nepřímo detekován na multifunkčním readeru po 5 minutách při 560 nm. Enzymová aktivita SOD byla vyjádřena jako relativní hodnota skupiny přijímající anthokyaniny vztážená na kontrolu v %.

#### *Stanovení glutathionreduktasy*

Stanovení aktivity GSR bylo provedeno v erytrocytech podle postupu Carlberga a Mannervika<sup>296</sup>. Vzorek byl smísen s  $20\ \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  GSSG v pufru ( $0,2\ \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $2\ \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  EDTA; pH 7,0) a reakce byla iniciována přidavkem  $2\ \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  nikotinamidadeninukleotidu fosfátu ( $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ). Ihned po iniciaci reakce byla aktivita stanovena měřením absorbance při 340 nm na multifunkčním readeru.

#### *Stanovení glutathionperoxidasy*

Stanovení aktivity GPx v erytrocytech bylo provedeno podle Tappela<sup>297</sup>. V tomto experimentu byl použit pufr ( $50\ \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  Tris,  $0,1\ \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  EDTA; pH 7,6). Reakční

směs obsahovala vzorek a GSH ( $0,39 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), NADPH + H<sup>+</sup> ( $0,19 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), GSR (1,55 U/ml) v konečné koncentraci. Aktivita GPx byla stanovena měřením absorbance při 340 nm na multifunkčním readeru.

#### *V. Stanovení aktivit CYP*

Pro stanovení většiny aktivit byla použita metodika popsaná v Cytochrome P450 protocols<sup>208</sup> s drobnými modifikacemi. Pokud není uvedeno jinak, tak všechna stanovení aktivit CYP byla provedena třikrát ve třech opakováních. Všechny níže uvedené aktivity byly měřeny na přístroji HPLC *Prominence*, kde byla pro stanovení použita kolona *LiChrospher*<sup>®</sup> *RP-18, 250-4* ( $5 \mu\text{m}$ ). Jedinou výjimku tvoří stanovení aktivity CYP2A1, metabolit 7 $\alpha$ -hydroxytestosteron (7 $\alpha$ OHTST), u potkanů podle Dovrtělové a kol.<sup>298</sup>, kde byla použita kolona *Kinetex*<sup>®</sup> *F5* ( $2,6 \mu\text{m}$ )  $100 \text{ \AA}$ .

CYP	Substrát	Metabolit	Složení mobilní fáze	HPLC detekce		Nástřik vzorku (μl)	Průtok m. fáze (ml/min)
				UV (nm)	Fluoresc. Ex/Em (nm)		
1A1/2	ETRR	resorufin	58 % K/PO <sub>4</sub> pH 7 (25 mmol · l <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 25 mmol · l <sup>-1</sup> KOH) + 42 % MeOH		535/585	50	0,9
1A2	PHEN	APAP	MF A: 20 % MeOH + 80 % ddH <sub>2</sub> O pH 2,9 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) MF B: 100 % MeOH <sup>#</sup>	258		50	1
2A6	KUM	7OHKUM	60 % 0,5% CH <sub>3</sub> COOH + 40 % ACN		338/458	5	1
2B6	EFC	HFM	46 % 20 mmol · l <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,5) + 54 % MeOH		410/510	15	1,2
2C9	WARF	7OHWARF	52 % 10 mmol · l <sup>-1</sup> K/PO <sub>4</sub> pH 3 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) + 32 % MeOH + 16 % ACN		320/415	50	1
2C9	DF	4'OHDF	MF A: 30% ACN + 70 % 2 mmol · l <sup>-1</sup> HClO <sub>4</sub>	280		50	1
		5OHDF	MF B: 100 % MeOH*	280		50	1
2C19	DIAZ	DMD	55 % 50 mmol · l <sup>-1</sup> K/PO <sub>4</sub> pH 2,4 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) +	236		50	1
3A4	DIAZ	3OHDZ	45 % ACN	236		50	1
2D6	BUF	1'OHBUF	MF A: 30 % ACN + 70 % 2 mmol · l <sup>-1</sup> HClO <sub>4</sub> MF B: 100 % ACN <sup>&amp;</sup>		252/302	5	1,5
2E1	CLX	6OHCLX	75 % 0,5% CH <sub>3</sub> COOH + 25 % ACN	287		50	1
3A4	MDZ	1'OHMDZ	64 % 10 mmol · l <sup>-1</sup> CH <sub>3</sub> COONa (pH 4,7)/36 % ACN	220		50	1
3A4	TST	6βOHTST	MF A: 1 % ACN + 59 % ddH <sub>2</sub> O + 40 % MeOH	245		45	0,8
2A1 <sup>potkan</sup>	TST	7αOHTST	MF B: 1 % ACN + 48 % ddH <sub>2</sub> O + 51 % MeOH <sup>§</sup>	245		45	0,8
3A4	TST	6βOHTST	64 % MeOH + 36 % ddH <sub>2</sub> O	245		50	1

<sup>#</sup>MF B: 0 – 7 min 0 %; 8 – 10 min 100 %; 12 – 22 min 0 %

<sup>\*</sup>MF B: 0 – 7 min 20 %; 7 – 15 min 40 %; 15 – 15,5 min 90 %; 15,5 – 19 min 100 %; 19 – 23 min 20 %

<sup>&</sup>MF B: 0 – 5 min 0 %; 5,5 – 8 min 100 %; 8,5 – 15 min 0 %

<sup>§</sup>MF B: 0 – 12 min 0 %; 17,5 – 25 min 100 % – 0 %; 25 – 30 min 0 %

**Tabulka 3: Stanovení aktivit CYP pomocí HPLC.** ETRR, 7-Ethoxy-*O*-resorufin; PHEN, fenacetin; APAP, paracetamol; KUM, kumarin; OH, hydroxy; EFC, 7-ethoxy-4-(trifluormethyl)kumarin; HFC, 7-hydroxy-4-(trifluormethyl)kumarin; WARF, warfarin; DF, diklofenak; DIAZ, diazepam; DMD, *N*-desmethyldiazepam; BUF, bufuralol; CLX, chlorzoxazon; MDZ, midazolam; TST, testosteron; MeOH, methanol; ACN, acetonitril; ddH<sub>2</sub>O, destilovaná deionizovaná voda; Fluoresc., fluorescence; Ex, vlnová délka excitace; Em, vlnová délka emise. Většina metod stanovení aktivit CYP byla převzata z Cytochrome P450 protocols<sup>208</sup>.



### 1. Stanovení aktivity CYP1A1/2 – substrát ethoxyresorufin

Substrát ETRR je u potkanů metabolizován stejně jako u lidí CYP1A1 a CYP1A2<sup>58,66</sup>. U králíků je metabolizován pouze CYP1A2<sup>272</sup>. U slepic je metabolizován hlavně CYP1A4<sup>299,300</sup>. Stanovení aktivity CYP1A1/2 bylo provedeno podle tabulky 4.

Komponenty	Objem [ $\mu$ l]
Pufr K/PO <sub>4</sub> pH 7,4	25
Mikrosomy (35 pmol)	20
ETRR (0,01 mmol · l <sup>-1</sup> )	26
Preinkubace 5 minut při 37 °C	
NADPH + H <sup>+</sup> G. S.	29
Inkubace 15 minut při 37 °C	
100% Methanol	200

**Tabulka 4: Měření aktivity CYP1A1/2.** Specifický substrát pro CYP1A1/2 je ETRR, obsah organických rozpouštědel v reakční směsi 0,125 % (v/v), připravený 100 mmol · l<sup>-1</sup> pufr K/PO<sub>4</sub>, pH upraveno KOH; ETRR, 7-Ethoxy-*O*-resorufin; G. S., generující systém.

Konečná koncentrace jednotlivých složek NADPH + H<sup>+</sup> G. S. a substrátu v reakční směsi:

NADP <sup>+</sup>	0,8	mmol · l <sup>-1</sup>
ISO	6	mmol · l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	8	mmol · l <sup>-1</sup>
IDH	0,3	U/ml
ETRR	0,001	mmol · l <sup>-1</sup>

Po zastavení reakce (100% methanol) byl vzorek centrifugován (22 000 × g, 10 min, 4 °C) v chlazené centrifuzě. Metabolit resorufin byl detekován pomocí HPLC s fluorescenční detekcí (Tabulka 3).

## 2. Stanovení aktivity CYP1A1/2 – substrát fenacetin

Substrát PHEN je u potkanů podobně jako u lidí metabolizován CYP1A1<sup>58,301</sup> a CYP1A2<sup>58,302</sup>. Králíci metabolizují PHEN převážně CYP1A1, avšak CYP1A2 se na jeho přeměně rovněž podílí<sup>303</sup>. Enzymová reakce byla provedena podle tabulky 5.

Komponenty	Objem [ $\mu$ l]
Pufr K/PO <sub>4</sub> pH 7,4	129
Mikrosomy (70 pmol)	10
PHEN (1,67 mmol · l <sup>-1</sup> )	3
Preinkubace 5 minut při 37 °C	
NADPH + H <sup>+</sup> G. S.	58
Inkubace 20 minut při 37 °C	
70% HClO <sub>4</sub>	10

**Tabulka 5: Měření aktivity CYP1A2.** Specifický substrát pro CYP1A2 je PHEN, obsah organických rozpouštědel v reakční směsi 0 % (v/v), připravený 100 mmol · l<sup>-1</sup> pufr K/PO<sub>4</sub>, pH upraveno KOH; PHEN, fenacetin; G. S., generující systém.

Konečná koncentrace jednotlivých složek NADPH + H<sup>+</sup> G. S. a substrátu v reakční směsi:

NADP <sup>+</sup>	0,8	mmol · l <sup>-1</sup>
ISO	6	mmol · l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	8	mmol · l <sup>-1</sup>
IDH	0,3	U/ml
PHEN	0,025	mmol · l <sup>-1</sup>

Reakce byla zastavena přidávkem 70% HClO<sub>4</sub> do reakční směsi. Vzorek byl centrifugován (22 000 × g, 10 min, 4 °C) v chlazené centrifuze. Metabolit (APAP) byl stanoven pomocí HPLC s UV/VIS detekcí podle tabulky 3.

### 3. Stanovení aktivity CYP2A6

U potkanů je KUM metabolizován prostřednictvím CYP2A1, CYP2A3 na 7-hydroxykumarin ve velmi malém množství<sup>114</sup>. U králíků (CYP2A10, CYP2A11)<sup>212</sup> a slepic<sup>304</sup>, stejně jako u lidí<sup>88,305</sup>, podléhá tento substrát nejvíce 7-hydroxylaci prostřednictvím podrodiny CYP2A. Provedení reakce podle tabulky 6.

Komponenty	Objem [ $\mu$ l]
Pufr K/PO <sub>4</sub> pH 7,4	25
Mikrosomy (35 pmol)	21
KUM (0,025 mmol · l <sup>-1</sup> )	25
Preinkubace 5 minut při 37 °C	
NADPH + H <sup>+</sup> G. S.	29
Inkubace 30 minut při 37 °C	
100% methanol	200

**Tabulka 6: Měření aktivity CYP2A6.** Specifický substrát pro CYP2A6 je KUM, obsah organických rozpouštědel v reakční směsi 0 % (v/v), připravený 100 mmol · l<sup>-1</sup> pufr K/PO<sub>4</sub>, pH upraveno KOH; KUM, kumarin; G. S., generující systém.

Konečná koncentrace jednotlivých složek NADPH + H<sup>+</sup> G. S. a substrátu v reakční směsi:

NADP <sup>+</sup>	0,8	mmol · l <sup>-1</sup>
ISO	6	mmol · l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	8	mmol · l <sup>-1</sup>
IDH	0,3	U/ml
KUM	0,00625	mmol · l <sup>-1</sup>

Po zastavení reakce 100% methanolem byl vzorek centrifugován (22 000 × g, 10 min, 4 °C) v chlazené centrifuze a následně bylo stanoveno množství 7-hydroxykumarinu pomocí HPLC s fluorescenční detekcí nastaveného podle tabulky 3.

#### 4. Stanovení aktivity CYP2B6

Lidský CYP2B6, potkaní CYP2B1<sup>219,306</sup> a králičí CYP2B4<sup>306</sup> přeměňují EFC na HFC. Reakce byla provedena podle tabulky 7.

Komponenty	Objem [ $\mu$ l]
Pufr K/PO <sub>4</sub> pH 7,4	26
Mikrosomy (35 pmol)	20
EFC (0,06 mmol · l <sup>-1</sup> )	25
Preinkubace 5 minut při 37 °C	
NADPH + H <sup>+</sup> G. S.	29
Inkubace 15 minut při 37 °C	
100% methanol	200

**Tabulka 7: Měření aktivity CYP2B6.** Specifický substrát pro CYP2B6 je EFC, obsah organických rozpouštědel v reakční směsi méně než 0,1 % (v/v), připravený 100 mmol · l<sup>-1</sup> pufr K/PO<sub>4</sub>, pH upraveno KOH; EFC, 7-ethoxy-4-(trifluormethyl)kumarin; G. S., generující systém.

Konečná koncentrace jednotlivých složek NADPH + H<sup>+</sup> G. S. a substrátu v reakční směsi:

NADP <sup>+</sup>	0,8 mmol · l <sup>-1</sup>
ISO	6 mmol · l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	8 mmol · l <sup>-1</sup>
IDH	0,3 U/ml
EFC	0,015 mmol · l <sup>-1</sup>

Po zastavení reakce byl vzorek centrifugován (22 000 × g, 10 min, 4 °C) v chlazené centrifuze a množství 7-hydroxy-4-(trifluormethyl)kumarinu bylo stanoveno pomocí HPLC s fluorescenční detekcí podle tabulky 3.

### 5. Stanovení aktivity CYP2C9

a) Pro stanovení aktivity CYP2C9 byla použita racemická směs dvou enantiomerů R- a S- forem WARF. Oba enantiomery WARF jsou metabolizovány různými CYP za vzniku metabolitů 4', 6, 7, 8 a 10-hydroxywarfarinů, z nichž hlavní je 7-hydroxywarfarin (7OHWARF)<sup>158</sup>. Tento metabolit vzniká u lidí za účasti enzymu CYP2C9. Substrát WARF je u potkanů metabolizován CYP2C6 na 7OHWARF<sup>232</sup>. Reakční směs pro stanovení aktivity CYP2C9 pomocí substrátu WARF byla připravena podle tabulky 8.

Komponenty	Objem [ $\mu$ l]
Pufr K/PO <sub>4</sub> pH 7,4	100
Mikrosomy (250 pmol)	47,5
WARF (2 mmol · l <sup>-1</sup> )	25
Preinkubace 5 minut při 37 °C	
NADPH + H <sup>+</sup> G. S.	77,5
Inkubace 20 minut při 37 °C	
70% HClO <sub>4</sub>	5

**Tabulka 8: Měření aktivity CYP2C9.** Specifický substrát pro CYP2C9 je WARF, obsah organických rozpouštědel v reakční směsi je 0,4 % (v/v), připravený 100 mmol · l<sup>-1</sup> pufr K/PO<sub>4</sub>, pH upraveno KOH; WARF, warfarin; G. S., generující systém.

Konečná koncentrace jednotlivých složek NADPH + H<sup>+</sup> G. S. a substrátu v reakční směsi:

NADP <sup>+</sup>	0,8 mmol · l <sup>-1</sup>
ISO	6 mmol · l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	8 mmol · l <sup>-1</sup>
IDH	0,4 U/ml
WARF	0,2 mmol · l <sup>-1</sup>

Reakce byla zastavena přidáním HClO<sub>4</sub> do reakční směsi. Vzorek byl centrifugován (22 000 × g, 10 min, 4 °C) v chlazené centrifuze. Aktivita CYP2C9 byla určena množstvím 7OHWARF stanoveného pomocí HPLC s fluorescenční detekcí podle tabulky 3.

b) Alternativní stanovení aktivity CYP2C9 s použitím DF. Substrát je u člověka metabolizován na 4'OHDF a 5OHDF. U potkanů je DF metabolizován CYP2C11 na 4'OHDF<sup>307</sup>. Kuřata jsou schopná metabolizovat diklofenak<sup>308</sup>. Reakční směs pro stanovení aktivity CYP2C9 pomocí substrátu DF byla připravena podle tabulky 9.

Komponenty	Objem [ $\mu$ l]
Pufr K/PO <sub>4</sub> pH 7,4	40
Mikrosomy (35 pmol)	74,5
DF (0,4 mmol · l <sup>-1</sup> )	8
Preinkubace 5 minut při 37 °C	
NADPH + H <sup>+</sup> G. S.	77,5
Inkubace 25 minut při 37 °C	
ACN/CH <sub>3</sub> COOH 94:6	50

**Tabulka 9: Měření aktivity CYP2C9.** Specifický substrát pro CYP2C9 je DF, obsah organických rozpouštědel v reakční směsi je 0,32 % (v/v), připravený 100 mmol · l<sup>-1</sup> pufr K/PO<sub>4</sub>, pH upraveno KOH; DF, diklofenak; G. S., generující systém; ACN, acetonitril.

Konečná koncentrace jednotlivých složek NADPH + H<sup>+</sup> G. S. a substrátu v reakční směsi:

NADP <sup>+</sup>	0,6	mmol · l <sup>-1</sup>
ISO	4	mmol · l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	6	mmol · l <sup>-1</sup>
IDH	0,2	U/ml
DF	0,016	mmol · l <sup>-1</sup>

Reakce je zastavena přidáním ACN/CH<sub>3</sub>COOH do reakční směsi. Vzorek byl centrifugován (22 000 × g, 10 min, 4 °C) v chlazené centrifuze. Aktivita CYP2C9 byla stanovena jako množství 4'OHDF nebo 5OHDF naměřeného pomocí HPLC s UV/VIS detektorem podle tabulky 3.

## 6. Stanovení aktivit CYP2C19 a CYP3A4 – substrát diazepam

U člověka je DIAZ *N*-demetylován za účasti CYP2C9 a CYP3A4 na *N*-desmethyldiazepam (DMD)<sup>122</sup>. Současně je hydroxylován za účasti CYP3A4 a CYP3A5 na 3-hydroxydiazepam (3OHDZ)<sup>122</sup>. Potkani metabolizují diazepam CYP2C11 na DMD a CYP3A2 na 3OHDZ<sup>309</sup>. Králíci metabolizují diazepam na DMD, 3OHDZ a 4'-hydroxydiazepam (podléhá glukuronidaci)<sup>310</sup>. Kuřata jsou schopna metabolizovat benzodiazepiny na 3OHDZ prostřednictvím podrodiny CYP2C<sup>59,311</sup>. Reakční směs pro stanovení aktivit CYP2C19 a CYP3A4 pomocí substrátu diazepamu byla připravena podle tabulky 10.

Komponenty	Objem [ $\mu$ l]
Pufr K/PO <sub>4</sub> pH 7,4	65
Mikrosomy (70 pmol)	20
DIAZ (0,4 mmol · l <sup>-1</sup> )	50
Preinkubace 5 minut při 37 °C	
NADPH + H <sup>+</sup> G. S.	65
Inkubace 15 minut při 37 °C	
ACN	100

**Tabulka 10: Měření aktivit CYP2C19 a CYP3A4.** Substrát pro CYP2C19 a CYP3A4 je DIAZ, obsah organických rozpouštědel v reakční směsi je 0,5 % (v/v), připravený 100 mmol · l<sup>-1</sup> pufr K/PO<sub>4</sub>, pH upraveno KOH; DIAZ, diazepam; G. S., generující systém; ACN, acetonitril.

Konečná koncentrace jednotlivých složek NADPH + H<sup>+</sup> G. S. a substrátu v reakční směsi:

NADP <sup>+</sup>	0,5 mmol · l <sup>-1</sup>
ISO	4 mmol · l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	5 mmol · l <sup>-1</sup>
IDH	0,3 U/ml
DIAZ	0,1 mmol · l <sup>-1</sup>

Reakce byla zastavena přidáním acetonitrilu do reakční směsi. Vzorek byl centrifugován (22 000 × g, 10 min, 4 °C) v chlazené centrifuze. Aktivita CYP2C19 byla stanovena jako množství DMD a aktivita CYP3A4 jako množství temazepamu naměřeného pomocí HPLC s UV/VIS detektorem podle tabulky 3.

## 7. Stanovení aktivity CYP2D6

Lidský CYP2D6 přeměňuje BUF na 1'-hydroxybufuralol<sup>136</sup>. U potkanů tuto reakci katalyzuje CYP2D2<sup>312</sup>, u kuřat CYP2D49<sup>242</sup>, u králíků CYP2D23 a CYP2D24<sup>243</sup>. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 11.

Komponenty	Objem [ $\mu$ l]
Pufr K/PO <sub>4</sub> pH 7,4	110
Mikrosomy (67,3 pmol)	20
BUF (1 mmol · l <sup>-1</sup> )	5
Preinkubace 5 minut při 37 °C	
NADPH + H <sup>+</sup> G. S.	65
Inkubace 15 minut při 37 °C	
70% HClO <sub>4</sub>	20

**Tabulka 11: Měření aktivity CYP2D6.** Specifický substrát pro CYP2D6 je BUF, obsah organických rozpouštědel v reakční směsi je 0 % (v/v), připravený 100 mmol · l<sup>-1</sup> pufr K/PO<sub>4</sub>, pH upraveno KOH; BUF, bufuralol; G. S., generující systém.

Konečná koncentrace jednotlivých složek NADPH + H<sup>+</sup> G. S. a substrátu v reakční směsi:

NADP <sup>+</sup>	0,5	mmol · l <sup>-1</sup>
ISO	4	mmol · l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	5	mmol · l <sup>-1</sup>
IDH	0,1	U/ml
BUF	0,025	mmol · l <sup>-1</sup>

Reakce byla zastavena přidáním 70% HClO<sub>4</sub> do reakční směsi. Vzorek byl centrifugován (22 000 × g, 10 min, 4 °C) v chlazené centrifuze. Aktivitu CYP2D6 určuje množství 1'-hydroxybufuralolu stanoveného pomocí HPLC s fluorescenční detekcí podle tabulky 3.



## 8. Stanovení aktivity CYP2E1

Metoda stanovení aktivity CYP2E1 byla převzata od Lucas a kol.<sup>144</sup> s drobnými modifikacemi. Lidé<sup>143</sup>, potkani<sup>287</sup>, králíci<sup>313</sup> a podtřída ptáci<sup>251</sup> metabolizují CLX prostřednictvím CYP2E1 na 6-OHCLX<sup>58</sup>. Reakce byla provedena podle tabulky 12.

Komponenty	Objem [ $\mu$ l]
Pufr K/PO <sub>4</sub> pH 7,4	630
Mikrosomy (160 pmol)	40
CLX (2,5 mmol · l <sup>-1</sup> )	20
Preinkubace 5 minut při 37 °C	
NADPH + H <sup>+</sup> G. S.	310
Inkubace 20 minut při 37 °C	
42,5% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	50
isopropanol/chloroform	2000

**Tabulka 12: Měření aktivity CYP2E1.** Specifický substrát pro CYP2E1 je CLX, obsah organiky v reakční směsi je 0 % (v/v), připravený 100 mmol · l<sup>-1</sup> pufr K/PO<sub>4</sub>, pH upraveno KOH; CLX, chlorzoxazon; G. S., generující systém; isopropanol/chloroform 15:85.

Konečná koncentrace jednotlivých složek NADPH + H<sup>+</sup> G. S. a substrátu v reakční směsi:

NADP <sup>+</sup>	0,5	mmol · l <sup>-1</sup>
ISO	4	mmol · l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	5	mmol · l <sup>-1</sup>
IDH	0,2	U/ml
CLX	0,050	mmol · l <sup>-1</sup>

Reakce byla zastavena přidáním 42,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> do reakční směsi. Dále se pracuje s použitím skleněných pipet. Po přidání isopropanolu/chloroformu a promíchání na vortexu byl vzorek po centrifugaci (730 × g, 10 min, 4 °C) v chlazené centrifuze *Rotina 38R*. V digestoři byla odsáta horní vodná vrstva a 1 ml směsi isopropanolu/chloroformu byl odpařen v termostatu pod mírným proudem dusíku. V odparku rozpuštěném v 200  $\mu$ l mobilní fáze (tabulka 3) byla stanovena aktivita CYP2E1 (množství 6-OHCLX) pomocí HPLC s UV/VIS detekcí.

### 9. Stanovení aktivity CYP3A4 pomocí midazolamu

Metoda měření enzymové aktivity byla převzata od Kronbach a kol.<sup>162</sup> a Ghosal a kol.<sup>268</sup>. Parametry pro stanovení 1'-hydroxymidazolamu pomocí HPLC byly čerpány z práce Juřici a kol.<sup>314</sup>. Midazolam je u lidí<sup>162</sup>, kuřat<sup>271</sup> a králíků<sup>315</sup> metabolizován podrodinou CYP3A na 1'-hydroxymidazolam. U potkanů je metabolizován CYP3A1 a CYP3A2 hlavně na 4-hydroxymidazolam a méně na 1'-hydroxymidazolam a 1',4-dihydroxymidazolam<sup>314</sup>. Reakční směs pro stanovení aktivity CYP3A4 pomocí substrátu midazolamu byla připravena podle tabulky 13.

Komponenty	Objem [ $\mu$ l]
Pufr K/PO <sub>4</sub> pH 7,4	50
Mikrosomy (12,56 pmol)	20
MDZ (0,028 mmol · l <sup>-1</sup> )	10
Preinkubace 5 minut při 37 °C	
NADPH + H <sup>+</sup> G. S.	20
Inkubace 8 minut při 37 °C	
100% chlazený MeOH	100

**Tabulka 13: Měření aktivity CYP3A4.** Specifický substrát pro CYP3A4 je midazolam, obsah organických rozpouštědel v reakční směsi je 0 % (v/v), připravený 100 mmol · l<sup>-1</sup> pufr K/PO<sub>4</sub>, pH upraveno KOH; MDZ, midazolam; G. S., generující systém; MeOH, methanol.

Konečná koncentrace jednotlivých složek NADPH + H<sup>+</sup> G. S. a substrátu v reakční směsi:

NADP <sup>+</sup>	0,5	mmol · l <sup>-1</sup>
ISO	4	mmol · l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	5	mmol · l <sup>-1</sup>
IDH	0,2	U/ml
MDZ	0,0028	mmol · l <sup>-1</sup>

Reakce byla zastavena přidáním 100% chlazeného methanolu do reakční směsi. Vzorek byl centrifugován (22 000 × g, 10 min, 4 °C) v chlazené centrifuze. Aktivita CYP3A4 (množství 1'-hydroxymidazolamu) byla stanovena pomocí HPLC s UV/VIS detekcí podle tabulky 3.

### 10. Stanovení aktivity CYP3A4 pomocí testosteronu

Práce Guengeriche a kol.<sup>161</sup> popisuje  $6\beta$ -hydroxylaci testosteronu za účasti CYP3A4. Potkani metabolizují TST na  $6\beta$ OHTST prostřednictvím CYP3A1 a samci metabolizují TST navíc pomocí CYP2A1 na  $7\alpha$ OHTST<sup>316</sup>. Králíci metabolizují TST prostřednictvím CYP3A6<sup>273</sup> a slepice prostřednictvím CYP3A37<sup>266</sup>. Reakční směs pro stanovení aktivity CYP3A4 pomocí substrátu TST byla připravena podle tabulky 14.

Komponenty	Objem [ $\mu$ l]
Pufr K/PO <sub>4</sub> pH 7,4	225
Mikrosomy (160 pmol)	20
TST (0,5 mmol · l <sup>-1</sup> )	100
Preinkubace 5 minut při 37 °C	
NADPH + H <sup>+</sup> G. S.	155
Inkubace 20 minut při 37 °C	
1M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /2M NaCl	100
dichlormethan	2000

**Tabulka 14: Měření aktivity CYP3A4.** Specifický substrát pro CYP3A4 je testosteron, obsah organických rozpouštědel v reakční směsi je 0,2 % (v/v), připravený 100 mmol · l<sup>-1</sup> pufr K/PO<sub>4</sub>, pH upraveno KOH; TST, testosteron; G. S., generující systém.

Konečná koncentrace jednotlivých složek NADPH + H<sup>+</sup> G. S. a substrátu v reakční směsi:

NADP <sup>+</sup>	0,5 mmol · l <sup>-1</sup>
ISO	4 mmol · l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	5 mmol · l <sup>-1</sup>
IDH	0,2 U/ml
TST	0,1 mmol · l <sup>-1</sup>

Reakce byla zastavena přidáním 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/2M NaCl do reakční směsi. Dále se pracuje s použitím skleněných pipet. Po přidání dichlormethanu a promíchání na vortexu byl vzorek po 15 minutách centrifugován (1 640 × g, 5 min, 4 °C). Po centrifugaci byla v digestoři odsáta horní vodná vrstva a 1 ml dichlormethanu byl odpařen v termostatu pod mírným proudem dusíku. V odparku rozpuštěném v 200  $\mu$ l mobilní fáze (tabulka 3) byla stanovena aktivita CYP3A4 (množství  $6\beta$ -hydroxytestosteronu) pomocí HPLC s UV/VIS detekcí.

## VI. Stanovení proteinové exprese CYP

Stanovení proteinové exprese CYP obsažených v jaterní mikrosomální frakci bylo provedeno za použití polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE) v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) a western blottingu. Separované proteiny byly přeneseny na polyvinylidenfluoridovou (PVDF) membránu pomocí Trans-Blot Turbo. Poté byla PVDF membrána inkubována s primární protilátkou (např. rabbit anti-rat CYP2E1), která se navázala na potkaní CYP2E1. Po promytí byla membrána inkubována v sekundární protilátce (protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou „anti-rabbit Horseradish peroxidase“). Po dalším promytí byla přidána *luminiscenční látka*. Jednotlivé „bandy“ odpovídající navázané primární protilátce byly detekovány přiložením světlocitlivého filmu. Černobílý film vyvolaný pomocí vývojky a ustalovače byl po uschnutí naskenován a vyhodnocen pomocí programu ImageJ<sup>317</sup>.

## VII. Stanovení genové exprese CYP

Po homogenizaci jater byla izolována celková RNA s využitím RNeasy Plus Mini kitu (Quiagen, ČR) podle výrobcem doporučeného postupu. Pro reverzní transkripci byla použita RNA o čistotě  $A_{260}/A_{280}$  vyšší než 2,0. K přípravě cDNA byly použity tyto látky: „master mix“ dNTP (deoxynukleotid trifosfátová směs), reverzní transkriptasa, inhibitory RNA, pufr a voda neobsahující DNAsy a RNAsy. Vše bylo smíseno s primerem a se vzorkem RNA (30 ng). Pro reakci reverzní transkriptázy byl použit program: 1) 16 °C po dobu 30 min, 2) 42 °C po dobu 30 minut, a nakonec 3) ukončení reverzní transkripce při 85 °C po dobu 5 minut. V druhé části byla provedena RT-PCR s cDNA připravenou v první části. Pro RT-PCR byl použit *LightCycler 480* s protokolem pro TaqMan gene expression assay a pro vyhodnocení dat byla použita metoda  $2^{(-\Delta\Delta Ct)^{318}}$  a jako housekeeping gen byla použita hypoxanthin fosforibosyltransferasa 1 (HPRT1).

## VIII. Statistická analýza

Nepárový dvou výběrový Studentův *t*-test byl použit pro statistickou analýzu. Rozdělení distribuce experimentálních dat byla vyhodnocena s použitím Kolmogorova-Smirnova testu. V úvahu byly brány statistické rozdíly  $P \leq 0,05$ .

## 5) Výsledky

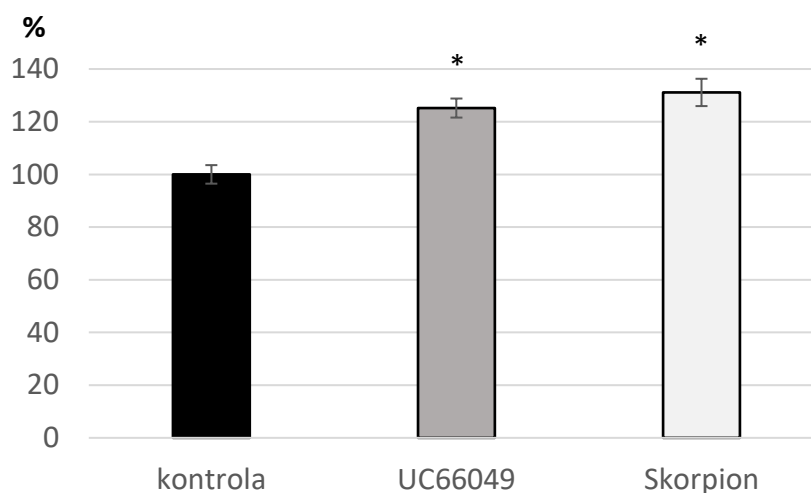
Potkanům, králíkům a slepicím byly podávány anthokyany ve formě stravy nebo nápoje po středně dlouhou dobu (29 až 72 dní). Barevné pšenice byly podávány králíkům a kuřatům, aby bylo možné stanovit vliv anthokyanů na schopnost metabolismu cizorodých látek a faktory oxidačního stresu u dalších zvířecích druhů, chovaných hlavně pro maso popř. vejce.

### a) Podání barevných pšenic UC66049 a Skorpion samcům potkana

Potkani byli v tomto experimentu krmeni granulemi připravenými pouze z pšenice Vánek (kontrola) nebo jedné z barevných pšenic UC66049 nebo Skorpion a byl studován vliv této monodiety na faktory oxidačního stresu, aktivitu a expresi mRNA CYP.

#### *I. Celková antioxidační kapacita potkaní plazmy*

FRAP byla změřena v krevní plazmě potkanů krměných pšeničnou monodietou. Statisticky významně byly zvýšeny hodnoty FRAP u potkanů krměných buď barevnou pšenicí UC66049, nebo barevnou pšenicí Skorpion. Pro kontrolní skupinu odpovídala naměřená hodnota FRAP koncentraci  $28,1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  askorbové kyseliny (standard), pro skupinu krměnou barevnou pšenicí UC66049 odpovídala hodnota FRAP koncentraci  $35,2 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a skupina krměná barevnou pšenicí Skorpion měla hodnotu FRAP odpovídající koncentraci  $37,8 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (Obrázek 4).



**Obrázek 3: Celková antioxidační kapacita potkaní plazmy byla vyjádřena v procentech vzhledem ke kontrole.** Potkani byli krměni pšenicí Bohemia (kontrola), barevnými pšenicemi UC66049 nebo Skorpion po dobu 72 dní. Značka \* znamená statisticky významnou odchylku (\* $P \leq 0,05$ ) od celkové antioxidační kapacity kontroly.

## II. Parametry oxidačního stresu potkaní plazmy

Plazma potkanů krmených pouze pšeničnou monodietou byla použita jak pro stanovení celkové antioxidační kapacity, tak pro měření TBARS a thiolových skupin. Mírně, avšak statisticky významně, byla zvýšena hladina thiolů (-SH) u skupin krmených peletami připravenými z pšenice UC66049 nebo Skorpion (Tabulka 15).

	TBARS (%)	-SH (%)
kontrola	100 ± 15	100 ± 8
UC66049	107 ± 13	110 ± 6*
Skorpion	107 ± 15	121 ± 11*

**Tabulka 15: Hladina malondialdehydu (TBARS) a -SH skupin v plazmě potkanů vyjádřená v procentech vzhledem ke kontrole.** Potkani byli krmeni pšenicí Bohemia (kontrola), barevnými pšenicemi UC66049 nebo Skorpion po dobu 72 dní. Značka \* znamená statisticky významnou odchylku (\*P ≤ 0,05) hladiny malondialdehydu a -SH skupiny od kontroly.

## III. Parametry oxidačního stresu potkaních erytrocytů

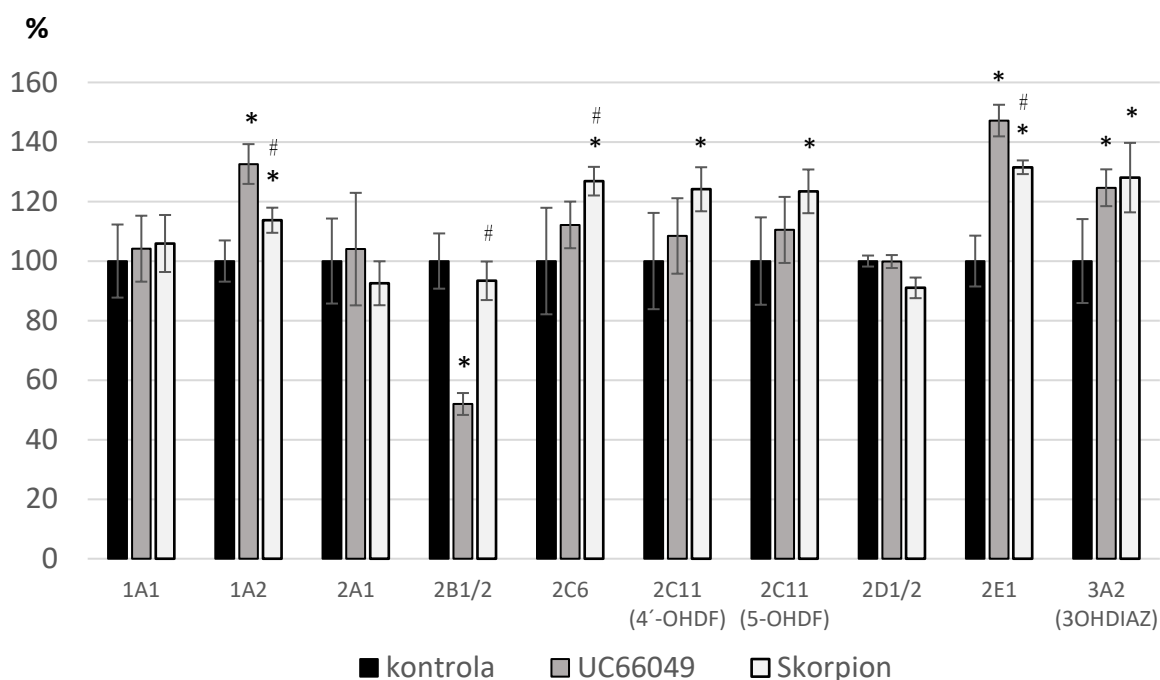
V erytrocytech potkanů krmených granulami připravenými z testovaných pšeníc byly stanoveny TBARS, GSH, SOD, GSR, GST a GPx. U skupiny krmené pšenicí UC66049 byla pozorována vzrůstající aktivita GPx, která ovšem stejně jako další stanovované parametry nebyla statisticky významná (Tabulka 16).

	TBARS (%)	GSH (%)	SOD (%)	GSR (%)	GST (%)	GPx (%)
kontrola	100 ± 17	100 ± 10	100 ± 32	100 ± 47	100 ± 36	100 ± 20
UC66049	100 ± 20	97 ± 15	89 ± 37	63 ± 40	89 ± 34	157 ± 77
Skorpion	86 ± 11	105 ± 9	68 ± 23	51 ± 24	66 ± 25	126 ± 40

**Tabulka 16: Enzymatické (SOD, GSR, GST a GPx) a neenzymatické (TBARS, GSH) parametry naměřené v potkaních erytrocytech vyjádřené v procentech vzhledem ke kontrole.** Potkani byli krmeni pšenicí Bohemia (kontrola), barevnou pšenicí UC66049 nebo Skorpion po dobu 72 dní. Žádný ze stanovených parametrů se statisticky významně nelišil od kontroly.

#### IV. Aktivity potkaních jaterních CYP

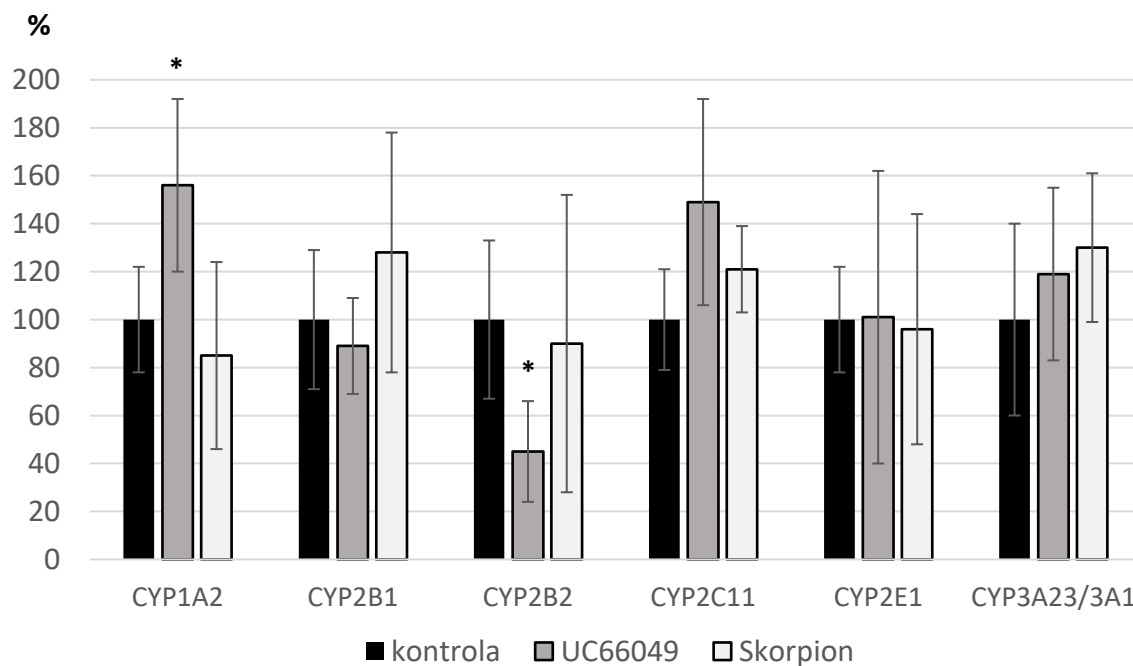
Potkani, kteří byli krmeni dietou složenou z pšenice UC66049 nebo Skorpion, měli ovlivněnu aktivitu některých jaterních CYP (Obrázek 4). Nejvýznamněji byly zvýšeny aktivity CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 a CYP3A. Konzumace barevné pšenice UC66049 významně zvýšila aktivity potkaních jaterních CYP1A2, CYP2E1 a CYP3A. Zatímco konzumace barevné pšenice Skorpion zvýšila aktivity potkaních jaterních CYP1A2, CYP2C6, CYP2C11, CYP2E1 a CYP3A. Významný pokles aktivity byl pozorován pouze u CYP2B1/2 u skupiny potkanů krměných UC66049. Aktivity CYP1A1, CYP2A1 a CYP2D1/2 nebyly konzumací anthokyanů ovlivněny.



**Obrázek 4: Vliv konzumace barevných pšenic na aktivitu CYP potkaních jaterních mikrosomů vyjádřený v procentech vzhledem ke kontrole.** Potkani byli krmeni pšenicí Bohemia (kontrola) nebo barevnými pšenicemi Skorpion nebo UC66049 po dobu 72 dní. Značka \* znamená statisticky významnou odchylku ( $*P \leq 0,05$ ) od aktivity kontroly a značka# znamená statisticky významnou odchylku ( $\#P \leq 0,05$ ) mezi skupinami UC66049 a Skorpion.

### V. Expresie mRNA potkaních jaterních CYP

Změny v enzymových aktivitách byly ověřeny analýzou real-time PCR. Data na Obrázku 5 znázorňují hladiny genové exprese všech měřených CYP u kontrolní skupiny potkanů a skupin konzumujících barevné pšenice. Konzumace barevné pšenice Skorpion významně neovlivnila expresi mRNA potkaních CYP. Naopak potkani krmení pšenicí UC66049 měli sníženu expresi CYP2B2. Aktivita a exprese mRNA CYP1A2 vykazovaly u potkanů krmených pšenicí UC66049 podobný trend.



**Obrázek 5: Vliv konzumace barevných pšenic na expresi mRNA CYP potkaních jaterních mikrosomů.** Značka \* znamená statisticky významnou odchylku od exprese mRNA kontroly. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly. mRNA data představují průměr  $\pm$  s.o. (směrodatná odchylka) z deseti jednotlivých zvířat. Hodnoty signifikantně zvýšené ve srovnání s kontrolou jsou označeny hvězdičkami (\* $P \leq 0,05$ ).

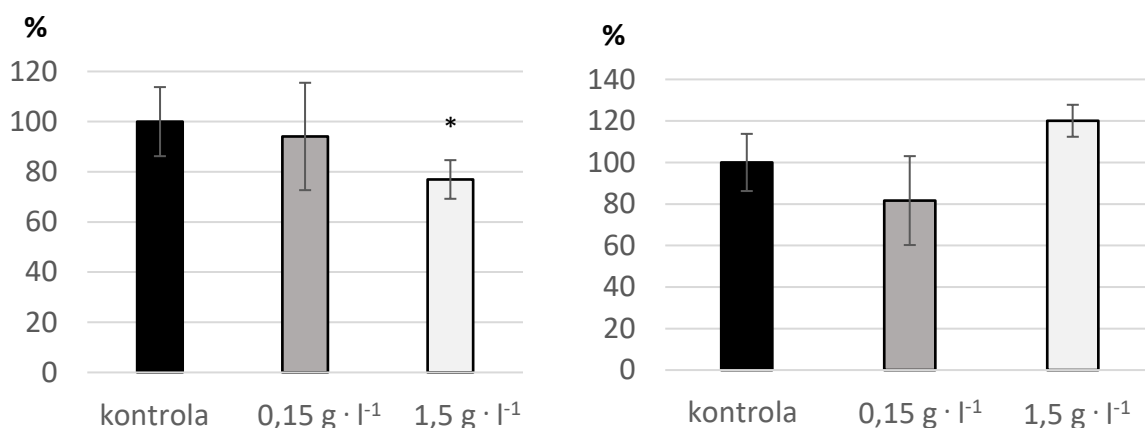


## b) Podání borůvkového nápoje (*Vaccinium myrtillus* L.) samečům potkana

Stanovení vlivu anthokyanů přítomných v borůvkovém extraktu (*Vaccinium myrtillus* L.) na parametry oxidačního stresu, aktivitu a expresi mRNA vybraných CYP bylo provedeno v experimentu na potkanech.

### I. Celková antioxidační kapacita potkaní plazmy

FRAP plazmy nebyla po konzumaci borůvkového extraktu výrazně změněna, k statisticky signifikantnímu snížení došlo u skupiny napájené borůvkovým nápojem o koncentraci  $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  po dobu 29 dní. Při aplikaci borůvkového extraktu o koncentraci  $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  po dobu 58 dní se celková antioxidační kapacita zvýšila o 20 %.



**Obrázek 6: Celková antioxidační kapacita potkaní plazmy u potkanů napájených borůvkovým nápojem (*Vaccinium Myrtillus* L.) vyjádřená v procentech vzhledem ke kontrole.** Potkani byli napájeni po dobu 29 dní (vlevo) nebo 58 dní (vpravo) kohoutkovou vodou (kontrola) nebo borůvkovým nápojem o koncentraci  $0,15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  nebo  $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Data FRAP představují průměr  $\pm$  s.o. z šesti zvířat. Hodnoty signifikantně zvýšené ve srovnání s kontrolou jsou označeny hvězdičkami (\* $P \leq 0,05$ ).

### II. Parametry oxidačního stresu potkaní plazmy

Hladiny TBARS a  $-\text{SH}$  skupin stanovené v plazmě potkanů napájených borůvkovým nápojem o koncentraci  $0,15$  nebo  $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  po dobu 29 nebo 58 dní se významně nelišily od kontroly napájené pouze kohoutkovou vodou (Tabulky 18a, 18b). Skupina napájena borůvkovým nápojem o koncentraci  $0,15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  po dobu 29 dní měla sníženou hladinu TBARS o takřka 15 %. Naopak potkani napájeni stejným nápojem po dobu 58 dní měli zvýšenou hladinu TBARS o 11 %.

	TBARS (%)	-SH (%)
kontrola 29 dní	100 ± 17	100 ± 9
0,15 g · l <sup>-1</sup> 29 dní	85 ± 13	103 ± 3
1,5 g · l <sup>-1</sup> 29 dní	104 ± 16	103 ± 13

**Tabulka 18a: Hladina TBARS a -SH skupin v potkaní plazmě vyjádřené v procentech vzhledem ke kontrole.** Potkani byli napájeni kohoutkovou vodou (kontrola) nebo borůvkovým nápojem o koncentraci 0,15 nebo 1,5 g · l<sup>-1</sup> 29 dní. Žádná z naměřených hodnot se statisticky významně nelišila ( $P \leq 0,05$ ) od kontroly.

	TBARS (%)	-SH (%)
kontrola 58 dní	100 ± 12	100 ± 6
0,15 g · l <sup>-1</sup> 58 dní	111 ± 6	95 ± 15
1,5 g · l <sup>-1</sup> 58 dní	98 ± 14	102 ± 7

**Tabulka 18b: Hladina TBARS a -SH skupin v potkaní plazmě vyjádřené v procentech vzhledem ke kontrole.** Potkani byli napájeni kohoutkovou vodou (kontrola) nebo borůvkovým nápojem o koncentraci 0,15 nebo 1,5 g · l<sup>-1</sup> 58 dní. Žádná z naměřených hodnot se statisticky významně nelišila ( $P \leq 0,05$ ) od kontroly.

### III. Parametry oxidačního stresu potkaních erytrocytů

Parametry oxidačního stresu stanovené v erytrocytech izolovaných z krve odebrané potkanům napájených borůvkovým nápojem o koncentraci 0,15 g · l<sup>-1</sup> nebo 1,5 g · l<sup>-1</sup> po dobu 29 dnů (Tabulka 19a) a 58 dnů (Tabulka 19b) se nijak významně nelišily od hladin nebo aktivit sledovaných enzymů kontrolní skupiny.

	TBARS (%)	GSH (%)	SOD (%)	GSR (%)	GST (%)	GPx (%)
kontrola	100 ± 34	100 ± 44	100 ± 30	100 ± 30	100 ± 25	100 ± 24
0,15 g · l <sup>-1</sup>	106 ± 15	83 ± 13	111 ± 21	104 ± 22	79 ± 7	90 ± 9
1,5 g · l <sup>-1</sup>	107 ± 19	107 ± 20	83 ± 8	89 ± 20	72 ± 17	87 ± 9

**Tabulka 19a: Enzymatické (SOD, GSR, GST a GPx) a neenzymatické (TBARS, GSH) parametry naměřené v potkaních erytrocytech vyjádřené v procentech vzhledem ke kontrole.** Potkani byli napájeni kohoutkovou vodou nebo borůvkovým nápojem o koncentraci 0,15 nebo 1,5 g · l<sup>-1</sup> po dobu 29 dní. Žádný ze stanovených parametrů se významně nelišil ( $P \leq 0,05$ ) od kontroly.

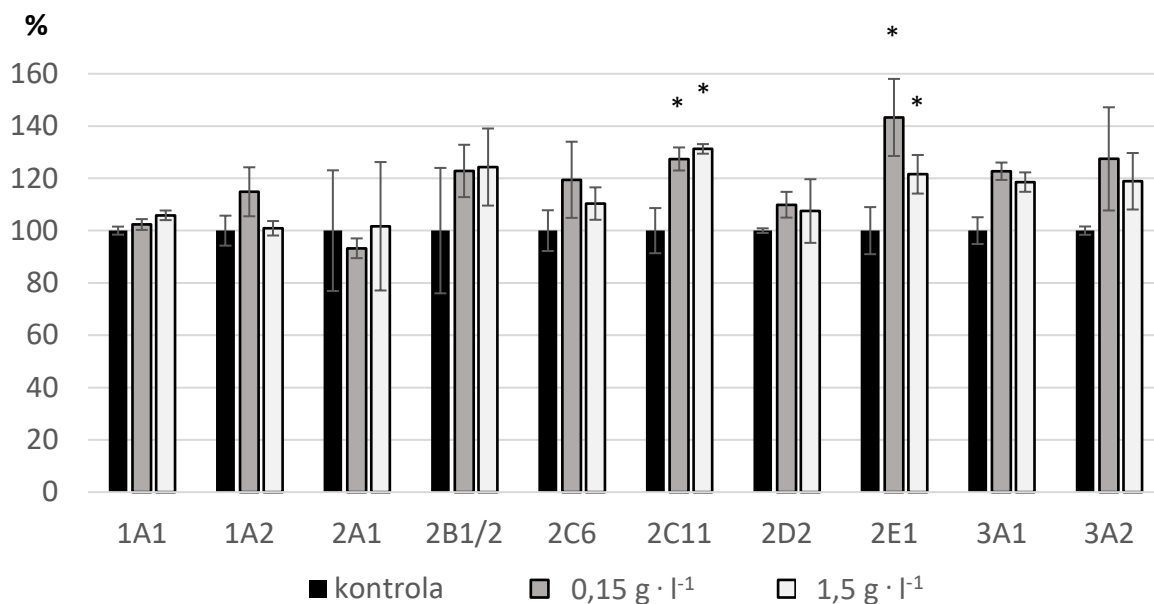
Hladiny a aktivity faktorů oxidačního stresu stanovené v erythrocytech izolovaných z krve odebrané potkanům napájených borůvkovým nápojem o koncentraci  $0,15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  nebo  $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  po dobu 58 dnů (Tabulka 19b) ukazovaly klesající trend u aktivity GSR skupiny napájené  $0,15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , ale statisticky nebyla tato hodnota významná.

	TBARS (%)	GSH (%)	SOD (%)	GSR (%)	GST (%)	GPx (%)
kontrola	100 ± 9	100 ± 12	100 ± 31	100 ± 33	100 ± 18	100 ± 19
$0,15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$	123 ± 24	103 ± 19	70 ± 24	38 ± 16*	115 ± 10	81 ± 23
$1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$	123 ± 14	115 ± 14	82 ± 18	64 ± 28	112 ± 6	83 ± 18

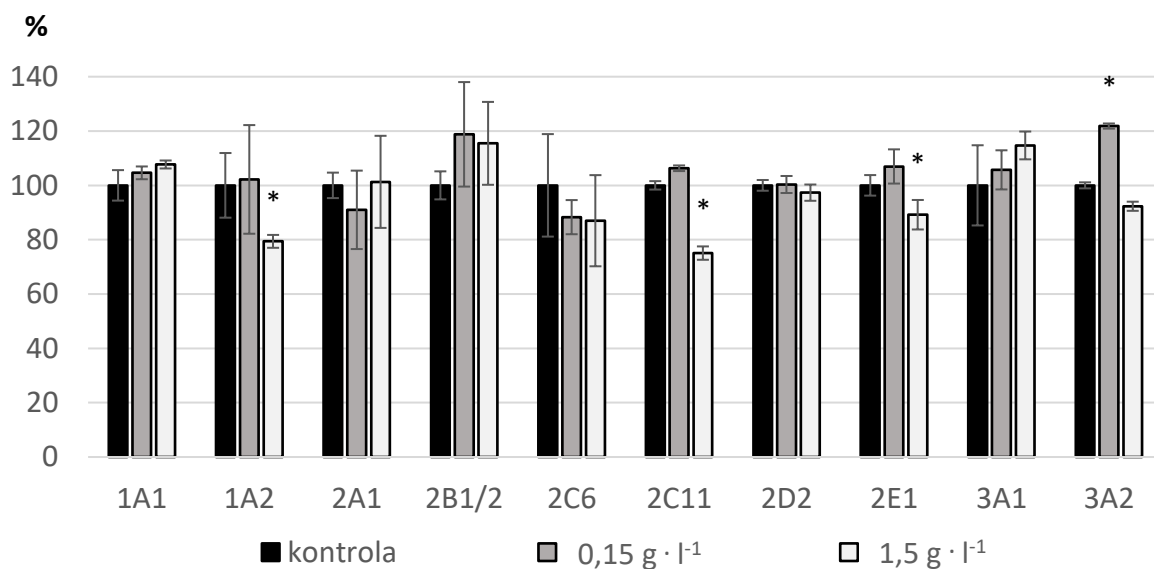
**Tabulka 19b: Enzymatické (SOD, GSR, GST a GPx) a neenzymatické (TBARS, GSH) parametry naměřené v potkaních erythrocytech vyjádřené v procentech vzhledem ke kontrole.** Potkani byli napájeni kohoutkovou vodou (kontrola) nebo borůvkovým extraktem rozpuštěným v kohoutkové vodě o koncentraci  $0,15$  nebo  $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  po dobu 58 dní. Hodnoty signifikantně odlišné od kontroly jsou označeny hvězdičkami (\* $P \leq 0,05$ ).

#### IV. Aktivity potkaních jaterních CYP

Aktivity potkaních jaterních CYP byly stanoveny pomocí těchto devíti substrátů: ETRR (CYP1A1), PHEN (CYP1A2), TST (CYP2A1, metabolit  $7\alpha$ -hydroxytestosteron), EFC (CYP2B1/2), WARF (CYP2C6, 7-hydroxywarfarin), DF (CYP2C11, 4'OHDF), BUF (CYP2D2), CLX (CYP2E1), MDZ (CYP3A1, 4-OHMDZ), TST (CYP3A2,  $6\beta$ -OHTST). Potkani napájeni borůvkovým nápojem po dobu 29 dní (obě koncentrace) měli zvýšenou aktivitu CYP2C11 a CYP2E1 (Obrázek 7a). Naopak podávání vyšší koncentrace borůvkového nápoje ( $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) po dobu 58 dní snížilo aktivitu CYP1A2, CYP2C11 a CYP2E1, ale zvýšilo aktivitu CYP3A2 (Obrázek 7b).



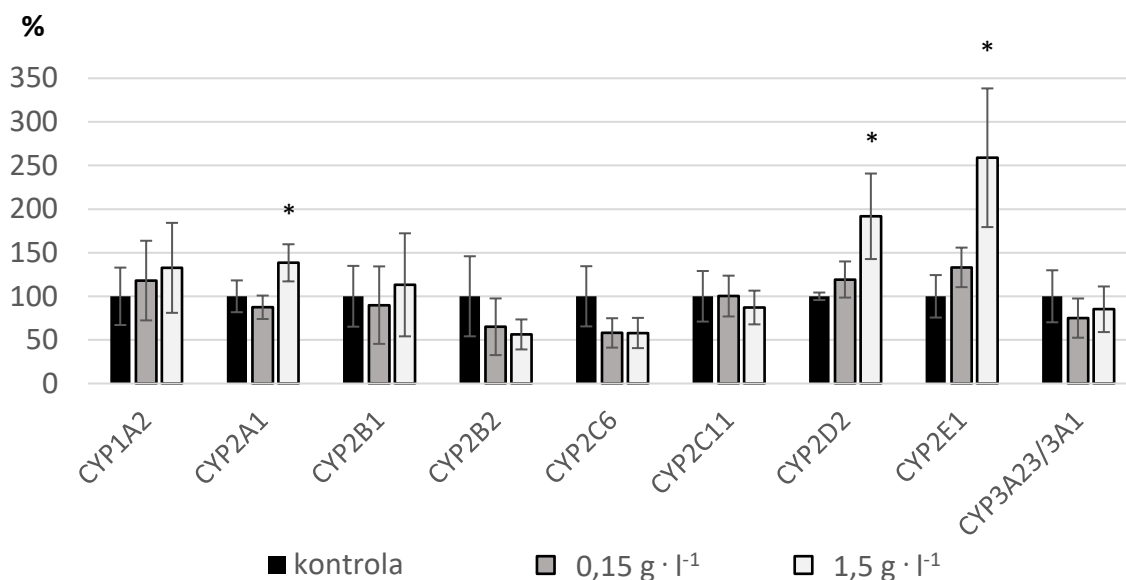
**Obrázek 7a: Vliv borůvkového nápoje na změnu aktivit CYP potkaních jaterních mikrosomů vyjádřené v procentech vzhledem ke kontrole.** Potkani byli napájeni kohoutkovou vodou (kontrola) nebo borůvkovým extraktem rozpuštěným v kohoutkové vodě o koncentraci 0,15 nebo 1,5 g · l<sup>-1</sup> po dobu 29 dní. Aktivity CYP u nichž byla statisticky významná odchylka ( $P \leq 0,05$ ) od kontroly byly označeny \*.



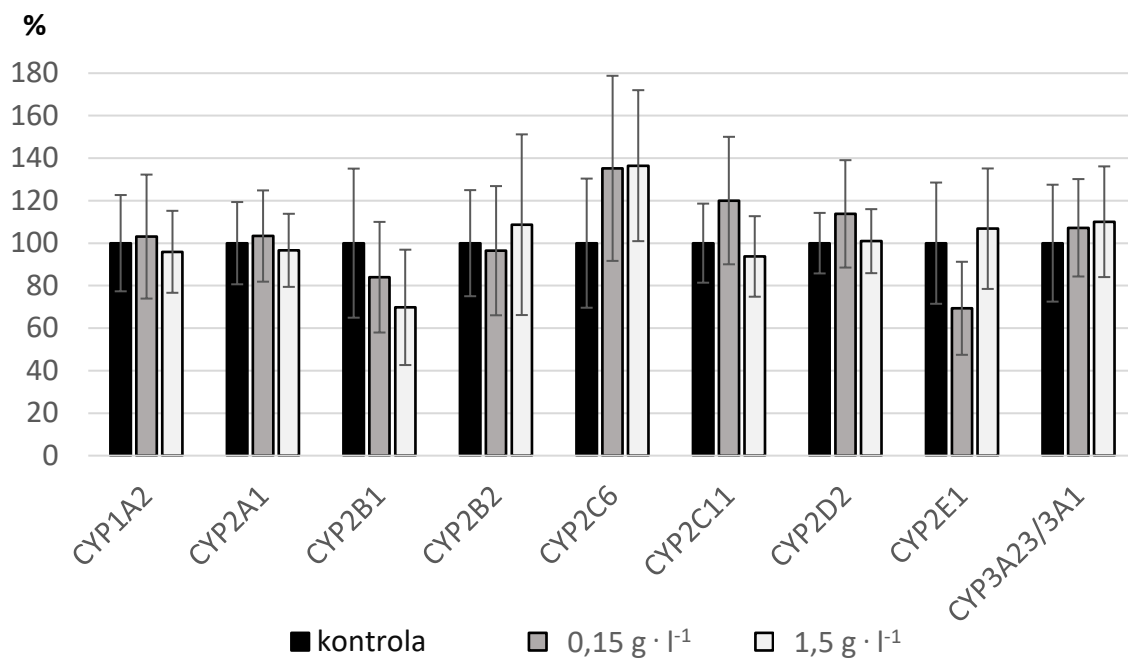
**Obrázek 7b: Vliv borůvkového nápoje na aktivitu CYP potkaních jaterních mikrosomů.** Potkani byli napájeni kohoutkovou vodou (kontrola) nebo v ní rozpuštěným borůvkovým extraktem o koncentraci 0,15 nebo 1,5 g · l<sup>-1</sup> po dobu 58 dní. Aktivity CYP u nichž byla statisticky významná odchylka ( $P \leq 0,05$ ) od kontroly byly označeny \*.

## V. Expresa mRNA potkaních jaterních CYP

U skupiny napájené borůvkovým nápojem o koncentraci  $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  po dobu 29 dní byla prokazatelně zvýšena exprese mRNA CYP2E1 (250 %). U stejné skupiny potanů byly naměřeny ne tak signifikantní, ale statisticky významně zvýšené exprese mRNA CYP2D2 a CYP2A1 (Obrázek 8a).



**Obrázek 8a: Vliv borůvkového nápoje na expresi mRNA CYP potkaních jaterních mikrosomů.** Potkani byli napájeni kohoutkovou vodou (kontrola) nebo v ní rozpuštěným borůvkovým extraktem o koncentraci 0,15 nebo  $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  po dobu 29 dní. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly. Hodnoty mRNA představují průměr  $\pm$  s.o. ze šesti jednotlivých zvířat. Hodnoty signifikantně zvýšené oproti kontrole jsou označeny hvězdičkami (\* $P \leq 0,05$ ).



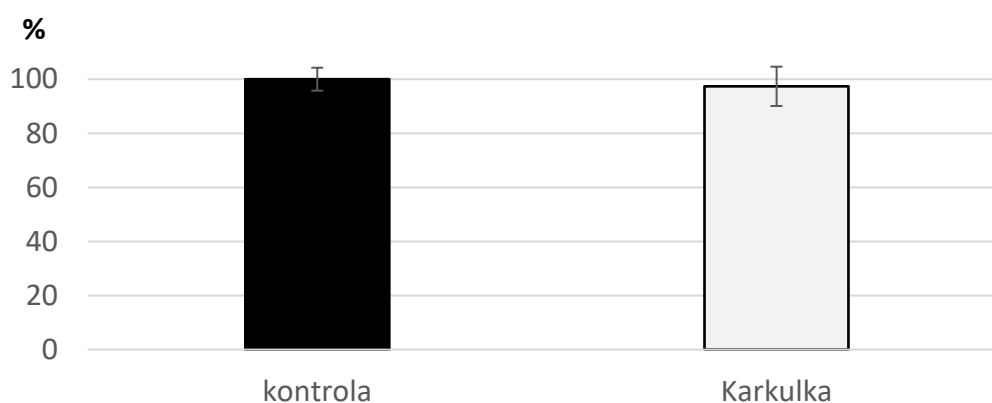
**Obrázek 8b: Vliv borůvkového nápoje na expresi mRNA CYP potkaních jaterních mikrosomů.** Potkani byli napájeni kohoutkovou vodou (kontrola) nebo v ní rozpuštěným borůvkovým extraktem o koncentraci 0,15 nebo 1,5 g · l<sup>-1</sup> po dobu 58 dní. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly. Hodnoty mRNA představují průměr ± s.o. ze šesti jednotlivých zvířat. Hodnoty skupin napájených borůvkovým nápojem se nelišily od kontroly.

### c) Podání barevné pšenice Karkulka samicím králíka

Samice králíka byly krmeny z 85 % standardní dietou, která byla doplněna pšenicí bez obsahu anthokyanů Vanessa (kontrola) nebo barevnou pšenicí obsahující anthokyany Karkulka po dobu 61 dní. Studie byla provedena na králících, protože jsou velice citlivým zvířecím experimentálním modelem a podávání potravy bohaté na anthokyany může zlepšit jak zdravotní stav testovaných zvířat, tak zvýšit kvalitu jejich masa.

#### I. Celková antioxidační kapacita plazmy samic králíka

Antioxidační kapacita plazmy králíků samic krmených dietou tvořenou z 15 % barevnou pšenicí se nijak nelišila od kontroly (Obrázek 9).



**Obrázek 9: Celková antioxidační kapacita králíčí plazmy.** Samice králíka byly krmeny pšenicí Vanessa (kontrola) nebo pšenicí s purpurovým perikarpem Karkulka po dobu 61 dní. Žádné statisticky významné rozdíly ( $P \leq 0,05$ ) mezi studovanými skupinami nebyly pozorovány.

#### II. Parametry oxidačního stresu erytrocytů králíků samic

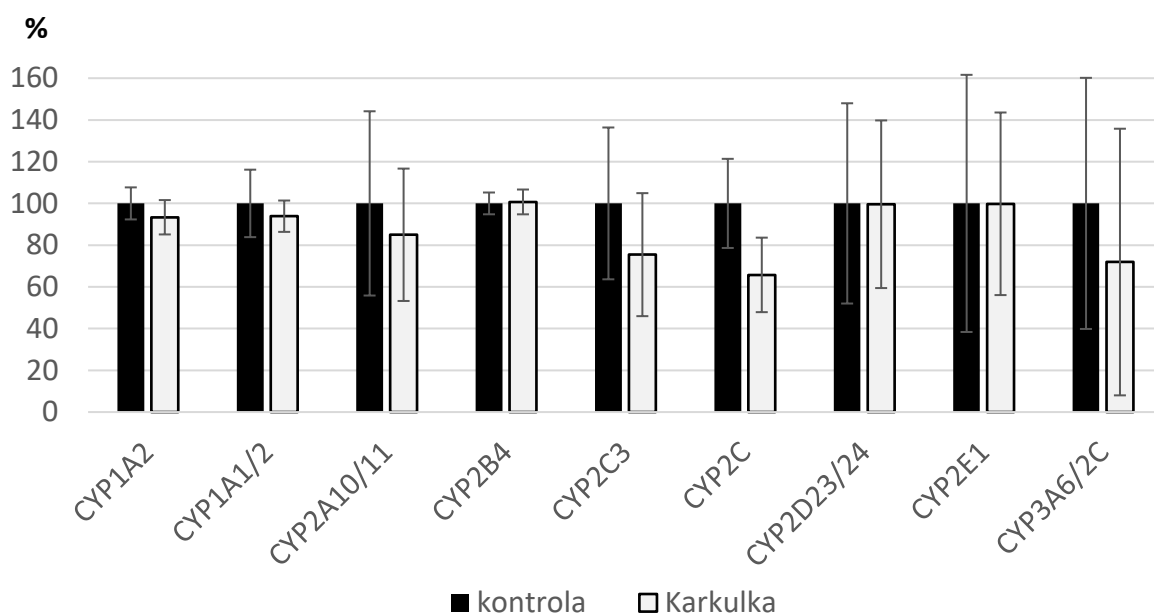
Faktory oxidačního stresu v erytrocytech byly velice podobné u kontroly (pšenice Vanessa) a barevné pšenice (pšenice Karkulka). Skupina krmená pšenicí Karkulka měla sníženu aktivitu GST (Tabulka 20).

	TBARS (%)	GSH (%)	SOD (%)	GSR (%)	GST (%)	GPx (%)
kontrola	100 ± 4	100 ± 4	100 ± 4	100 ± 13	100 ± 7	100 ± 3
Karkulka	91 ± 3	107 ± 6	93 ± 4	88 ± 8	79 ± 9*	98 ± 5

**Tabulka 20: Enzymatické (SOD, GSR, GST a GPx) a neenzymatické (TBARS, GSH) parametry naměřené v králíčích erytrocytech.** Samice králíka byly krmeny pšenicí Vanessa (kontrola) nebo pšenicí s purpurovým perikarpem Karkulka po dobu 61 dní. Statisticky významné odchylky ( $P \leq 0,05$ ) od kontroly byly vyznačeny hvězdičkou \*.

### III. Aktivity králičích jaterních CYP

Králici metabolizují ETRR prostřednictvím CYP1A2, PHEN prostřednictvím CYP1A2 a CYP1A1 (méně), KUM prostřednictvím CYP2A10 a CYP2A11, EFC prostřednictvím CYP2B4, TST prostřednictvím 2C3 na 6 $\beta$ OHTST, DIAZ prostřednictvím CYP2C na DMD a CYP3A6/2C na 3OHDZ, BUF prostřednictvím CYP2D23 a CYP2D24, CLX prostřednictvím CYP2E1. Aktivity králičích jaterních CYP jsou uvedeny na obrázku 10. Naměřené hodnoty jednotlivých CYP králičích samic krmených pšenící bohatou na anthokyany Karkulka se nelišily od kontroly. I když byl v některých případech pozorován pokles metabolismu např. přeměny diazepam na DMD, tak velké interindividuální rozdíly mezi studovanými zvířaty neumožnily ani tento pokles v metabolismu diazepam považovat za statisticky významný.



**Obrázek 10: Aktivita CYP u králičích samic krmených barevnou pšenící.** Samice králíka byly krmeny pšenící Vanessa (kontrola) nebo pšenící s purpurovým perikarpem Karkulka po dobu 61 dní. Žádná z naměřených hodnot se významně ( $P \leq 0,05$ ) nelišila od kontroly.

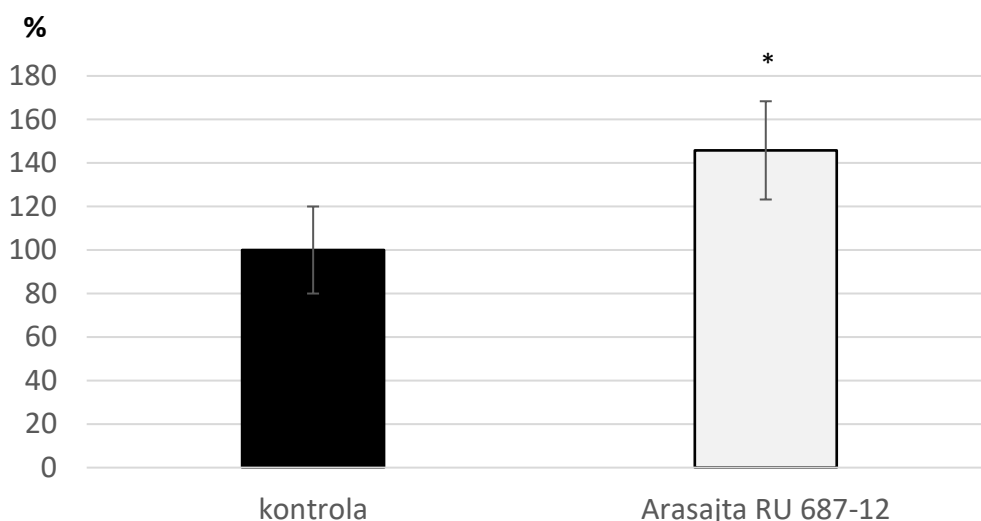


#### d) Podání barevné pšenice Arasajta RU 687-12 slepicím

Drůbež je oproti jiným dříve zmíněným zvířecím modelům poměrně málo studovaný zvířecí model, zejména pro studium vlivu konzumace stravy bohaté na anthokyany na faktory oxidačního stresu a CYP. V experimentu nosnice staré 69 týdnů se snižující se snůškou vajec, byly krmeny dietou tvořenou z 60 % barevnou pšenicí Arasajta RU 687-12 nebo pšenicí Bohemia (kontrola).

##### *I. Celková antioxidační kapacita slepičí plazmy*

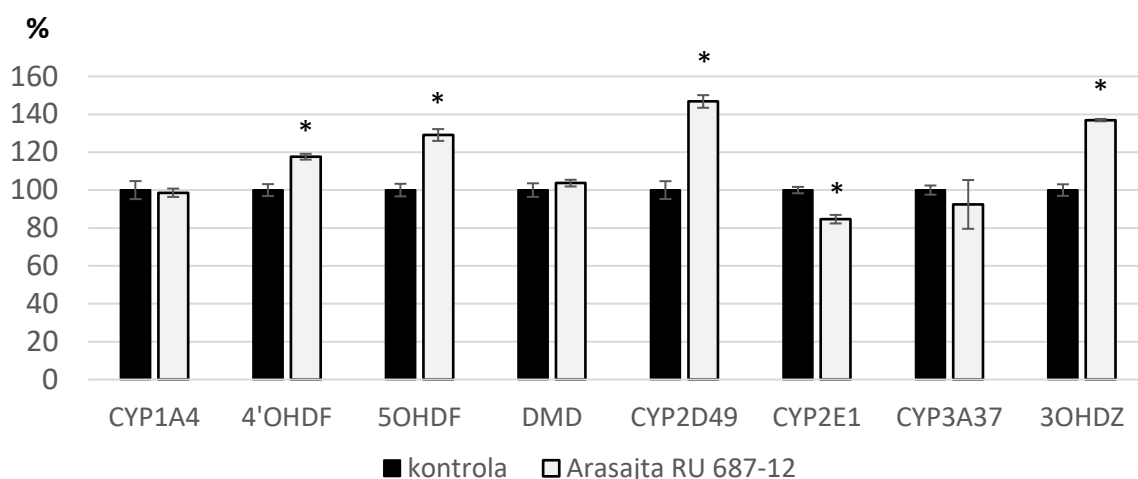
Celková antioxidační kapacita byla měřena v krevní plazmě slepic. Skupina krmená Arasajtou měla statisticky významně zvýšenou hladinu antioxidační kapacity, což by mohlo mít pozitivní vliv na snížení volných radikálů v jejich organismu (Obrázek 11).



**Obrázek 11: Celková antioxidační kapacita slepičí plazmy byla vyjádřena v procentech vzhledem ke kontrole.** Slepice byly krmeny pšenicí Bohemia (kontrola) nebo pšenicí s modrým aleuronem Arasajta RU 687-12 po dobu 63 dní. Značka \* ( $P \leq 0,05$ ) znamená statisticky významnou odchylku od celkové antioxidační kapacity kontroly.

##### *II. Aktivity slepičích jaterních CYP*

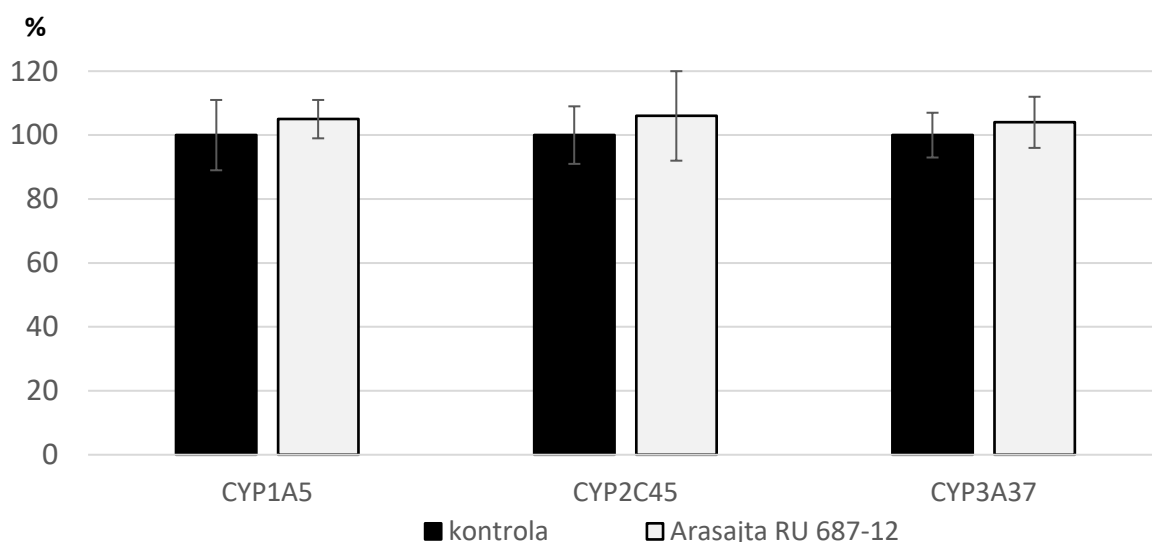
Při měření aktivity CYP přítomných ve slepičích játrech byly použity substráty specifické pro lidské formy CYP (ETRR, DIAZ, KUM, BUF, CLX, DF a TST). Nosnice krmené barevnou pšenicí Arasajta RU 687-12 měly statisticky významně zvýšené aktivity CYP (Obrázek 13) odpovídající lidskému CYP2C9 (substrát DF), CYP2D6 (substrát BUF) a CYP3A (DIAZ, metabolit 3OHDZ).



**Obrázek 12: Vliv konzumace barevné pšenice Arasajta RU 687-12 na aktivitu CYP slepičích jaterních mikrosomů.** Slepice byly krmeny pšenicí Bohemia (kontrola) nebo pšenicí s modrým aleuronem Arasajta RU 687-12 po dobu 63 dní. Značka \* ( $P \leq 0,05$ ) znamená statisticky významnou odchylku od kontroly; 4'OHDF, 4'-hydroxydiklofenak; 5OHDF, 5-hydroxydiklofenak; DMD, *N*-desmethyldiazepam; 3OH, 3-hydroxydiazepam.

### III. Expres mRNA slepičích jaterních CYP

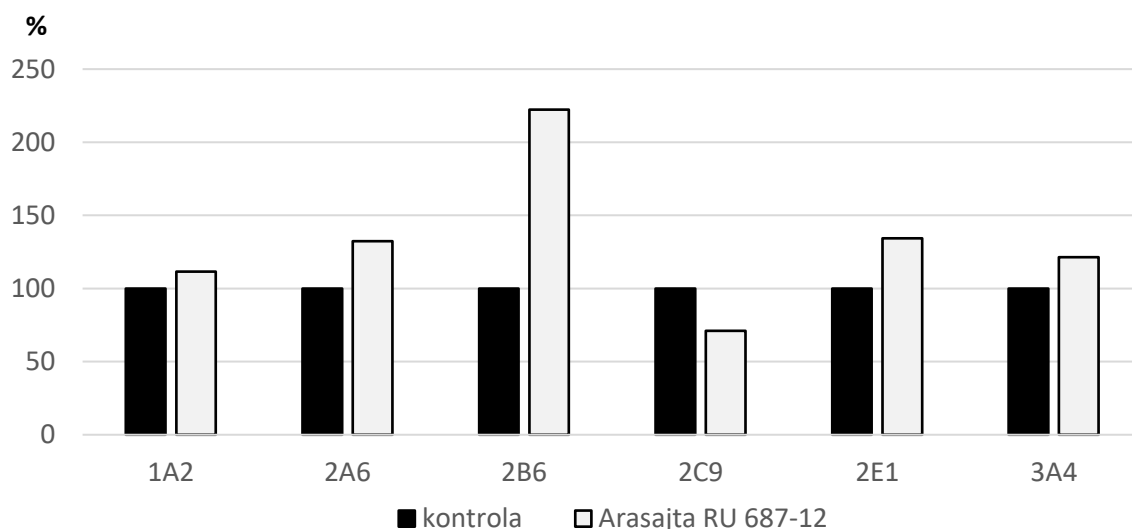
Expres mRNA kuřecích CYP1A5, 3A37 a 2C45 neprokázala žádné změny po konzumaci barevné pšenice oproti kontrole.



**Obrázek 13: Vliv konzumace barevné pšenice Arasajta RU 687-12 na expresi mRNA CYP slepičích jaterních mikrosomů.** Slepice byly krmeny pšenicí Bohemia (kontrola) nebo pšenicí s modrým aleuronem Arasajta RU 687-12 po dobu 63 dní. Žádná z naměřených hodnot mRNA se významně nelišila ( $P \leq 0,05$ ) od kontroly.

#### IV. Proteinová exprese vybraných forem slepičích jaterních CYP

Expresie proteinů kuřecích jaterních CYP byla detekována s použitím protilátek proti lidským CYP. Za povšimnutí stojí zvýšená exprese proteinu detekovaného pomocí protilátky proti lidskému CYP2B6. Nenašli jsme ovšem vhodný substrát pro stanovení aktivity podrodiny CYP2B u kuřat, který by nám umožnil potvrdit souvislost mezi předpokládanou změnou aktivity a zvýšenou proteinovou expresí detekovanou prostřednictvím protilátky proti lidskému CYP2B6.



**Obrázek 14: Vliv konzumace barevné pšenice Arasajta RU 687-12 na expresi proteinů CYP slepičích jaterních mikrosomů.** Slepice byly krmeny pšenicí Bohemia (kontrola) nebo pšenicí s modrým aleuronem Arasajta RU 687-12 po dobu 63 dní.

## 6) Diskuze

Předmětem našeho zájmu bylo studium efektů anthokyanů, látek s antioxidačním účinkem, na vybrané systémy (CYP a faktory oxidačního stresu) živočišných modelů. Živé organismy se brání vysoké hladině volných radikálů třemi způsoby. V prvé řadě regulují syntézu enzymů, které se účastní tvorby endogenních radikálů. V dalším kroku mohou odstraňovat již vytvořené radikály. Zde se uplatní jak enzymové, tak neenzymové endogenní antioxidanty. V případě neúspěchu těchto zmíněných variant, jsou využity reparační mechanismy pro obnovení poškozených biomolekul.

Při konzumaci potravy se do živých organismů dostávají kromě živin i látky cizorodé (v našem případě anthokyany). Tyto cizorodé látky mohou mít jednak pozitivní účinek na zdravotní stav organismů, příkladem je právě antioxidační účinek, nebo obecně řečeno, látky pozitivně ovlivňující homeostázu organismů. Na druhé straně je nutné zmínit, že cizorodé látky mohou působit na organismus negativně. V této souvislosti jsme se zaměřili na studium vybraných enzymů podílejících se na metabolismu xenobiotik, na cytochromy P450, protože se podílejí na odstranění cizorodých látek z organismu.

### a) Podávání barevných pšeníc UC66049 a Skorpion samcům potkana

V této studii jsme sledovali účinky střednědobé konzumace ARW na vybrané enzymové a neenzymové endogenní antioxidanty a vybrané enzymy první fáze metabolismu cizorodých látek u potkanů.

#### *I. Ovlivnění faktorů oxidačního stresu u potkanů*

Skupiny potkanů, které byly krmeny dietou složenou z barevných pšeníc, měly zvýšenou celkovou antioxidační kapacitu (Obrázek 3) a celkové množství volných -SH skupin v krevní plazmě (Tabulka 15). Zvýšení obou těchto parametrů může působit jako obrana před volnými radikály. Enzymatické ani neenzymatické parametry oxidačního stresu naměřené v potkaních erytrocytech se nelišily od kontroly (Tabulka 16). Při měření těchto parametrů byla zjištěna velká variabilita hodnot mezi jednotlivými zvířaty, a proto naměřené parametry nebyly nakonec statisticky významné.

Nárůst celkové antioxidační kapacity (Obrázek 3) odpovídá zjištěním Janšákové a kol.<sup>319</sup>, kteří rovněž pozorovali zvýšenou antioxidační kapacitu plazmy potkanů krmených dietou bohatou na anthokyany. Mírný nárůst hodnoty antioxidační kapacity je běžně spojován s lepší ochranou před reaktivními formami kyslíku. V našem experimentu

měly vzorky krevní plazmy o 20 až 40 % vyšší antioxidační kapacitu než kontrola (Obrázek 3). Na druhé straně je třeba vzít v úvahu, že studované pšenice neměly jen zvýšený obsah anthokyanů. Obsahovaly rovněž jiné polyfenoly, zejména fenolové kyseliny<sup>320,321</sup>. Polyfenoly se hojně vyskytují v ARW a fenolové kyseliny tvoří většinu polyfenolů v barevných pšenicích<sup>320</sup>. Pšenice Skorpion má vyšší obsah např. ferulové, vanilové a *p*-kumarové kyseliny oproti pšenici UC66049 a kontrolní pšenici Bohemia. Fenolové kyseliny mohou vzniknout rozkladem jiných polyfenolů působením mikroorganismů ve střevě<sup>4</sup>. Studie Villela-Castrejón a kol.<sup>322</sup> se zabývala vlivem ferulové kyseliny *in vitro* na zvýšení hladiny antioxidační kapacity savčích buněk. Právě v krevní plazmě potkanů krmených pšenicemi s vyšším obsahem ferulové kyseliny (UC66049, Skorpion) došlo k přímo úměrnému zvýšení antioxidační kapacity.

## II. Ovlivnění aktivit a exprese mRNA potkaních CYP

Experiment *in vitro* provedený s anthokyanem a anthokyanidinem (bez cukerné složky) na lidských jaterních mikrosomech prokázal snížení aktivit CYP<sup>323</sup>. U jiné *in vitro* studie, tentokrát provedené na hepatocytech byl podáním anthokyanů indukován pouze enzym CYP1A1, který je regulován prostřednictvím AhR<sup>324</sup>. Výsledky námi provedeného *in vivo* experimentu na potkanech krmených ARW vyšly odlišně od zmíněných studií *in vitro*. Exprese mRNA jednotlivých CYP byla snížena pouze u podrodiny CYP2B. Na druhé straně vykazovala rostoucí tendenci u podrodin CYP3A a to u skupiny zvířat, kterým byla podávána pšenice Skorpion. Exprese mRNA byla rovněž zvýšena u podrodin CYP2C a CYP1A, ale u skupiny krmené UC66049 (Obrázek 5). Aktivity potkaních jaterních CYP byly významně zvýšeny u CYP1A2, CYP3A4, CYP2E1 a podrodiny CYP2C (Obrázek 4). Nejvýznamnější nárůst aktivit byl u skupiny potkanů krmených UC66049. Jediný významný pokles v aktivitě CYP byl pozorován u podrodiny enzymů CYP2B, který odpovídal poklesu exprese mRNA<sup>53</sup>. Pozorované změny exprese mRNA CYP1A, CYP2E1 a CYP3A mohou být regulovány receptory AhR, PXR a WNT/b-kateninové dráhy<sup>325,326</sup>.

V případech, kdy byly zjištěny rozdíly v expresi mRNA a naměřenými aktivitami CYP, byla velikost rozdílů malá, přičemž největší nárůst činil 55 %. Což je malá hodnota při srovnání s řádovými změnami způsobenými silnými induktory CYP. S ohledem na tuto skutečnost naše studie nenaznačuje, že modrá pšenice bude mít významný vliv na metabolismus xenobiotik a léčiv prostřednictvím CYP.

## b) Podávání borůvkového nápoje (*Vaccinium myrtillus* L.) samecům potkana

Borůvky mají celou řadu zdravích prospěšných účinků. V naší práci jsme se zaměřili na to, zda dlouhodobé nebo nadměrné užívání borůvkového extraktu (obzvláště ve formě doplňků stravy) může v kombinaci s užíváním léčiv způsobit vedlejší účinky. Samci potkanů byli napájeni pitnou vodou (kontrolní skupina) a totožnou vodou s rozpuštěným extraktem z borůvek. Byl zkoumán vliv nižší ( $0,15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a vyšší ( $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) koncentrace extraktu z borůvek na faktory oxidačního stresu a expresi a aktivitu vybraných CYP ve dvou časových intervalech – po dobu 29 resp. 58 dní.

### *I. Ovlivnění faktorů oxidačního stresu u potkanů*

Celková antioxidační kapacita krevní plazmy potkanů napájených borůvkovým nápojem se příliš nelišila od kontroly až na skupinu napájenou koncentrací  $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  po dobu 29 dnů (Obrázek 6). Podávání borůvkového nápoje neovlivnilo parametry oxidačního stresu ani hladiny antioxidantů v plazmě. Po srovnání naměřených hodnot s referenčními hodnotami pro potkany kmene *Wistar*<sup>327–329</sup> nevykazuje pravidelná konzumace borůvek ani prospěšné ani škodlivé účinky.

### *II. Ovlivnění aktivit a exprese mRNA potkaních CYP*

Hlavním zájmem této studie bylo posoudit možné účinky borůvkového nápoje na expresi a aktivitu enzymů metabolismu cizorodých látek, protože tato vědní oblast nebyla ještě úplně prozkoumána. U potkanů napájených nižší i vyšší koncentrací borůvkového nápoje po dobu 29 dnů byla pozorována zvýšená aktivita CYP2E1 a CYP2C11 (Obrázek 7a). Zvýšená aktivita CYP2E1 je nežádoucí, protože CYP2E1 při své činnosti uvolňuje superoxid a hydrogenperoxydy zodpovědné za nárůst oxidačního stresu<sup>52</sup>. Nezměněné hodnoty hladin -SH skupin a TBARS naměřených v plazmě a taky hladin GSH a TBARS stanovených v erythrocytech potkanů pijících borůvkový nápoj naznačují, že konzumace borůvkového nápoje i přes zvýšenou aktivitu CYP2E1 tvorbu oxidantů v organismu nezvýšila. Aktivita CYP2C11, strukturně podobného lidskému CYP2C9, metabolizujícího celou řadu léčiv od antikoagulancií (*S*-WARF), přes léky proti úzkosti (fenytoin) a diabetu (sulfonylurea) až po nesteroidní protizánětlivé léky (naproxen, DF)<sup>330</sup>, se zvýšila. Zvýšená aktivita CYP2C9 vyvolaná podáváním borůvkového nápoje může způsobit mírné snížení účinnosti výše zmíněných léčiv. Schopnost anthokyanů zvyšovat potkaní CYP2C11 byla už dříve popsána Ibrahimem a kol.<sup>330</sup>. V našem experimentu měli

potkání napájení vyšší koncentrací borůvkového nápoje po dobu 58 dní mírně sníženy aktivity CYP2E1 a CYP2C11 (Obrázek 7b). Z toho vyplývá, že inhibiční účinky u dlouhodobé konzumace borůvkového nápoje převážily nad indukcí těchto enzymů při krátkodobé aplikaci. Pravidelné podávání borůvkového nápoje po dobu 58 dní mírně zvýšilo také aktivitu CYP3A2 (u  $0,15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a snížilo aktivitu CYP1A2 (u  $1,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Na základě naměřených výsledků je možno předpokládat, že změna aktivity CYP vyvolaná konzumací borůvkového nápoje je pouze mírná a nijak významně neovlivní klinické hodnoty subjektů, kteří borůvkový nápoj konzumují dlouhodobě.

### c) Podávání barevné pšenice Karkulka samicím králíka

Králíci jsou dalším zvířecím modelem vhodným pro studium vlivu konzumace stravy bohaté na anthokyany na faktory oxidačního stresu a CYP. Bogaards a kol.<sup>114</sup> zjistili, že králíci jsou vhodným modelem pro studium aktivity CYP1A pomocí substrátu ETRR u lidí.

#### *I. Ovlivnění faktorů oxidačního stresu u králíčích samic*

Plazma králíčích samic měla významně zvýšenou hodnotu FRAP u skupiny krmené ARW ve srovnání se skupinou krměnou kontrolní pšenicí (Obrázek 9).

Faktory oxidačního stresu (s výjimkou aktivity GST) byly u obou experimentálních skupin velice podobné (Tabulka 20). Tyto výsledky se shodují s výsledky studie Choi a kol.<sup>331</sup>, kde extrakt ze slupek nebo semen hroznů bohatý na anthokyany udržoval hodnoty antioxidačních parametrů králíků na dietě s vysokým obsahem tuků na hodnotách podobných kontrole. Extrakt ze slupky hroznů snižoval aktivitu GST u studovaných králíků podobně jako v našem experimentu.

#### *II. Ovlivnění aktivit králíčích jaterních CYP*

Aktivity CYP naměřené u samic králíka se nijak významně nelišily mezi kontrolou a skupinou krměnou ARW (Obrázek 10), což naznačuje, že konzumace barevných pšenic nijak neovlivňuje aktivitu CYP.

#### d) Podávání barevné pšenice Arasajta RU 687-12 slepicím

Drůbež a vajíčka jsou často konzumovanou složkou naší potravy a proto informace, jestli podávání ARW může ovlivnit zdravotní stav slepic je velice důležitá pro stanovení zdraví prospěšnosti nebo aspoň nezávadnosti takovéto stravy. Podobně jako u předchozích zvířecích modelů byl sledován vliv konzumace barevné pšenice, tentokrát Arasajty RU 687-12, na aktivitu, expresi mRNA a proteinů jaterních CYP u slepic.

##### *I. Ovlivnění faktorů oxidačního stresu u nosnic*

Nosnice krmené barevnými pšenicemi měly oproti kontrole zvýšenu hodnotu FRAP plazmy (Obrázek 11).

##### *II. Ovlivnění aktivit, mRNA a proteinové exprese CYP u nosnic*

Slepice krmené barevnou pšenicí Arasajta RU 687-12 měly stejnou aktivitu CYP3A37 (6 $\beta$ OHTST) jako kontrola (Obrázek 12). Tento poznatek byl v souladu s nezměněnou hladinou exprese mRNA CYP3A37 (Obrázek 13). Naopak u jiného možného substrátu CYP3A37 (DZ; metabolit 3OHDZ) byla aktivita zvýšena o téměř 37 % (Obrázek 12). Toto zvýšení může být vysvětleno tím, že jako substrát byla použita látka ze skupiny benzodiazepinů, která by podle Hua<sup>311</sup> mohla být metabolizována více kuřecími CYP2H1 a CYP2H2 než CYP3A37. V současnosti jsou CYP2H1 a CYP2H2 u podtřídy ptáci nově označovány jako CYP2C23a a CYP2C23b<sup>234</sup>. Po použití protilátky na lidský CYP2B6, byla u skupiny kuřat krmených Arasajtou pozorována zvýšená exprese blíže nespécifikovaného proteinu. Hladina metabolitu diazepam (3OHDIAZ) byla zvýšena u skupiny krmené barevnou pšenicí, což bylo rozdílné od hladiny 6 $\beta$ OHTST metabolizovaného kuřecím CYP3A37<sup>266</sup>. Rovněž DF, substrát CYP2C u lidí, měl vyšší hladiny obou hydroxy metabolitů u skupiny krmené ARW.



## 7) Závěry

Předkládaná disertační práce se zabývá vlivem přírodních anthokyanů na biotransformační a antioxidační enzymy. Byl sledován vliv pšenice bohatých na anthokyaniny popř. borůvkového extraktu na faktory oxidačního stresu a vybrané jaterní CYP jak na aktivity, tak na expresi mRNA a případně expresi proteinu těchto enzymů u potkana, králíka nebo slepice.

Na základě stanovených cílů bylo dosaženo těchto výsledků:

### a) Podávání barevných pšenic UC66049 a Skorpion samcům potkana

- Potkani krmeni barevnými pšenicemi měli oproti kontrole zvýšenu antioxidační kapacitu plazmy o 25 % (pšenice UC66049) a o 31 % (pšenice Skorpion).
- Konzumace barevné pšenice Skorpion zvýšila hodnotu thiolových skupin o 25 %.
- Aktivity CYP1A2, CYP2E1 a CYP3A2 byly u skupiny krmené pšenicí UC66049 zvýšeny v rozmezí 25 až 47 %. Jen aktivita CYP2B1/2 klesla o 48 %.
- Aktivity CYP u skupiny krmené pšenicí Skorpion byly zvýšeny v rozmezí 24-32 % u CYP2C6, CYP2C11, CYP2E1 a CYP3A2 (metabolit 3-hydroxydiazepam).
- Zdravotní stav experimentálních zvířat byl po celou dobu experimentu dobrý bez jakýchkoliv zdraví ovlivňujících změn. I přes mírné až střední změny (aktivita CYP2E1) nebyly pozorovány žádné fyziologické rozdíly mezi skupinami experimentálních zvířat.

### b) Podávání borůvkového nápoje (*Vaccinium myrtillus* L.) samcům potkana

- Potkani napájení vyšší koncentrací borůvkového nápoje po dobu 29 dnů měli oproti kontrole celkovou antioxidační kapacitu plazmy sníženu o 27 %.
- Aktivity CYP2C11 a CYP2E1 byly u potkanů napájených borůvkovým nápojem po dobu 29 dní zvýšeny u obou podávaných koncentrací v rozmezí 22 až 31 %.
- U potkanů napájených borůvkovým nápojem o vyšší koncentraci po dobu 58 dní byly mírně sníženy aktivity CYP1A2, CYP2C11 a CYP2E1. Pouze aktivita CYP3A2 u skupiny napájené nižší koncentrací borůvkového nápoje byla mírně zvýšena.
- U potkanů napájených vyšší koncentrací borůvkového nápoje po dobu 29 dní byla exprese mRNA zvýšena o 38 % (CYP2A1), 92 % (CYP2D2) a 159 % (CYP2E1).
- Konzumace borůvkového nápoje o vysoké koncentraci po dobu 29 dní způsobila snížení celkové antioxidační kapacity plazmy a mírné až střední (CYP2E1) zvýšení

aktivit a exprese mRNA potkaních jaterních CYP. Zdravotní stav potkanů byl po celou dobu experimentu dobrý, a proto předpokládáme, že konzumace borůvkového nápoje nepoškozovala zdravé jedince. Pozor je potřeba dát na konzumaci borůvek v kombinaci s užíváním některých léčiv metabolizovaných hlavně enzymem CYP2E1.

#### c) Podávání barevné pšenice Karkulka samicím králíka

- Samice králíka krmené barevnou pšenicí Karkulka měly oproti kontrole snížení aktivitu GST o 21 %.
- Aktivity králíčích jaterních CYP se rovněž výrazně nelišily od kontroly. Pouze u aktivit CYP2C3 (6 $\beta$ -hydroxytestosteron), CYP2C (*N*-desmethyldiazepam), CYP3A6/2C (3-hydroxydiazepam) byl pozorován jistý pokles (statisticky nesignifikantní) oproti kontrole.
- Podávání barevné pšenice Karkulka samicím králíka nezpůsobilo žádné statisticky významné změny v sledovaných parametrech až na pokles aktivity GST. Zdravotní stav králíčích samic byl po celou dobu experimentu beze změn, a proto můžeme potvrdit, že konzumace barevných pšenic nezpůsobila žádné negativní následky na zdraví experimentálních zvířat.

#### d) Podávání barevné pšenice Arasajta RU 687-12 slepicím

- Slepice krmené barevnou pšenicí Arasajta RU 687-12 měly oproti kontrole zvýšení hladinu celkové antioxidační kapacity plazmy o 46 %.
- Skupina krmená Arasajtou RU 687-12 měla zvýšení aktivitu jaterních CYP2D49 o 47 % (odpovídající lidské 2D6) a 37 % (odpovídající podrodině 3A u lidí, metabolit 3-hydroxydiazepam) a 29 % (odpovídající podrodině 2C u lidí). Aktivita CYP2E1 byla snížena o 15 %.
- Exprese proteinů detekovaných s použitím protilátky proti lidské CYP2B6 byla oproti kontrole o 122 % vyšší.
- Zdravotní stav kontrolní skupiny byl totožný se slepicemi krmenými Arasajtou RU 687-12, které měly oproti kontrole vyšší celkovou antioxidační kapacitu plazmy a expresi proteinu detekovaného pomocí lidské protilátky proti CYP2B6. Konzumace barevné pšenice Arasajta RU 687-12 nezpůsobila žádné zdravotní problémy studovaným slepicím.

## 8) Seznam prací vztahujících se k disertaci

### Publikace:

- (1) Roztočilová, A.; Šťastník, O.; Pavlata, L.; Mrkvicová, E.; Prokop, J.; Anzenbacherová, E. The influence of feeding wheat with blue aleurone on biochemical parameters, antioxidant activity and performance of broiler chickens. *MendelNet*, 2017, 82, 266–271
- (2) Prokop, J.; Anzenbacher, P.; Mrkvicová, E.; Pavlata, L.; Zapletalová, I.; Šťastník, O.; Martinek, P.; Kosina, P.; Anzenbacherová, E. In vivo evaluation of effect of anthocyanin-rich wheat on rat liver microsomal drug-metabolizing cytochromes P450 and on biochemical and antioxidant parameters in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2018, 122, 225–233. IF<sub>2018</sub> = 3,775
- (3) Prokop, J.; Lněničková, K.; Cibiček, N.; Kosina, P.; Tománková, V.; Jourová, L.; Láníčková, T.; Skálová, L.; Szotáková, B.; Anzenbacher, P.; Zapletalová, I.; Rácová, Z.; Anzenbacherová, E.; Ulrichová, J. Effect of bilberry extract (*Vaccinium myrtillus* L.) on drug-metabolizing enzymes in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2019, 129, 382–390. IF<sub>2019</sub> = 4,679
- (4) Šťastník, O.; Mrkvicová, E.; Pavlata, L.; Anzenbacherová, E.; Prokop, J.; Roztočilová, A.; Umlášková, B.; Novotný, J.; Metnarová, E.; Vyhnánek, T.; Trojan, V. Purple wheat as a source of anthocyanins and its effect on the metabolism of rabbits. *Vet. Med.* 2019, 64, 539–546. IF<sub>2019</sub> = 0,588

### Prezentace na konferencích:

- (1) Prokop, J.; Anzenbacher, P.; Mrkvicová, E.; Pavlata, L.; Šťastník, O.; Martinek, P.; Anzenbacherová, E. Vliv konzumace pšenice se zvýšeným obsahem antokyanů na hladinu a aktivitu cytochromů P450 u experimentálních zvířat. XXV. *Biochemický sjezd*, 13. – 16. 9. 2016, Praha, Česká republika.
- (2) Prokop, J.; Anzenbacher, P.; Zapletalová, I.; Cibiček, N.; Kosina, P.; Matušková, Z.; Jourová, L.; Tománková, V.; Rostislav, V.; Ulrichová, J.; Anzenbacherová, E. Influence of different concentrations of bilberry extract on rat cytochromes P450 and antioxidative status. *3<sup>rd</sup> International conference on natural products utilization: From plants to pharmacy shelf*, 18. – 21. 10. 2017, Bansko, Bulharsko.
- (3) Anzenbacherová, E.; Prokop, J.; Anzenbacher, P.; Zapletalová, I.; Cibiček, N.; Kosina, P.; Matušková, Z.; Snášelová, S.; Jourová, L.; Ulrichová, J. Influence of

- polyphenolic compounds in blueberry extract on activities of P450 in rats. 22. Mezioborová toxikologická konference – TOXCON 2017, 21. – 23. 6. 2017, Plzeň, Česká republika.
- (4) Anzenbacherová, E.; Prokop, J.; Zapletalová, I.; Šťastník, O.; Pavlata, L.; Mrkvicová, E.; Martinek, P.; Anzenbacher, P. Anthocyanins and biotransformation enzymes in hen (*Gallus gallus f. domestica*). 22. Mezioborová toxikologická konference – TOXCON 2017, 21. – 23. 6. 2017, Plzeň, Česká republika.
- (5) Lněničková, K.; Láníčková, T.; Ambrož, M.; Skálová, L.; Szotáková, B.; Anzenbacherová, E.; Zapletalová, I.; Tománková, V.; Cibiček, N.; Kosina, P.; Prokop, J.; Ulrichová, J. Effect of bilberry extract (*Vaccinium myrtillus L.*) on conjugating enzymes in rats. 23<sup>rd</sup> Interdisciplinary Toxicological Conference TOXCON 2018, 20.– 22. 6. 2018, Stará Lesná, Slovenská republika.
- (6) Kosina, P.; Prokop, J.; Šťastník, O.; Zapletalová, I.; Pavlata, L.; Vavrečková, M.; Mrkvicová, E.; Martinek, P.; Anzenbacherová, E. The effect of anthocyanin-rich wheat on biochemical and antioxidant parameters, liver microsomal drug-metabolizing cytochromes P450 in rabbits in vivo. 6<sup>th</sup> World Congress on Medicinal and Aromatic Plants, 13. – 17. 11. 2019, Famagusta, Northern Cyprus.
- (7) Prokop, J.; Anzenbacher, P.; Zapletalová, I.; Mrkvicová, E.; Šťastník, O.; Martinek, P.; Anzenbacherová, E. Interspecies differences of liver microsomal CYP activities in animals fed by anthocyanin rich wheats. TOXCON 2020 – 25<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference, 3. – 5. 9. 2020, Praha, Česká republika.

## 9) Ostatní práce

Prezentace na konferencích:

- (1) Zapletalová, I.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherová E.; Prokop, J.; Pavlata, L.; Mrkvicová, E. Influence of *Cannabis sativa* and *Silybum marianum* on expression of cytochromes P450 and selected transporters in rat liver, 67. Česko-Slovenské farmakologické dni, 2. – 4. 10. 2017, Stará Lesná, Slovenská republika
- (2) Prokop, J.; Anzenbacher, P.; Šťastník, O.; Pavlata, L.; Mrkvicová, E.; Martinek, P.; Zapletalová, I.; Anzenbacherová, E. Influence of different diets and ways of nutrition on level and activity of cytochrome P450 in *Gallus gallus f. domestica* (chicken).

22. Mezioborová toxikologická konference – TOXCON 2017, 21. – 23. 6. 2017, Plzeň, Česká republika.

- (3) Prokop, J.; Anzenbacher, P.; Zapletalová, I.; Šťastník, O.; Pavlata, L.; Mrkvicová, E.; Martinek, P.; Anzenbacherová, E. Influence of gluten free diet on rat liver cytochromes P450. *19<sup>th</sup> International Congress on Nutrition & Health*, 12. – 14. 4. 2018, Amsterdam, Nizozemsko.

## 10) Reference

- (1) Li, X.; Zhang, Z.; Zhang, X.; Cheng, J.; Liu, D.; Yan, Y.; Wang, H. Transcriptomic Analysis of the Life-Extending Effect Exerted by Black Rice Anthocyanin Extract in *D. Melanogaster* through Regulation of Aging Pathways. *Exp. Gerontol.* **2019**, *119*, 33–39.
- (2) Majid, M.; Nasir, B.; Zahra, S. S.; Khan, M. R.; Mirza, B.; Haq, I. Ipomoea Batatas L. Lam. Ameliorates Acute and Chronic Inflammations by Suppressing Inflammatory Mediators, a Comprehensive Exploration Using in Vitro and in Vivo Models. *BMC Complement. Altern. Med.* **2018**, *18* (1), 1–20.
- (3) Lee, Y. M.; Yoon, Y.; Yoon, H.; Park, H. M.; Song, S.; Yeum, K. J. Dietary Anthocyanins against Obesity and Inflammation. *Nutrients* **2017**, *9* (10), 1–15.
- (4) Esposito, D.; Damsud, T.; Wilson, M.; Grace, M. H.; Strauch, R.; Li, X.; Lila, M. A.; Komarnytsky, S. Black Currant Anthocyanins Attenuate Weight Gain and Improve Glucose Metabolism in Diet-Induced Obese Mice with Intact, but Not Disrupted, Gut Microbiome. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (27), 6172–6180.
- (5) Chu, W.; Cheung, S. C. M.; Lau, R. A. W.; Benzie, I. F. F. Chapter 4 Bilberry (*Vaccinium Myrtillus* L.). In *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*; Benzie, I. F. F., Wachtel-Galor, S., Eds.; CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, 2011.
- (6) Williams, C. M.; El Mohsen, M. A.; Vauzour, D.; Rendeiro, C.; Butler, L. T.; Ellis, J. A.; Whiteman, M.; Spencer, J. P. E. Blueberry-Induced Changes in Spatial Working Memory Correlate with Changes in Hippocampal CREB Phosphorylation and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Levels. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45* (3), 295–305.
- (7) Ficco, D. B. M.; De Simone, V.; Colecchia, S. A.; Pecorella, I.; Platani, C.; Nigro, F.; Finocchiaro, F.; Papa, R.; De Vita, P. Genetic Variability in Anthocyanin Composition and Nutritional Properties of Blue, Purple, and Red Bread (*Triticum Aestivum* L.) and Durum (*Triticum Turgidum* L. Ssp. *Turgidum* Convar. *Durum*) Wheats. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (34), 8686–8695.
- (8) Cotoras, M.; Vivanco, H.; Melo, R.; Aguirre, M.; Silva, E.; Mendoza, L. In Vitro and in Vivo Evaluation of the Antioxidant and Prooxidant Activity of Phenolic Compounds Obtained from Grape (*Vitis Vinifera*) Pomace. *Molecules* **2014**, *19* (12), 21154–21167.

- (9) Eghbaliferiz, S.; Iranshahi, M. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. *Phyther. Res.* **2016**, *1391* (May), 1379–1391.
- (10) Shimada, T. Inhibition of Carcinogen-Activating Cytochrome P450 Enzymes by Xenobiotic Chemicals in Relation to Antimutagenicity and Anticarcinogenicity. *Toxicol. Res.* **2017**, *33* (2), 79–96.
- (11) Puntarulo, S.; Cederbaum, A. I. Production of Reactive Oxygen Species by Microsomes Enriched in Specific Human Cytochrome P450 Enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *24* (7–8), 1324–1330.
- (12) Lin, D.; Xiao, M.; Zhao, J.; Li, Z.; Xing, B.; Li, X.; Kong, M.; Li, L.; Zhang, Q.; Liu, Y.; et al. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules* **2016**, *21* (10).
- (13) Prior, R. L. Anthocyanins: Understanding Their Absorption and Metabolism. In *Flavonoids and related compounds. Bioavailability and function.*; Spencer, J. P., Crozier, A., Eds.; CRC Press, Taylor&Francis Group: Boca Raton, 2012; pp 79–92.
- (14) Cooke, D.; Steward, W. P.; Gescher, A. J.; Marczylo, T. Anthocyanins from Fruits and Vegetables - Does Bright Colour Signal Cancer Chemopreventive Activity? *Eur. J. Cancer* **2005**, *41* (13), 1931–1940.
- (15) Brouillard, R. Flavonoids and Flower Colour. In *The Flavonoids*; Harborne, J. B., Ed.; Springer: Boston, 1988; pp 525–538.
- (16) Fossen, T.; Cabrita, L.; Andersen, O. M. Colour and Stability of Pure Anthocyanins Influenced by pH Including the Alkaline Region. *Food Chem.* **1998**, *63* (4), 435–440.
- (17) Wallace, T. C.; Giusti, M. M. Anthocyanins. *Adv. Nutr* **2015**, *6* (5), 620–622.
- (18) Cao, G.; Prior, R. L. Anthocyanins Are Detected in Human Plasma after Oral Administration of an Elderberry Extract. *Clin. Chem.* **1999**, *45* (4), 574–576.
- (19) Cao, G.; Muccitelli, H. U.; Sánchez-Moreno, C.; Prior, R. L. Anthocyanins Are Absorbed in Glycated Forms in Elderly Women: A Pharmacokinetic Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73* (5), 920–926.
- (20) Talavera, S.; Felgines, C.; Texier, O.; Besson, C.; Lamaison, J.; Rémésy, C. Anthocyanins Are Efficiently Absorbed from the Stomach in Anesthetized Rats. *J. Nutr.* **2003**, *133* (12), 4178–4182.
- (21) Prior, R. L.; Wu, X. Anthocyanins: Structural Characteristics That Result in Unique Metabolic Patterns and Biological Activities. *Free Radic. Res.* **2006**, *40* (10), 1014–

1028.

- (22) González-Barrio, R.; Borges, G.; Mullen, W.; Crozier, A. Bioavailability of Anthocyanins and Ellagitannins Following Consumption of Raspberries by Healthy Humans and Subjects with an Ileostomy. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (7), 3933–3939.
- (23) Marczylo, T. H.; Cooke, D.; Brown, K.; Steward, W. P.; Gescher, A. J. Pharmacokinetics and Metabolism of the Putative Cancer Chemopreventive Agent Cyanidin-3-Glucoside in Mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2009**, *64* (6), 1261–1268.
- (24) Talavéra, S.; Felgines, C.; Texier, O.; Besson, C.; Gil-Izquierdo, A.; Lamaison, J.-L.; Rémésy, C. Anthocyanin Metabolism in Rats and Their Distribution to Digestive Area, Kidney, and Brain. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (10), 3902–3908.
- (25) Garcia-Alonso, M.; Minihane, A. M.; Rimbach, G.; Rivas-Gonzalo, J. C.; de Pascual-Teresa, S. Red Wine Anthocyanins Are Rapidly Absorbed in Humans and Affect Monocyte Chemoattractant Protein 1 Levels and Antioxidant Capacity of Plasma. *J. Nutr. Biochem.* **2009**, *20* (7), 521–529.
- (26) Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M. de L.; Páez-Hernández, M. E.; Rodríguez, J. A.; Galán-Vidal, C. A. Chemical Studies of Anthocyanins: A Review. *Food Chem.* **2009**, *113* (4), 859–871.
- (27) Clifton, P. M. Effect of Grape Seed Extract and Quercetin on Cardiovascular and Endothelial Parameters in High-Risk Subjects. *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**, *2004* (5), 272–278.
- (28) Hou, D. X.; Fujii, M.; Terahara, N.; Yoshimoto, M. Molecular Mechanisms behind the Chemopreventive Effects of Anthocyanidins. *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**, *2004* (5), 321–325.
- (29) Matsui, T.; Ebuchi, S.; Kobayashi, M.; Fukui, K.; Sugita, K.; Terahara, N.; Matsumoto, K. Anti-Hyperglycemic Effect of Diacylated Anthocyanin Derived from Ipomoea Batatas Cultivar Ayamurasaki Can Be Achieved through the  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Action. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (25), 7244–7248.
- (30) Harvey, R. A. Pentose Phosphate Pathway and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate. In *Lippincott's illustrated reviews: Biochemistry*; Lippincott Williams & Wilkins, 2011; p 150.
- (31) Turrens, J. F. Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species. *J. Physiol.* **2003**, *552* (2), 335–344.



- (32) Andreyev, A. Y.; Kushnareva, Y. E.; Starkov, A. A. Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Biochem.* **2005**, *70* (2), 200–214.
- (33) Giorgio, M.; Trinei, M.; Migliaccio, E.; Pelicci, P. G. Hydrogen Peroxide: A Metabolic by-Product or a Common Mediator of Ageing Signals? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8* (9), 722–728.
- (34) Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health. *Pharmacogn. Rev.* **2010**, *4* (8), 118.
- (35) Stefanis, L.; Burke, R. E.; Greene, L. A. Apoptosis in Neurodegenerative Disorders. *Curr. Opin. Neurol.* **1997**, *10* (4), 299–305.
- (36) Perillo, B.; Di Donato, M.; Pezone, A.; Di Zazzo, E.; Giovannelli, P.; Galasso, G.; Castoria, G.; Migliaccio, A. ROS in Cancer Therapy: The Bright Side of the Moon. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52* (2), 192–203.
- (37) Bindoli, A.; Rigobello, M. P. *Peroxidase Biochemistry and Redox Signaling*, 2nd ed.; Elsevier Inc., 2013.
- (38) Heck, D. E.; Shakarjian, M.; Kim, H. D.; Laskin, J. D.; Vetrano, A. M. Mechanisms of Oxidant Generation by Catalase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1203*, 120–125.
- (39) Girotti, A. W. Lipid Hydroperoxide Generation, Turnover, and Effector Action in Biological Systems. *J. Lipid Res.* **1998**, *39*, 1529–1542.
- (40) Langdon, R. G. Properties and Mechanism of Action of Purified Glutathione Reductase. *BBA - Biochim. Biophys. Acta* **1958**, *30* (2), 432–433.
- (41) Hayes, J. D.; Flanagan, J. U.; Jowsey, I. R. Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *45*, 51–88.
- (42) Ewing, J. F.; Janero, D. R. Microplate Superoxide Dismutase Assay Employing a Nonenzymatic Superoxide Generator. *Anal. Biochem.* **1995**, *232* (2), 243–248.
- (43) Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol.* **1978**, *52*, 302–310.
- (44) Wu, G.; Fang, Y. Z.; Yang, S.; Lupton, J. R.; Turner, N. D. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J. Nutr.* **2004**, *134* (3), 489–492.
- (45) Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E.; Guengerich, P. F.; Strassburg, C. P.; Kalthoff, S.; Coughtrie, M. W. H.; Dostalek, M.; Stark, A.-K.; Yan, B.; Nies, A. T.; et al. *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*, First.; Anzenbacher, P., Zanger, U. M., Eds.; Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, 2012.
- (46) Guengerich, P. F.; Waterman, M. R.; Egli, M. Recent Structural Insights into

- Cytochrome P450 Function. *Trends Pharmacol. Sci.* **2016**, *37* (8), 625–640.
- (47) Evans, W. E.; Relling, M. V. Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. *Science* (80-. ). **1999**, *286*, 487–491.
- (48) Nebert, D. W.; Dieter, M. Z. The Evolution of Drug Metabolism. *Pharmacology* **2000**, *61* (3), 124–135.
- (49) Jancova, P.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E. Phase II Drug Metabolizing Enzymes. *Biomed. Pap.* **2010**, *154* (2), 103–116.
- (50) Guengerich, P. F. Human Cytochrome P450 Enzymes. In *Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry.*; Ortiz de Montellano, P. R., Ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 2004; pp 377–530.
- (51) Kraus, D.; Rokitta, D.; Fuhr, U.; Tomalik-Scharte, D. The Role of Human Cytochrome P450 Enzymes in Metabolism of Acrylamide in Vitro. *Toxicol. Mech. Methods* **2013**, *23*, 346–351.
- (52) Aviram, M.; Kent, U. M.; Hollenberg, P. F. Microsomal Cytochromes P450 Catalyze the Oxidation of Low Density Lipoprotein. *Atherosclerosis* **1999**, *143* (2), 253–260.
- (53) Prokop, J.; Anzenbacher, P.; Mrkvicová, E.; Pavlata, L.; Zapletalová, I.; Šťastník, O.; Martinek, P.; Kosina, P.; Anzenbacherová, E.; Ondřej, Š.; et al. In Vivo Evaluation of Effect of Anthocyanin-Rich Wheat on Rat Liver Microsomal Drug-Metabolizing Cytochromes P450 and on Biochemical and Antioxidant Parameters in Rats. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *122*, 225–233.
- (54) Prokop, J.; Lněničková, K.; Cibiček, N.; Kosina, P.; Tománková, V.; Jourová, L.; Láníčková, T.; Skálová, L.; Szotáková, B.; Anzenbacher, P.; et al. Effect of Bilberry Extract (*Vaccinium Myrtillus* L.) on Drug-Metabolizing Enzymes in Rats. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *129* (May), 382–390.
- (55) Timbrell, J. A. Factors Affecting Toxic Responses: Metabolism. In *Principles of Biochemical Toxicology*; Informa UK Ltd: New York, 2009; pp 75–128.
- (56) Dorokhov, Y. L.; Shindyapina, A. V.; Sheshukova, E. V.; Komarova, T. V. Metabolic Methanol: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiol. Rev.* **2015**, *95* (2), 603–644.
- (57) Nebert, D. W.; Nelson, D. R. P450 Gene Nomenclature Based on Evolution. *Methods Enzymol.* **1991**, *206*, 3–11.
- (58) Lisitsa, A. V.; Gusev, S. A.; Karuzima, I. I.; Archakov, A. I.; Koymans, L. Cytochrome P450 Knowledgebase, Release 2006 Integrated informational resource on cytochromes P450, developed since 1990. Sponsored by Center for Molecular

Design (division of Janssen Pharmaceutica NV) cpd.ibmh.msk.su.

- (59) Nelson, D. R. The Cytochrome P450 Homepage <https://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>.
- (60) Robie-Suh, K.; Robinson, R.; Gelboin, H. V; Guengerich, P. F. Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Is Inhibited by Antibody to Rat Liver Cytochrome P-450. *Science*. **1980**, *208* (4447), 1031–1033.
- (61) Omiecinski, C. J.; Redlich, C. A.; Costa, P. Induction and Developmental Expression of Cytochrome P450IA1 Messenger RNA in Rat and Human Tissues: Detection by the Polymerase Chain Reaction. *Cancer Res*. **1990**, *50* (14), 4315–4321.
- (62) Shimada, T.; Yamazaki, H.; Mimura, M.; Wakamiya, N.; Ueng, Y.-F.; Guengerich, F. P.; Inui, Y.; Guengerich, P. F.; Inui, Y.; Guengerich, F. P. Characterization of Microsomal Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Oxidation of Xenobiotic Chemicals in Human Fetal Livers and Adult Lungs. *Drug Metab. Dispos*. **1996**, *24* (5), 515–522.
- (63) Shimada, T.; Yamazaki, H.; Mimura, M.; Inui, Y.; Guengerich, F. P. Interindividual Variations in Human Liver Cytochrome P-450 Enzymes Involved in the Oxidation of Drugs, Carcinogens and Toxic Chemicals: Studies with Liver Microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. **1994**, *270* (1), 414–423.
- (64) Guengerich, F. P.; Turvy, C. G. Comparison of Levels of Several Human Microsomal Cytochrome P-450 Enzymes and Epoxide Hydrolase in Normal and Disease States Using Immunochemical Analysis of Surgical Liver Samples. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. **1991**, *256* (3), 1189–1194.
- (65) Guengerich, P. F.; Shimada, T.; Yun, C.-H. Roles of Human Liver Cytochrome P4502C and 3A Enzymes in the 3-Hydroxylation of Benzo(a)Pyrene. *Cancer Res*. **1992**, *52* (7), 1868–1874.
- (66) Prough, R. A.; Burke, M. D.; Mayer, R. T. Direct Fluorometric Methods for Measuring Mixed-Function Oxidase Activity. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 1978; Vol. 52, pp 372–377.
- (67) Guo, Z.; Gillam, E. M.; Ohmori, S.; Tukey, R. H.; Guengerich, F. P. Expression of Modified Human Cytochrome P450 1A1 in Escherichia Coli: Effects of 5' Substitution, Stabilization, Purification, Spectral Characterization, and Catalytic Properties. *Arch. Biochem. Biophys*. **1994**, *312* (2), 436–446.
- (68) Tassaneeyakul, W.; Birkett, D. J.; Veronese, M. E.; McManus, M. E.; Tukey, R. H.; Quattrochi, L. C.; Gelboin, H. V; Miners, J. O. Specificity of Substrate and Inhibitor

- Probes for Human Cytochromes P450 1A1 and 1A2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, 265 (1), 401–407.
- (69) Patten, C. J.; Thomas, P. E.; Guy, R. L.; Lee, M.; Gonzalez, F. J.; Guengerich, F. P.; Yang, C. S. Cytochrome P450 Enzymes Involved in Acetaminophen Activation by Rat and Human Liver Microsomes and Their Kinetics. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, 6 (4), 511–518.
- (70) Zhang, Z.-Y.; Kaminsky, L. S. Characterization of Human Cytochromes P450 Involved in Theophylline 8-Hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 50 (2), 205–211.
- (71) Butler, M. A.; Iwasaki, M.; Guengerich, F. P.; Kadlubar, F. F. Human Cytochrome P-450PA (P-450IA2), the Phenacetin O-Deethylase, Is Primarily Responsible for the Hepatic 3-Demethylation of Caffeine and N-Oxidation of Carcinogenic Arylamines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, 86 (20), 7696–7700.
- (72) Distlerath, L. M.; Reilly, P. E.; Martin, M. V.; Davis, G. G.; Wilkinson, G. R.; Guengerich, F. P. Purification and Characterization of the Human Liver Cytochromes P-450 Involved in Debrisoquine 4-Hydroxylation and Phenacetin O-Deethylation, Two Prototypes for Genetic Polymorphism in Oxidative Drug Metabolism. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260 (15), 9057–9067.
- (73) Kaminsky, L. S.; Zhang, Z. Y. Human P450 Metabolism of Warfarin. *Pharmacol. Ther.* **1997**, 73 (1), 67–74.
- (74) Zuber, R.; Anzenbacherová, E.; Anzenbacher, P. Cytochromes P450 and Experimental Models of Drug Metabolism. *J. Cell. Mol. Med.* **2002**, 6 (2), 189–198.
- (75) Fagan, J. B.; Pastewka, J. V.; Chalberg, S. C.; Gozukara, E.; Guengerich, F. P.; Gelboin, H. V. Noncoordinate Regulation of the mRNAs Encoding Cytochromes P-450BNF/MC-B and P-450ISF/BNF-G. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, 244 (1), 261–272.
- (76) Kim, J. H.; Sherman, M. E.; Curriero, F. C.; Guengerich, F. P.; Strickland, P. T.; Sutter, T. R. Expression of Cytochromes P450 1A1 and 1B1 in Human Lung from Smokers, Non-Smokers, and Ex-Smokers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2004**, 199 (3), 210–219.
- (77) Curi-Pedrosa, R.; Daujat, M.; Pichard, L.; Ourlin, J. C.; Clair, P.; Gervot, L.; Lesca, P.; Domergue, J.; Joyeux, H.; Fourtanier, G. Omeprazole and Lansoprazole Are Mixed Inducers of CYP1A and CYP3A in Human Hepatocytes in Primary Culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, 269 (1), 384–392.

- (78) Lucier, G. W.; Nelson, K. G.; Everson, R. B.; Wong, T. K.; Philpot, R. M.; Tiernan, T.; Taylor, M.; Sunahara, G. I. Placental Markers of Human Exposure to Polychlorinated Biphenyls and Polychlorinated Dibenzofurans. *Environ. Health Perspect.* **1987**, *76*, 79–87.
- (79) Loft, S.; Vistisen, K.; Ewertz, M.; Tjønneland, A.; Overvad, K.; Poulsen, H. E. Oxidative DNA Damage Estimated by 8-Hydroxydeoxyguanosine Excretion in Humans: Influence of Smoking, Gender and Body Mass Index. *Carcinogenesis* **1992**, *13* (12), 2241–2247.
- (80) Shimada, T.; Yamazaki, H.; Foroozesh, M.; Hopkins, N. E.; Alworth, W. L.; Guengerich, F. P. Selectivity of Polycyclic Inhibitors for Human Cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11* (9), 1048–1056.
- (81) Shimada, T.; Hayes, C. L.; Yamazaki, H.; Amin, S.; Hecht, S. S.; Guengerich, P. F.; Sutter, T. R. Activation of Chemically Diverse Procarcinogens by Human Cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.* **1996**, *56* (13), 2979–2984.
- (82) Hayes, C. L.; Spink, D. C.; Spink, B. C.; Cao, J. Q.; Walker, N. J.; Sutter, T. R. 17 $\beta$ -Estradiol Hydroxylation Catalyzed by Human Cytochrome P450 1B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93* (18), 9776–9781.
- (83) Shimada, T.; Gillam, E. M. J.; Oda, Y.; Tsumura, F.; Sutter, T. R.; Guengerich, F. P.; Inoue, K. Metabolism of Benzo[a]Pyrene to Trans-7, 8-Dihydroxy-7, 8-Dihydrobenzo[a]Pyrene by Recombinant Human Cytochrome P450 1B1 and Purified Liver Epoxide Hydrolase. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12* (7), 623–629.
- (84) Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G. O.; Slowing, K. V.; Thomas, C. F.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Mehta, R. G.; et al. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. *Science* (80-. ). **1997**, *275* (5297), 218–220.
- (85) Chun, Y.-J.; Kim, S.; Kim, D.; Lee, S.-K.; Guengerich, F. P. A New Selective and Potent Inhibitor of Human Cytochrome P450 1B1 and Its Application to Antimutagenesis. *Cancer Res.* **2001**, *61* (22), 8164–8170.
- (86) Hoffman, S. M. G.; Nelson, D. R.; Keeney, D. S. Organization, Structure and Evolution of the CYP2 Gene Cluster on Human Chromosome 19. *Pharmacogenet. Genomics* **2001**, *11* (8), 687–698.
- (87) Martignoni, M.; Groothuis, G. M. M.; de Kanter, R. Species Differences between Mouse, Rat, Dog, Monkey and Human CYP-Mediated Drug Metabolism, Inhibition and Induction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2006**, *2* (6), 875–894.

- (88) Yun, C. H.; Shimada, T.; Guengerich, F. P. Purification and Characterization of Human Liver Microsomal Cytochrome P-450 2A6. *Mol. Pharmacol.* **1991**, *40* (5), 679–685.
- (89) Nowell, S.; Sweeney, C.; Hammons, G.; Kadlubar, F. F.; Lang, N. P. CYP2A6 Activity Determined by Caffeine Phenotyping: Association with Colorectal Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomarkers* **2002**, *11* (4), 377–383.
- (90) Le Gal, A.; Dréano, Y.; Gervasi, P.-G.; Berthou, F. Human Cytochrome P450 2A6 Is the Major Enzyme Involved in the Metabolism of Three Alkoxyethers Used as Oxyfuels. *Toxicol. Lett.* **2001**, *124* (1–3), 47–58.
- (91) Duescher, R. J.; Elfarra, A. A. Human Liver Microsomes Are Efficient Catalysts of 1, 3-Butadiene Oxidation: Evidence for Major Roles by Cytochromes P450 2A6 and 2E1. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *311* (2), 342–349.
- (92) Godoy, W.; Albano, R. M.; Moraes, E. G.; Pinho, P. R.; Nunes, R. A.; Saito, E. H.; Higa, C.; Filho, I. M.; Krueel, C. D.; Schirmer, C. C.; et al. CYP2A6/2A7 and CYP2E1 Expression in Human Oesophageal Mucosa: Regional and Inter-Individual Variation in Expression and Relevance to Nitrosamine Metabolism. *Carcinogenesis* **2002**, *23* (4), 611–616.
- (93) Yamazaki, H.; Inui, Y.; Yun, C.-H.; Guengerich, F. P.; Shimada, T. Cytochrome P450 2E1 and 2A6 Enzymes as Major Catalysts for Metabolic Activation of N-Nitrosodialkylamines and Tobacco-Related Nitrosamines in Human Liver Microsomes. *Carcinogenesis* **1992**, *13* (10), 1789–1794.
- (94) Xia, X.-Y.; Peng, R.-X.; Yu, J.-P.; Wang, H.; Wang, J. In Vitro Metabolic Characteristics of Cytochrome P-450 2A6 in Chinese Liver Microsomes. *Acta Pharmacol. Sin.* **2002**, *23* (5), 471–476.
- (95) Donato, M. T.; Viitala, P.; Rodriguez-Antona, C.; Lindfors, A.; Castell, J. V.; Raunio, H.; Gómez-Lechón, M. J.; Pelkonen, O. CYP2A5/CYP2A6 Expression in Mouse and Human Hepatocytes Treated with Various in Vivo Inducers. *Drug Metab. Dispos.* **2000**, *28* (11), 1321–1326.
- (96) Zhang, W.; Kilicarslan, T.; Tyndale, R. F.; Sellers, E. M. Evaluation of Methoxsalen, Tranlycypromine, and Tryptamine as Specific and Selective CYP2A6 Inhibitors in Vitro. *Drug Metab. Dispos.* **2001**, *26* (6), 897–902.
- (97) Koenigs, L. L.; Trager, W. F. Mechanism-Based Inactivation of P450 2A6 by Furanocoumarins. *Biochemistry* **1998**, *37* (28), 10047–10061.
- (98) Von Weymarn, L. B.; Zhang, Q. Y.; Ding, X.; Hollenberg, P. F. Effects of 8-

- Methoxypsoralen on Cytochrome P450 2A13. *Carcinogenesis* **2005**, 26 (3), 621–629.
- (99) Mimura, M.; Baba, T.; Yamazaki, H.; Ohmori, S.; Inui, Y.; Gonzalez, F. J.; Guengerich, F. P.; Shimada, T. Characterization of Cytochrome P-450 2B6 in Human Liver Microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **1993**, 21 (6), 1048–1056.
- (100) Hukkanen, J.; Pelkonen, O.; Hakkola, J.; Raunio, H. Expression and Regulation of Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450 (CYP) Enzymes in Human Lung. *Crit. Rev. Toxicol.* **2002**, 32 (5), 391–411.
- (101) Wang, H.; Tompkins, L. CYP2B6: New Insights into a Historically Overlooked Cytochrome P450 Isozyme. *Curr. Drug Metab.* **2008**, 9 (7), 598–610.
- (102) Lamba, V.; Lamba, J.; Yasuda, K.; Strom, S.; Davila, J.; Hancock, M. L.; Fackenthal, J. D.; Rogan, P. K.; Ring, B.; Wrighton, S. A.; et al. Hepatic CYP2B6 Expression: Gender and Ethnic Differences and Relationship to CYP2B6 Genotype and CAR (Constitutive Androstane Receptor) Expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 307 (3), 906–922.
- (103) Donato, M. T.; Castell, J. V.; Gomez-Lechon, M. J. Effect of Model Inducers on Cytochrome P450 Activities of Human Hepatocytes in Primary Culture. *Drug Metab. Dispos.* **1995**, 23 (5), 553–558.
- (104) Chun, J.; Kent, U. M.; Moss, R. M.; Sayre, L. M.; Hollenberg, P. F. Mechanism-Based Inactivation of Cytochromes P450 2B1 and P450 2B6 by 2-Phenyl-2-(1-Piperidiny) Propane. *Drug Metab Dispos* **2000**, 28 (8), 905–911.
- (105) Chang, T. K. H.; Weber, G. F.; Crespi, C. L.; Waxman, D. J. Differential Activation of Cyclophosphamide and Ifosfamide by Cytochromes P-450 2B and 3A in Human Liver Microsomes. *Cancer Res.* **1993**, 53 (23), 5629–5637.
- (106) Gervot, L.; Rochat, B.; Gautier, J. C.; Bohnenstengel, F.; Kroemer, H.; De Berardinis, V.; Martin, H.; Beaune, P.; De Waziers, I. Human CYP2B6: Expression, Inducibility and Catalytic Activities. *Pharmacogenet. Genomics* **1999**, 9 (3), 295–306.
- (107) Gerber, J. G.; Rhodes, R. J.; Gal, J. Stereoselective Metabolism of Methadone N-Demethylation by Cytochrome P4502B6 and 2C19. *Chirality* **2004**, 16 (1), 36–44.
- (108) Baker, M. T.; Olson, M. J.; Wang, Y.; Ronnenberg, W. C.; Johnson, J. T.; Brady, A. N. Isoflurane-Chlorodifluoroethene Interaction in Human Liver Microsomes. Role of Cytochrome P4502B6 in Potentiation of Haloethene Metabolism. *Drug Metab. Dispos.* **1995**, 23 (1), 60–64.

- (109) Rendic, S. Summary of Information on Human CYP Enzymes: Human P450 Metabolism Data. *Drug Metab. Rev.* **2002**, *34* (1–2), 83–448.
- (110) Rae, J. M.; Soukhova, N. V.; Flockhart, D. A.; Desta, Z. Triethylenethiophosphoramidate Is a Specific Inhibitor of Cytochrome P450 2B6: Implications for Cyclophosphamide Metabolism. *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30* (5), 525–530.
- (111) Court, M. H.; Duan, S. X.; Hesse, L. M.; Venkatakrishnan, K.; Greenblatt, D. J. Cytochrome P-450 2B6 Is Responsible for Interindividual Variability of Propofol Hydroxylation by Human Liver Microsomes. *Anesthesiology* **2001**, *94* (1), 110–119.
- (112) Sridar, C.; Kent, U. M.; Notley, L. M.; Gillam, E. M. J.; Hollenberg, P. F. Effect of Tamoxifen on the Enzymatic Activity of Human Cytochrome CYP2B6. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301* (3), 945–952.
- (113) Stiborová, M.; Bořek-Dohalská, L.; Hodek, P.; Mráz, J.; Frei, E. New Selective Inhibitors of Cytochromes P450 2B and Their Application to Antimutagenesis of Tamoxifen. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *403* (1), 41–49.
- (114) Bogaards, J. J. P.; Bertrand, M.; Jackson, P.; Oudshoorn, M. J.; Weaver, R. J.; Van Bladeren, P. J.; Walther, B. Determining the Best Animal Model for Human Cytochrome P450 Activities: A Comparison of Mouse, Rat, Rabbit, Dog, Micropig, Monkey and Man. *Xenobiotica* **2000**, *30* (12), 1131–1152.
- (115) Romkes, M.; Faletto, M. B.; Blaisdell, J. A.; Raucy, J. L.; Goldstein, J. A. Cloning and Expression of Complementary DNAs for Multiple Members of the Human Cytochrome P450IIC Subfamily. *Biochemistry* **1991**, *30* (13), 3247–3255.
- (116) Doherty, M. M.; Charman, W. N. The Mucosa of the Small Intestine. *Clin. Pharmacokinet.* **2002**, *41* (4), 235–253.
- (117) Harris, J. W.; Rahman, A.; Kim, B. R.; Guengerich, F. P.; Collins, J. M. Metabolism of Taxol by Human Hepatic Microsomes and Liver Slices: Participation of Cytochrome P450 3A4 and an Unknown P450 Enzyme. *Cancer Res.* **1994**, *54* (15), 4026–4035.
- (118) Rahman, A.; Korzekwa, K. R.; Grogan, J.; Gonzalez, F. J.; Harris, J. W. Selective Biotransformation of Taxol to 6 $\alpha$ -Hydroxytaxol by Human Cytochrome P450 2C8. *Cancer Res.* **1994**, *54* (21), 5543–5546.
- (119) Mancy, A.; Antignac, M.; Minoletti, C.; Dijols, S.; Mouries, V.; Ha Duong, N. T.; Battioni, P.; Dansette, P. M.; Mansuy, D. Diclofenac and Its Derivatives as Tools for Studying Human Cytochromes P450 Active Sites: Particular Efficiency and



- Regioselectivity of P450 2Cs. *Biochemistry* **1999**, *38* (43), 14264–14270.
- (120) Miners, J. O.; Birkett, D. J. Cytochrome P4502C9: An Enzyme of Major Importance in Human Drug Metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1998**, *45* (6), 525–538.
- (121) Gentry, P. R.; Hack, C. E.; Haber, L.; Maier, A.; Clewell, H. J. An Approach for the Quantitative Consideration of Genetic Polymorphism Data in Chemical Risk Assessment: Examples with Warfarin and Parathion. *Toxicol. Sci.* **2002**, *70* (1), 120–139.
- (122) Ono, S.; Hatanaka, T.; Miyazawa, S.; Tsutsui, M.; Aoyama, T.; Gonzalezs, F. J.; Satoh, T. Human Liver Microsomal Diazepam Metabolism Using cDNA-Expressed Cytochrome P450s: Role of CYP2B6, 2C19 and the 3A Subfamily. *Xenobiotica* **1996**, *26* (11), 1155–1166.
- (123) Ando, Y.; Fuse, E.; Figg, W. D. Thalidomide Metabolism by the CYP2C Subfamily. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8* (6), 1964–1973.
- (124) Yamazaki, H.; Shimada, T. Progesterone and Testosterone Hydroxylation by Cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in Human Liver Microsomes. *Arch Biochem Biophys* **1997**, *346* (1), 161–169.
- (125) Goldstein, J. A. Clinical Relevance of Genetic Polymorphisms in the Human CYP2C9 Gene. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2003**, *33* (2), 23–30.
- (126) Kita, T.; Sakaeda, T.; Aoyama, N.; Sakai, T.; Kawahara, Y.; Kasuga, M.; Okumura, K. Optimal Dose of Omeprazole for CYP2C19 Extensive Metabolizers in Anti-Helicobacter Pylori Therapy: Pharmacokinetic Considerations. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25* (7), 923–927.
- (127) Ha-Duong, N.-T.; Dijols, S.; Marques-Soares, C.; Minoletti, C.; Dansette, P. M.; Mansuy, D. Synthesis of Sulfaphenazole Derivatives and Their Use as Inhibitors and Tools for Comparing the Active Sites of Human Liver Cytochromes P450 of the 2C Subfamily. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (22), 3622–3631.
- (128) Siegle, I.; Fritz, P.; Eckhardt, K.; Zanger, U. M.; Eichelbaum, M. Cellular Localization and Regional Distribution of CYP2D6 mRNA and Protein Expression in Human Brain. *Pharmacogenet. Genomics* **2001**, *11* (3), 237–245.
- (129) Guidice, J.-M. Lo; Marez, D.; Sabbagh, N.; Legrand-Andreoletti, M.; Spire, C.; Alcaide, E.; Lafitte, J.-J.; Broly, F. Evidence for CYP2D6 Expression in Human Lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *241* (1), 79–85.
- (130) Ingelman-Sundberg, M. Genetic Polymorphisms of Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): Clinical Consequences, Evolutionary Aspects and Functional Diversity.

*Pharmacogenomics J.* **2005**, 5 (1), 6–13.

- (131) Pratt, V. M.; Scott, S. A. Chapter 39 - Personalized Medicine in Cancer Treatment. In *Diagnostic Molecular Pathology A Guide to Applied Molecular Testing*; Coleman, W. B., Tsongalis, G. J., Eds.; Elsevier Inc., 2017; pp 503–513.
- (132) Mahgoub, A.; Dring, L. G.; Idle, J. R.; Lancaster, R.; Smith, R. L. Polymorphic Hydroxylation of Debrisoquine in Man. *Lancet* **1977**, 310 (8038), 584–586.
- (133) Dahl, M.-L. Cytochrome P450 Phenotyping/Genotyping in Patients Receiving Antipsychotics: Useful Aid to Prescribing? *Clin. Pharmacokinet.* **2002**, 41 (7), 453–470.
- (134) Strolin Benedetti, M. Enzyme Induction and Inhibition by New Antiepileptic Drugs: A Review of Human Studies. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2000**, 14 (4), 301–319.
- (135) Kudo, S.; Odomi, M. Involvement of Human Cytochrome P450 3A4 in Reduced Haloperidol Oxidation. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1998**, 54 (3), 253–259.
- (136) Yamazaki, H.; Guo, Z.; Persmark, M.; Mimura, M.; Inoue, K.; Guengerich, F. P.; Shimada, T. Bufuralol Hydroxylation by Cytochrome P450 2D6 and 1A2 Enzymes in Human Liver Microsomes. *Mol. Pharmacol.* **1994**, 46 (3), 568–577.
- (137) Von Moltke, L. L.; Greenblatt, D. J.; Grassi, J. M.; Granda, B. W.; Venkatakrishnan, K.; Duan, S. X.; Fogelman, S. M.; Harmatz, J. S.; Shader, R. I. Citalopram and Desmethylcitalopram in Vitro: Human Cytochromes Mediating Transformation, and Cytochrome Inhibitory Effects. *Biol. Psychiatry* **1999**, 46 (6), 839–849.
- (138) Chow, T.; Hiroi, T.; Imaoka, S.; Chiba, K.; Funae, Y. Isoform-Selective Metabolism of Mianserin by Cytochrome P-450 2D. *Drug Metab Dispos* **1999**, 27 (10), 1200–1204.
- (139) Otton, S. V.; Inaba, T.; Kalow, W. Competitive Inhibition of Sparteine Oxidation in Human Liver by  $\beta$ -Adrenoceptor Antagonists and Other Cardiovascular Drugs. *Life Sci.* **1984**, 34 (1), 73–80.
- (140) Palamanda, J. R.; Casciano, C. N.; Norton, L. A.; Clement, R. P.; Favreau, L. V.; Lin, C.; Nomeir, A. A. Mechanism-Based Inactivation of CYP2D6 by 5-Fluoro-2-[4-[(2-Phenyl-1H-Imidazol-5-Yl) Methyl]-1-Piperazinyl] Pyrimidine. *Drug Metab. Dispos.* **2001**, 29 (6), 863–867.
- (141) Ding, X.; Kaminsky, L. S. Human Extrahepatic Cytochromes P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective Chemical Toxicity in the Respiratory and Gastrointestinal Tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2003**, 43 (1), 149–173.
- (142) Warner, M.; Gustafsson, J.-A. Effect of Ethanol on Cytochrome P450 in the Rat

- Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91* (3), 1019–1023.
- (143) Peter, R.; Bocker, R.; Beaune, P. H.; Iwasaki, M.; Guengerich, P. F.; Yang, C. S. Hydroxylation of Chlorzoxazone as a Specific Probe for Human Liver Cytochrome P-450IIE1. *Chem. Res. Toxicol.* **1990**, *3* (6), 566–573.
- (144) Lucas, D.; Ferrara, R.; Gonzalez, E.; Bodenez, P.; Albores, A.; Manno, M.; Berthou, F. Chlorzoxazone, a Selective Probe for Phenotyping CYP2E1 in Humans. *Pharmacogenetics* **1999**, *9* (3), 377–388.
- (145) Tassaneeyakul, W.; Veronese, M. E.; Birkett, D. J.; Gonzalez, F. J.; Miners, J. O. Validation of 4-Nitrophenol as an in Vitro Substrate Probe for Human Liver CYP2E1 Using cDNA Expression and Microsomal Kinetic Techniques. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46* (11), 1975–1981.
- (146) Cowpland, C.; Su, G. M.; Murray, M.; Puddey, I. B.; Croft, K. D. Effect of Alcohol on Cytochrome P450 Arachidonic Acid Metabolism and Blood Pressure in Rats and Its Modulation by Red Wine Polyphenolics. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2006**, *33* (3), 183–188.
- (147) Kono, H.; Bradford, B. U.; Yin, M.; Sulik, K. K.; Koop, D. R.; Peters, J. M.; Gonzalez, F. J.; McDonald, T.; Dikalova, A.; Kadiiska, M. B.; et al. CYP2E1 Is Not Involved in Early Alcohol-Induced Liver Injury. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **1999**, *277* (6), G1259–G1267.
- (148) Spracklin, D. K.; Hankins, D. C.; Fisher, J. M.; Thummel, K. E.; Kharasch, E. D. Cytochrome P450 2E1 Is the Principal Catalyst of Human Oxidative Halothane Metabolism in Vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *281* (1), 400–411.
- (149) Kharasch, E. D.; Hankins, D. C.; Cox, K. Clinical Isoflurane Metabolism by Cytochrome P450 2E1. *Anesthesiol. J. Am. Soc. Anesthesiol.* **1999**, *90* (3), 766–771.
- (150) Reitz, R. H.; Mendrala, A. L.; Guengerich, F. P. In Vitro Metabolism of Methylene Chloride in Human and Animal Tissues: Use in Physiologically Based Pharmacokinetic Models. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1989**, *97*, 230–246.
- (151) Brady, J. F.; Xiao, F.; Wang, M.-H.; Li, Y.; Ning, S. M.; Gapac, J. M.; Yang, C. S. Effects of Disulfiram on Hepatic P450IIE1, Other Microsomal Enzymes, and Hepatotoxicity in Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1991**, *108* (2), 366–373.
- (152) Kwak, M. K.; Kim, S. G.; Kwak, J. Y.; Novak, R. F.; Kim, N. D. Inhibition of Cytochrome P4502E1 Expression by Organosulfur Compounds Allylsulfide, Allylmercaptan and Allylmethylsulfide in Rats. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47* (3), 531–539.

- (153) Nakajima, M.; Yoshida, R.; Shimada, N.; Yamazaki, H.; Yokoi, T. Inhibition and Inactivation of Human Cytochrome P450 Isoforms by Phenethyl Isothiocyanate. *Drug Metab. Dispos.* **2001**, *29* (8), 1110–1113.
- (154) Ekström, G.; Ingelman-Sundberg, M. Rat Liver Microsomal NADPH-Supported Oxidase Activity and Lipid Peroxidation Dependent on Ethanol-Inducible Cytochrome P-450 (P-450IIE1). *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38* (8), 1313–1319.
- (155) Caro, A. A.; Cederbaum, A. I. Oxidative Stress, Toxicology, and Pharmacology of CYP2E1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *44* (1), 27–42.
- (156) Lee, S. S. T.; Buters, J. T. M.; Pineau, T.; Fernandez-Salguero, P.; Gonzalez, F. J. Role of CYP2E1 in the Hepatotoxicity of Acetaminophen. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (20), 12063–12067.
- (157) Koch, I.; Weil, R.; Wolbold, R.; Brockmöller, J.; Hustert, E.; Burk, O.; Nuessler, A.; Neuhaus, P.; Eichelbaum, M.; Zanger, U.; et al. Interindividual Variability and Tissue-Specificity in the Expression of Cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30* (10), 1108–1114.
- (158) Paine, M. F.; Hart, H. L.; Ludington, S. S.; Haining, R. L.; Rettie, A. E.; Zeldin, D. C. The Human Intestinal Cytochrome P450 “Pie.” *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34* (5), 880–886.
- (159) Tanaka, E. Gender-Related Differences in Pharmacokinetics and Their Clinical Significance. *J. Clin. Pharm. Ther.* **1999**, *24* (5), 339–346.
- (160) Tracy, T. S.; Venkataramanan, R.; Glover, D. D.; Caritis, S. N. Temporal Changes in Drug Metabolism (CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A Activity) during Pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2005**, *192* (2), 633–639.
- (161) Guengerich, F. P.; Martin, M. V.; Beaune, P. H.; Kremers, P.; Wolff, T.; Waxman, D. J. Characterization of Rat and Human Liver Microsomal Cytochrome P-450 Forms Involved in Nifedipine Oxidation, a Prototype for Genetic Polymorphism in Oxidative Drug Metabolism. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261* (11), 5051–5060.
- (162) Kronbach, T.; Mathys, D.; Umeno, M.; Gonzalez, F. J.; Meyer, U. A. Oxidation of Midazolam and Triazolam by Human Liver Cytochrome P450IIIA4. *Mol. Pharmacol.* **1989**, *36* (1), 89–96.
- (163) Bocker, R. H.; Guengerich, F. P. Oxidation of 4-Aryl- and 4-Alkyl-Substituted 2,6-Dimethyl-3,5-Bis(Alkoxy-carbonyl)-1,4-Dihydropyridines by Human Liver Microsomes and Immunochemical Evidence for the Involvement of a Form of Cytochrome P-450. *J. Med. Chem.* **1986**, *29* (9), 1596–1603.

- (164) Guengerich, F. P.; Müller-Enoch, D.; Blair, I. A. Oxidation of Quinidine by Human Liver Cytochrome P-450. *Mol. Pharmacol.* **1986**, *30* (3), 287–295.
- (165) Pichard, L.; Fabre, I.; Fabre, G.; Domergue, J.; Saint Aubert, B.; Mourad, G.; Maurel, P. Cyclosporin A Drug Interactions. Screening for Inducers and Inhibitors of Cytochrome P-450 (Cyclosporin A Oxidase) in Primary Cultures of Human Hepatocytes and in Liver Microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **1990**, *18* (5), 595–606.
- (166) Guengerich, F. P. Oxidation of 17 Alpha-Ethynylestradiol by Human Liver Cytochrome P-450. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *33* (5), 500–508.
- (167) Wang, R. W.; Kari, P. H.; Lu, A. Y. H.; Thomas, P. E.; Guengerich, F. P.; Vyas, K. P. Biotransformation of Lovastatin: IV. Identification of Cytochrome P450 3A Proteins as the Major Enzymes Responsible for the Oxidative Metabolism of Lovastatin in Rat and Human Liver Microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, *290* (2), 355–361.
- (168) Koudriakova, T.; Iatsimirskaia, E.; Utkin, I.; Gangl, E.; Vouros, P.; Storozhuk, E.; Orza, D.; Marinina, J.; Gerber, N. Metabolism of the Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitors Indinavir and Ritonavir by Human Intestinal Microsomes and Expressed Cytochrome P4503A4/3A5: Mechanism-Based Inactivation of Cytochrome P4503A by Ritonavir. *Drug Metab. Dispos.* **1998**, *26* (6), 552–561.
- (169) Shimada, T.; Guengerich, F. P. Evidence for Cytochrome P-450(NF), the Nifedipine Oxidase, Being the Principal Enzyme Involved in the Bioactivation of Aflatoxins in Human Liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86* (2), 462–465.
- (170) Yueh, M. F.; Kawahara, M.; Raucy, J. High Volume Bioassays to Assess CYP3A4-Mediated Drug Interactions: Induction and Inhibition in a Single Cell Line. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33* (1), 38–48.
- (171) Gentile, D. M.; Tomlinson, E. S.; Maggs, J. L.; Park, K. B.; Back, D. J. Dexamethasone Metabolism by Human Liver in Vitro. Metabolite Identification and Inhibition of 6-Hydroxylation. *J Pharmacol Exp Ther.* **1996**, *277* (1), 105–112.
- (172) Lampen, A.; Christians, U. W. E.; Guengerich, F. P.; Watkins, P. B.; Kolars, J. C.; Bader, A.; Gonschior, A.-K.; Dralle, H.; Hackbarth, I.; Sewing, K.-F. Metabolism of the Immunosuppressant Tacrolimus in the Small Intestine: Cytochrome P450, Drug Interactions, and Interindividual Variability. *Drug Metab. Dispos.* **1995**, *23* (12), 1315–1324.
- (173) Christians, U.; Schmidt, G.; Bader, A.; Lampen, A.; Schottmann, R.; Linck, A.; Sewing, K. F. Identification of Drugs Inhibiting the in Vitro Metabolism of

- Tacrolimus by Human Liver Microsomes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1996**, *41* (3), 187–190.
- (174) Komoroski, B. J.; Zhang, S.; Cai, H.; Hutzler, J. M.; Frye, R.; Tracy, T. S.; Strom, S. C.; Lehmann, T.; Ang, C. Y. W.; Cui, Y. Y.; et al. Induction and Inhibition of Cytochromes P450 by the St. John's Wort Constituent Hyperforin in Human Hepatocyte Cultures. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32* (5), 512–518.
- (175) Hariparsad, N.; Nallani, S. C.; Sane, R. S.; Buckley, D. J.; Buckley, A. R.; Desai, P. B. Induction of CYP3A4 by Efavirenz in Primary Human Hepatocytes: Comparison with Rifampin and Phenobarbital. *J. Clin. Pharmacol.* **2004**, *44* (11), 1273–1281.
- (176) Rodríguez-Antona, C.; Jover, R.; Gómez-Lechón, M.-J.; Castell, J. V. Quantitative RT-PCR Measurement of Human Cytochrome P-450s: Application to Drug Induction Studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *376* (1), 109–116.
- (177) Guengerich, P. F. Cytochrome P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1999**, *39* (1), 1–17.
- (178) Raucy, J. L. Regulation of CYP3A4 Expression in Human Hepatocytes by Pharmaceuticals and Natural Products. *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31* (5), 533–539.
- (179) Guengerich, P. F. Mechanism-Based Inactivation of Human Liver Microsomal Cytochrome P-450 IIIA4 by Gestodene. *Chem. Res. Toxicol.* **1990**, *3* (4), 363–371.
- (180) Rotzinger, S.; Fang, J.; Baker, G. B. Trazodone Is Metabolized to M-Chlorophenylpiperazine by CYP3A4 from Human Sources. *Drug Metab. Dispos.* **1998**, *26* (6), 572–575.
- (181) Yamazaki, H.; Shimada, T. Comparative Studies of in Vitro Inhibition of Cytochrome P450 3A4- Dependent Testosterone 6 $\beta$ -Hydroxylation by Roxithromycin and Its Metabolites, Troleandomycin, and Erythromycin. *Drug Metab. Dispos.* **1998**, *26* (11), 1053–1057.
- (182) Wienkers, L. C. Problems Associated with in Vitro Assessment of Drug Inhibition of CYP3A4 and Other P-450 Enzymes and Its Impact on Drug Discovery. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2001**, *45* (1), 79–84.
- (183) Plant, N. J.; Gibson, G. G. Evaluation of the Toxicological Relevance of CYP3A4 Induction. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2003**, *6* (1), 50–56.
- (184) Park, J. W.; Reed, J. R.; Backes, W. L. The Localization of Cytochrome P450s CYP1A1 and CYP1A2 into Different Lipid Microdomains Is Governed by Their N-Terminal and Internal Protein Regions. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (49), 29449–29460.
- (185) Guengerich, P. F. Comparisons of Catalytic Selectivity of Cytochrome P450

- Subfamily Enzymes from Different Species. *Chem. Biol. Interact.* **1997**, *106* (3), 161–182.
- (186) Martignoni, M.; de Kanter, R.; Moscone, A.; Grossi, P.; Monshouwer, M. Lack of Strain-Related Differences in Drug Metabolism and Efflux Transporter Characteristics between CD-1 and Athymic Nude Mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, *55* (2), 129–135.
- (187) Lindell, M.; Lang, M.; Lennernäs, H. Expression of Genes Encoding for Drug Metabolising Cytochrome P450 Enzymes and P-Glycoprotein in the Rat Small Intestine; Comparison to the Liver. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2003**, *28* (1), 41–48.
- (188) Zhang, Q.-Y.; Wikoff, J.; Dunbar, D.; Kaminsky, L. Characterization of Rat Small Intestinal Cytochrome P450 Composition and Inducibility. *Drug Metab. Dispos.* **1996**, *24* (3), 322–328.
- (189) Hakkola, J.; Pasanen, M.; Hukkanen, J.; Pelkonen, O.; Mäenpää, J.; Edwards, R. J.; Boobis, A. R.; Raunio, H. Expression of Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450 Forms in Human Full-Term Placenta. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *51* (4), 403–411.
- (190) Choudhary, D.; Jansson, I.; Schenkman, J. B.; Sarfarazi, M.; Stoilov, I. Comparative Expression Profiling of 40 Mouse Cytochrome P450 Genes in Embryonic and Adult Tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *414* (1), 91–100.
- (191) Paine, M. F.; Schmiedlin-Ren, P.; Watkins, P. B. Cytochrome P-450 1A1 Expression in Human Small Bowel: Interindividual Variation and Inhibition by Ketoconazole. *Drug Metab. Dispos.* **1999**, *27* (3), 360–364.
- (192) Shimada, T.; Martin, M. V; Pruess-Schwartz, D.; Marnett, L. J.; Guengerich, P. F. Roles of Individual Human Cytochrome P-450 Enzymes in the Bioactivation of Benzo(a)Pyrene, 7,8-Dihydroxy-7,8-Dihydrobenzo(a)Pyrene, and Other Dihydrodiol Derivatives of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Cancer Res.* **1989**, *49* (22), 6304–6312.
- (193) Roymans, D.; Annaert, P.; Van Houdt, J.; Weygers, A.; Noukens, J.; Sensenhauser, C.; Silva, J.; Van Looveren, C.; Hendrickx, J.; Mannens, G.; et al. Expression and Induction Potential of Cytochromes P450 in Human Cryopreserved Hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33* (7), 1004–1016.
- (194) Lu, C.; Li, A. P. Species Comparison in P450 Induction: Effects of Dexamethasone, Omeprazole, and Rifampin on P450 Isoforms 1A and 3A in Primary Cultured Hepatocytes from Man, Sprague-Dawley Rat, Minipig, and Beagle Dog. *Chem. Biol.*

- Interact.* **2001**, *134* (3), 271–281.
- (195) Sesardic, D.; Boobis, A.; Murray, B.; Murray, S.; Segura, J.; De La Torre, R.; Davies, D. Furafylline Is a Potent and Selective Inhibitor of Cytochrome P450IA2 in Man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1990**, *29* (6), 651–663.
- (196) Lee, C. A.; Rifkind, A. B.; Kupfer, D.; Mani, C.; Lee, C. A. Induction of Tamoxifen-4-Hydroxylation by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD),  $\beta$ -Naphthoflavone (BNF), and Phenobarbital (PB) in Avian Liver: Identification of P450 TCDDaa as Catalyst of 4-Hydroxylation Induced by TCDD and BNF1. *Cancer Res.* **1994**, *54* (12), 3140–3144.
- (197) Gorman, N.; Walton, H. S.; Sinclair, J. F.; Sinclair, P. R. CYP1A-Catalyzed Uroporphyrinogen Oxidation in Hepatic Microsomes from Non-Mammalian Vertebrates (Chick and Duck Embryos, Scup and Alligator). *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **1998**, *121* (1–3), 405–412.
- (198) Gilday, D.; Gannon, M.; Yutzey, K.; Bader, D.; Rifkind, A. B. Molecular Cloning and Expression of Two Novel Avian Cytochrome P450 1A Enzymes Induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (51), 33054–33059.
- (199) Kubota, A.; Kim, E. Y.; Iwata, H. Alkoxyresorufin (Methoxy-, Ethoxy-, Pentoxy- and Benzyloxyresorufin) O-Dealkylase Activities by in Vitro-Expressed Cytochrome P450 1A4 and 1A5 from Common Cormorant (*Phalacrocorax Carbo*). *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *149* (4), 544–551.
- (200) Kunze, K. L.; Trager, W. F. Isoform-Selective Mechanism-Based Inhibition of Human Cytochrome P450 1A2 by Furafylline. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6* (5), 649–656.
- (201) Tang, Y. M.; Chen, G.-F.; Thompson, P. A.; Lin, D.-X.; Lang, N. P.; Kadlubar, F. F. Development of an Antipeptide Antibody That Binds to the C-Terminal Region of Human CYP1B1. *Drug Metab. Dispos.* **1999**, *27* (2), 274–280.
- (202) McFadyen, M. C. E.; Breeman, S.; Payne, S.; Stirk, C.; Miller, I. D.; Melvin, W. T.; Murray, G. I. Immunohistochemical Localization of Cytochrome P450 CYP1B1 in Breast Cancer with Monoclonal Antibodies Specific for CYP1B1. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, *47* (11), 1457–1464.
- (203) Harrigan, J. A.; McGarrigle, B. P.; Sutter, T. R.; Olson, J. R. 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. *Toxicol. Vitro.* **2006**, *20* (4), 426–438.



- (204) Badawi, A. F.; Cavalieri, E. L.; Rogan, E. G. Effect of Chlorinated Hydrocarbons on Expression of Cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and 2- and 4-Hydroxylation of 17 $\beta$ -Estradiol in Female Sprague-Dawley Rats. *Carcinogenesis* **2000**, *21* (8), 1593–1599.
- (205) Kietz, S.; Fischer, B. Polychlorinated Biphenyls Affect Gene Expression in the Rabbit Preimplantation Embryo. *Mol. Reprod. Dev.* **2003**, *64* (3), 251–260.
- (206) Goldstone, J. V.; Goldstone, H. M. H.; Morrison, A. M.; Tarrant, A.; Kern, S. E.; Woodin, B. R.; Stegeman, J. J. Cytochrome P450 1 Genes in Early Deuterostomes (Tunicates and Sea Urchins) and Vertebrates (Chicken and Frog): Origin and Diversification of the CYP1 Gene Family. *Mol. Biol. Evol.* **2007**, *24* (12), 2619–2631.
- (207) Jiang, P.; Wang, J.; Sheng, N.; Wei, D.; Dai, J. Effects of Pentachlorophenol on the Quail (*Coturnix Japonica*) Liver Detoxification Pathway. *Chemosphere* **2017**, *177*, 44–50.
- (208) Nelson, D. R.; Schenkman, J. B.; Jansson, I.; Pritchard, M. P.; McLaughlin, L.; Friedberg, T.; Guengerich, P. F.; Martin, M. V; Janmohamed, A.; Thaunsukon, P.; et al. *Cytochrome P450 Protocols.*, 2nd ed.; Phillips, I.R., Shephard, E. A., Ed.; Humana Press: Totowa, 2006.
- (209) Pearce, R.; Greenway, D.; Parkinson, A. Species Differences and Interindividual Variation in Liver Microsomal Cytochrome P450 2A Enzymes: Effects on Coumarin, Dicumarol, and Testosterone Oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *298* (1), 211–225.
- (210) Robottom-Ferreira, A. B.; Aquino, S. R.; Queiroga, R.; Albano, R. M.; Ribeiro Pinto, L. F. Expression of CYP2A3 mRNA and Its Regulation by 3-Methylcholanthrene, Pyrazole, and  $\beta$ -Ionone in Rat Tissues. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2003**, *36* (7), 839–844.
- (211) Diaz, G. J.; Murcia, H. W.; Cepeda, S. M. Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Aflatoxin B1 in Chickens and Quail. *Poult. Sci.* **2010**, *89* (11), 2461–2469.
- (212) Ding, X.; Peng, H.-M.; Coon, M. J. Structure-Function Analysis of CYP2A10 and CYP2A11, P450 Cytochromes That Differ in Only Eight Amino Acids but Have Strikingly Different Activities toward Testosterone and Coumarin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *203* (1), 373–378.
- (213) Preissner, S.; Kroll, K.; Dunkel, M.; Kuzmann, D.; Guenther, S.; Senger, C.;

- Winnenburg, R.; Schroeder, M.; Preissner, R. Cytochrome P450 database <http://bioinformatics.charite.de/supercyp/>.
- (214) Waxman, D. J. Interactions of Hepatic Cytochromes P-450 with Steroid Hormones. Regioselectivity and Stereospecificity of Steroid Metabolism and Hormonal Regulation of Rat P-450 Enzyme Expression. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37* (1), 71–84.
- (215) Guengerich, P. F. Separation and Purification of Multiple Forms of Microsomal Cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253* (21), 7931–7939.
- (216) Koop, D. R.; Persson, A. V.; Coon, M. J. Properties of Electrophoretically Homogeneous Constitutive Forms of Liver Microsomal Cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256* (20), 10704–10711.
- (217) Parkinson, A.; Clement, R. P.; Casciano, C. N.; Cayen, M. N. Evaluation of Loratadine as an Inducer of Liver Microsomal Cytochrome P450 in Rats and Mice. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43* (10), 2169–2180.
- (218) Pekthong, D.; Desbans, C.; Martin, H.; Richert, L. Bupropion Hydroxylation as a Selective Marker of Rat CYP2B1 Catalytic Activity. *Drug Metab. Dispos.* **2012**, *40* (1), 32–38.
- (219) Huynh, H. T.; Teel, R. W. Effects of Plant-Derived Phenols on Rat Liver Cytochrome P450 2B1 Activity. *Anticancer Res.* **2002**, *22* (3), 1699–1703.
- (220) Schuetz, E. G.; Schuetz, J. D.; May, B.; Guzelian, P. S. Regulation of Cytochrome P-450b/e and P-450p Gene Expression by Growth Hormone in Adult Rat Hepatocytes Cultured on a Reconstituted Basement Membrane. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (2), 1188–1192.
- (221) Martignoni, M.; de Kanter, R.; Grossi, P.; Mahnke, A.; Saturno, G.; Monshouwer, M. An in Vivo and in Vitro Comparison of CYP Induction in Rat Liver and Intestine Using Slices and Quantitative RT-PCR. *Chem. Biol. Interact.* **2004**, *151* (1), 1–11.
- (222) Kawaguchi, T.; Nomura, K.; Hirayama, Y.; Kitagawa, T. Establishment and Characterization of a Chicken Hepatocellular Carcinoma Cell Line, LMH. **1987**, 4460–4464.
- (223) Xie, W.; Yang, F. CYP450 Enzyme-Specific Enantioselective Species-Specific Response for Metalaxyl in in Vitro Hepatic Cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *149*, 10–18.
- (224) Kumagai, Y.; Lin, L. Y.; Philpot, R. M.; Yamada, H.; Oguri, K.; Yoshimura, H.; Cho, A. K. Regiochemical Differences in Cytochrome P450 Isozymes Responsible

- for the Oxidation of Methylendioxyphenyl Groups by Rabbit Liver. *Mol. Pharmacol.* **1992**, 42 (4), 695–702.
- (225) Yasumori, T.; Nagata, K.; Yang, S. K.; Chen, L.-S.; Murayama, N.; Yamazoe, Y.; Kato, R. Cytochrome P450 Mediated Metabolism of Diazepam in Human and Rat: Involvement of Human CYP2C in N-Demethylation in the Substrate Concentration-Dependent Manner. *Pharmacogenetics* **1993**, 3 (6), 291–301.
- (226) Masubuchi, Y.; Ose, A.; Horie, T. Mechanism-Based Inactivation of CYP2C11 by Diclofenac. *Drug Metab. Dispos.* **2001**, 29 (9), 1190–1195.
- (227) Mugford, C. A.; Kedderis, G. L. Sex-Dependent Metabolism of Xenobiotics. *Drug Metab. Rev.* **1998**, 30 (3), 441–498.
- (228) Morgan, E. T.; MacGeoch, C.; Gustafsson, J.-A. Hormonal and Developmental Regulation of Expression of the Hepatic Microsomal Steroid 16 Alpha-Hydroxylase Cytochrome P-450 Apoprotein in the Rat. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260 (22), 11895–11898.
- (229) Riedl, A. G.; Watts, P. M.; Douek, D. C.; Edwards, R. J.; Boobis, A. R.; Rose, S.; Jenner, P. Expression and Distribution of CYP2C Enzymes in Rat Basal Ganglia. *Synapse* **2000**, 38 (4), 392–402.
- (230) Agrawal, A. K.; Shapiro, B. H. Gender, Age and Dose Effects of Neonatally Administered Aspartate on the Sexually Dimorphic Plasma Growth Hormone Profiles Regulating Expression of the Rat Sex-Dependent Hepatic CYP Isoforms. *Drug Metab. Dispos.* **1997**, 25 (11), 1249–1256.
- (231) LeBlanc, G. A.; Waxman, D. J. Mechanisms of Cyclophosphamide Action on Hepatic P-450 Expression. *Cancer Res.* **1990**, 50 (18), 5720–5726.
- (232) LeBlanc, G. A.; Waxman, D. J. Feminization of Rat Hepatic P-450 Expression by Cisplatin. Evidence for Perturbations in the Hormonal Regulation of Steroid-Metabolizing Enzymes. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263 (30), 15732–15739.
- (233) Shimada, M.; Murayama, N.; Yamauchi, K.; Yamazoe, Y.; Kato, R. Suppression in the Expression of a Male-Specific Cytochrome P450, P450-Male: Difference in the Effect of Chemical Inducers on P450-Male mRNA and Protein in Rat Livers. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, 270 (2), 578–587.
- (234) Kubota, A.; Stegeman, J. J.; Goldstone, J. V.; Nelson, D. R.; Kim, E.-Y.; Tanabe, S.; Iwata, H.; Goldstone, H. M.; Morrison, A. M.; Tarrant, A.; et al. Cytochrome P450 CYP2 Genes in the Common Cormorant: Evolutionary Relationships with 130 Diapsid CYP2 Clan Sequences and Chemical Effects on Their Expression. *Comp.*

*Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2011**, *153* (3), 280–289.

- (235) Hutchinson, T. H.; Madden, J. C.; Naidoo, V.; Walker, C. H. Comparative Metabolism as a Key Driver of Wildlife Species Sensitivity to Human and Veterinary Pharmaceuticals. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2014**, *369* (1656).
- (236) Baader, M.; Gnerre, C.; Stegeman, J. J.; Meyer, U. A. Transcriptional Activation of Cytochrome P450 CYP2C45 by Drugs Is Mediated by the Chicken Xenobiotic Receptor (CXR) Interacting with a Phenobarbital Response Enhancer Unit. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (18), 15647–15653.
- (237) Xu, L. H.; Ikeda, H.; Liu, L.; Arakawa, T.; Wakagi, T.; Shoun, H.; Fushinobu, S. Structural Basis for the 4'-Hydroxylation of Diclofenac by a Microbial Cytochrome P450 Monooxygenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99* (7), 3081–3091.
- (238) Nelson, D. R.; Koymans, L.; Kamataki, T.; Stegeman, J. J.; Feyereisen, R.; Waxman, D. J.; Waterman, M. R.; Gotoh, O.; Coon, M. J.; Estabrook, R. W.; et al. P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers and Nomenclature. *Pharmacogenetics* **1996**, *6* (1), 1–42.
- (239) Venhorst, J.; ter Laak, A. M.; Commandeur, J. N. M.; Funae, Y.; Hiroi, T.; Vermeulen, N. P. E. Homology Modeling of Rat and Human Cytochrome P450 2D (CYP2D) Isoforms and Computational Rationalization of Experimental Ligand-Binding Specificities. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (1), 74–86.
- (240) Gonzalez, F. J.; Matsunaga, T.; Nagata, K.; Meyer, U.; Nebert, D. W.; Pastewka, J.; Kozak, C. A.; Gillette, J.; Gelboin, H. V.; Hardwick, J. P. Debrisoquine 4-Hydroxylase: Characterization of a New P450 Gene Subfamily, Regulation, Chromosomal Mapping, and Molecular Analysis of the DA Rat Polymorphism. *DNA* **1987**, *6* (2), 149–161.
- (241) Hiroi, T.; Chow, T.; Imaoka, S.; Funae, Y. Catalytic Specificity of CYP2D Isoforms in Rat and Human. *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30* (9), 970–976.
- (242) Cai, H.; Jiang, J.; Yang, Q.; Chen, Q.; Deng, Y. Functional Characterization of a First Avian Cytochrome P450 of the CYP2D Subfamily (CYP2D49). *PLoS One* **2012**, *7* (6), 1–11.
- (243) Yamamoto, Y.; Ishizuka, M.; Takada, A.; Fujita, S. Cloning, Tissue Distribution, and Functional Expression of Two Novel Rabbit Cytochrome P450 Isozymes, CYP2D23 and CYP2D24. *J. Biochem.* **1998**, *124* (3), 503–508.
- (244) Freeman, J. E.; Stirling, D.; Russell, A. L.; Wolf, R. C. cDNA Sequence, Deduced Amino Acid Sequence, Predicted Gene Structure and Chemical Regulation of Mouse

- Cyp2e1. *Biochem. J.* **1992**, *281* (3), 689–695.
- (245) Woodcroft, K. J.; Novak, R. F. The Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Src Kinase, and Protein Kinase A Signaling Pathways in Insulin and Glucagon Regulation of CYP2E1 Expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *266* (2), 304–307.
- (246) Court, M. H.; von Moltke, L. L.; Shader, R. I.; Greenblatt, D. J. Biotransformation of Chlorzoxazone by Hepatic Microsomes from Humans and Ten Other Mammalian Species. *Biopharm. Drug Dispos.* **1997**, *18* (3), 213–226.
- (247) Sinclair, J. F.; Wood, S.; Lambrecht, L.; Gorman, N.; Mende-Mueller, L.; Smith, L.; Hunt, J.; Sinclair, P. Isolation of Four Forms of Acetone-Induced Cytochrome P-450 in Chicken Liver by h.p.l.c. and Their Enzymic Characterization. *Biochem. J.* **1990**, *269* (1), 85–91.
- (248) Robinson, R. C.; Shorr, R. G. L.; Varrichio, A.; Park, S. S.; Gelboin, H. V.; Miller, H.; Friedman, F. K. Human Liver Cytochrome P-450 Related to a Rat Acetone-Inducible, Nitrosamine-Metabolizing Cytochrome P-450: Identification and Isolation. *Pharmacology* **1989**, *39* (3), 137–144.
- (249) Umeno, M.; McBride, O. W.; Yang, C. S.; Gelboin, H. V.; Gonzalez, F. J. Human Ethanol-Inducible P450IIE1: Complete Gene Sequence, Promoter Characterization, Chromosome Mapping, and cDNA-Directed Expression. *Biochemistry* **1988**, *27* (25), 9006–9013.
- (250) Wishart, D. S.; Feunang, Y. D.; Marcu, A.; Guo, A. C.; Liang, K.; Vázquez-Fresno, R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Karu, N.; et al. HMDB 4.0: The Human Metabolome Database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (D1), D608–D617.
- (251) Leclercq, I.; Horsmans, Y.; Desager, J. P.; Delzenne, N.; Geubel, A. P. Reduction in Hepatic Cytochrome P-450 Is Correlated to the Degree of Liver Fat Content in Animal Models of Steatosis in the Absence of Inflammation. *J. Hepatol.* **1998**, *28* (3), 410–416.
- (252) Nebbia, C.; Dacasto, M.; Rossetto Giaccherino, A.; Giuliano Albo, A.; Carletti, M. Comparative Expression of Liver Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases in the Horse and in Other Agricultural and Laboratory Species. *Vet. J.* **2003**, *165* (1), 53–64.
- (253) Larson, J. R.; Coon, M. J.; Porter, T. D. Purification and Properties of a Shortened Form of Cytochrome P-450 2E1: Deletion of the NH<sub>2</sub>-Terminal Membrane-Insertion Signal Peptide Does Not Alter the Catalytic Activities. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci.* **1991**, 88 (20), 9141–9145.
- (254) Larson, J. R.; Coon, M. J.; Porter, T. D. Alcohol-Inducible Cytochrome P-450IIE1 Lacking the Hydrophobic NH<sub>2</sub>-Terminal Segment Retains Catalytic Activity and Is Membrane-Bound When Expressed in Escherichia Coli. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266 (12), 7321–7324.
- (255) Gillam, E. M. J.; Guo, Z. Y.; Guengerich, F. P. Expression of Modified Human Cytochrome P450 2E1 in Escherichia Coli, Purification, and Spectral and Catalytic Properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, 312 (1), 59–66.
- (256) Šulc, M.; Kubíčková, B.; Máslová, V.; Hodek, P. Rabbit Liver Microsomal System: Study of Interaction with Two Model N-Nitrosamines and Their Metabolism. *Gen. Physiol. Biophys.* **2004**, 23 (4), 423–433.
- (257) Gonzalez, F. J.; Nebert, D. W.; Hardwick, J. P.; Kasper, C. B. Complete cDNA and Protein Sequence of a Pregnenolone 16 $\alpha$ -Carbonitrile-Induced Cytochrome P-450. A Representative of a New Gene Family. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260 (12), 7435–7441.
- (258) Gonzalez, F. J.; Song, B.-J.; Hardwick, J. P. Pregnenolone 16 $\alpha$ -Carbonitrile-Inducible P-450 Gene Family: Gene Conversion and Differential Regulation. *Mol. Cell. Biol.* **1986**, 6 (8), 2969–2976.
- (259) Wang, H.; Kawashima, H.; Strobel, H. W. cDNA Cloning of a Novel CYP3A from Rat Brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 221 (1), 157–162.
- (260) Strotkamp, D.; Roos, P. H.; Hanstein, W. G. A Novel CYP3 Gene from Female Rats. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Gene Struct. Expr.* **1995**, 1260 (3), 341–344.
- (261) Kirita, S.; Matsubara, T. cDNA Cloning and Characterization of a Novel Member of Steroid-Induced Cytochrome P450 3A in Rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 307 (2), 253–258.
- (262) Nagata, K.; Ogino, M.; Shimada, M.; Miyata, M.; Gonzalez, F. J.; Yamazoe, Y. Structure and Expression of the Rat CYP3A1 Gene: Isolation of the Gene (P450/6 $\beta$ B) and Characterization of the Recombinant Protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, 362 (2), 242–253.
- (263) Yamazoe, Y.; Murayama, N.; Shimada, M.; Yamauchi, K.; Nagata, K.; Imaoka, S.; Funae, Y.; Kato, R. A Sex-Specific Form of Cytochrome P-450 Catalyzing Propoxycoumarin O-Depropylation and Its Identity with Testosterone 6 $\beta$ -Hydroxylase in Untreated Rat Livers: Reconstitution of the Activity with Microsomal Lipids. *J. Biochem.* **1988**, 104 (5), 785–790.
- (264) Robertson, G. R.; Farrell, G. C.; Liddle, C. Sexually Dimorphic Expression of Rat

- CYP3A9 and CYP3A18 Genes Is Regulated by Growth Hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 242 (1), 57–60.
- (265) Matsubara, T.; Kim, H. J.; Miyata, M.; Shimada, M.; Nagata, K.; Yamazoe, Y. Isolation and Characterization of a New Major Intestinal CYP3A Form, CYP3A62, in the Rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, 309 (3), 1282–1290.
- (266) Ourlin, J.-C.; Baader, M.; Fraser, D.; Halpert, J. R.; Meyer, U. A. Cloning and Functional Expression of a First Inducible Avian Cytochrome P450 of the CYP3A Subfamily (CYP3A37). *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 373 (2), 375–384.
- (267) Smith, D. A. Species Differences in Metabolism and Pharmacokinetics: Are We Close to an Understanding? *Drug Metab. Rev.* **1991**, 23 (3–4), 355–373.
- (268) Ghosal, A.; Satoh, H.; Thomas, P. E.; Bush, E.; Moore, D. Inhibition and Kinetics of Cytochrome P4503A Activity in Microsomes from Rat, Human, and cDNA-Expressed Human Cytochrome P450. *Drug Metab. Dispos.* **1996**, 24 (9), 940–947.
- (269) LeCluyse, E. L. Pregnane X Receptor: Molecular Basis for Species Differences in CYP3A Induction by Xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* **2001**, 134 (3), 283–289.
- (270) Daneshmend, T. K.; Warnock, D. W. Clinical Pharmacokinetics of Ketoconazole. *Clin. Pharmacokinet.* **1988**, 14 (1), 13–34.
- (271) Cortright, K. A.; Craigmill, A. L. Cytochrome P450-Dependent Metabolism of Midazolam in Hepatic Microsomes from Chickens, Turkeys, Pheasant and Bobwhite Quail. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2006**, 29, 469–476.
- (272) Coulet, M.; Dacasto, M.; Eeckhoutte, C.; Larrieu, G.; Sutra, J. F.; Alvinerie, M.; Macé, K.; Pfeifer, A. M. A.; Galtier, P. Identification of Human and Rabbit Cytochromes P450 1A2 as Major Isoforms Involved in Thiabendazole 5-Hydroxylation. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **1998**, 12 (2), 225–235.
- (273) Attar, M.; Ling, K. H. J.; Tang-Liu, D. D. S.; Neamati, N.; Lee, V. H. L. Cytochrome P450 3A Expression and Activity in the Rabbit Lacrimal Gland: Glucocorticoid Modulation and the Impact on Androgen Metabolism. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2005**, 46 (12), 4697–4706.
- (274) Ikemura, S.; Yamamoto, T.; Motomura, G.; Yamaguchi, R.; Zhao, G.; Iwasaki, K.; Iwamoto, Y. Cytochrome P4503A Activity Affects the Gender Difference in the Development of Steroid-Induced Osteonecrosis in Rabbits. *Int. J. Exp. Pathol.* **2014**, 95 (2), 147–152.
- (275) Carletti, M.; Gusson, F.; Zaghini, A.; Dacasto, M.; Marvasi, L.; Nebbia, C. In Vitro Formation of Metabolic-Intermediate Cytochrome P450 Complexes in Rabbit Liver

- Microsomes by Tiamulin and Various Macrolides. *Vet. Res.* **2003**, *34*, 405–411.
- (276) Morel, F.; Beaune, P. H.; Ratanasavanh, D.; Flinois, J.; Yang, C. S.; Guengerich, P. F.; Guillouzo, A. Expression of Cytochrome P-450 Enzymes in Cultured Human Hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *191* (2), 437–444.
- (277) Lown, K.; Kolars, J.; Turgeon, K.; Merion, R.; Wrighton, S. A.; Watkins, P. B. The Erythromycin Breath Test Selectively Measures P450III A in Patients with Severe Liver Disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1992**, *51* (3), 229–238.
- (278) Ha-Duong, N.-T.; Marques-Soares, C.; Dijols, S.; Sari, M.-A.; Dansette, P. M.; Mansuy, D. Interaction of New Sulfaphenazole Derivatives with Human Liver Cytochrome P450 2Cs: Structural Determinants Required for Selective Recognition by CYP 2C9 and for Inhibition of Human CYP 2Cs. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *394* (2), 189–200.
- (279) Guerre, P.; Pineau, T.; Costet, P.; Burgat, V.; Galtier, P. Effects of AFB1 on CYP 1A1, 1A2 and 3A6 mRNA, and P450 Expression in Primary Culture of Rabbit Hepatocytes. *Toxicol. Lett.* **2000**, *111* (3), 243–251.
- (280) Grimm, S. W.; Bend, J. R.; Halpert, J. R. Selectivity and Kinetics of Inactivation of Rabbit Hepatic Cytochromes P450 2B4 and 2B5 by N-Aralkylated Derivatives of 1-Aminobenzotriazole. *Drug Metab Dispos* **1995**, *23* (5), 577–583.
- (281) Mahajan, S. S.; Rifkind, A. B. Transcriptional Activation of Avian CYP1A4 and CYP1A5 by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin: Differences in Gene Expression and Regulation Compared to Mammalian CYP1A1 and CYP1A2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**, *155* (1), 96–106.
- (282) Bentivegna, C. S.; Ihnat, M. A.; Baptiste, N. S.; Hamilton, J. W. Developmental Regulation of the 3-Methylcholanthrene- and Dioxin- Inducible CYP1A5 Gene in Chick Embryo Liver in Vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1998**, *151* (1), 166–173.
- (283) Jacobs, J. M.; Nichols, C.; Marek, D.; Gorman, N.; Walton, H. S.; Sinclair, P. R.; Sinclair, J. F. Effect of Arsenite on the Induction of CYP1A4 and CYP1A5 in Cultured Chick Embryo Hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2000**, *168* (3), 177–182.
- (284) Bhattacharyya, K. K.; Brake, P. B.; Eltom, S. E.; Otto, S. A.; Jefcoate, C. R. Identification of a Rat Adrenal Cytochrome P450 Active in Polycyclic Hydrocarbon Metabolism as Rat CYP1B1. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (19), 11595–11602.
- (285) Ickenstein, L. M.; Bandiera, S. M. Persistent Suppression of Hepatic CYP2A1 Expression and Serum Triiodothyronine Levels by Tamoxifen in Intact Female Rats:



- Dose-Response Analysis and Comparison with 4-Hydroxytamoxifen, Fulvestrant (ICI 182,780), and 17 $\beta$ -Estradiol-3-Benzoate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, 302 (2), 584–593.
- (286) Chang, T. K. H.; Waxman, D. J. Cyclophosphamide Modulates Rat Hepatic Cytochrome P450 2C11 and Steroid 5 $\alpha$ -Reductase Activity and Messenger RNA Levels through the Combined Action of Acrolein and Phosphoramidate Mustard. *Cancer Res.* **1993**, 53 (11), 2490–2497.
- (287) Mizuno, D.; Tanaka, E.; Tanno, K.; Misawa, S. Chlorzoxazone: A Probe Drug Whose Metabolism Can Be Used to Monitor Toluene Exposure in Rats. *Arch. Toxicol.* **2000**, 74 (3), 139–144.
- (288) Gillette, J. Techniques for Studying Drug Metabolism in Vitro. In *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*; La Du, B., Mandel, H., Way, E., Eds.; Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1971; pp 400–418.
- (289) Omura Tsuneo; Sato, Ryo. The Carbon of Liver. *J. Biol. Chem.* **1964**, 239 (7).
- (290) Smith, P.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* **1985**, 150 (1), 76–85.
- (291) Drabkin, D. L. The Standardization of Hemoglobin Measurement. *Am. J. Med. Sci.* **1949**, 217 (6), 386–399.
- (292) Ellman, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, 82 (1), 70–77.
- (293) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254.
- (294) Sedlak, J.; Lindsay, R. Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. *Anal. Biochem.* **1968**, 25, 192–205.
- (295) Habig, W.; Pabst, M.; Jakoby, W. Glutathione S-Transferases the First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *J. Biol. Chem.* **1974**, 249 (22), 7130–7139.
- (296) Carlberg, I.; Mannervik, B. Purification and Characterization of the Flavoenzyme Glutathione Reductase from Rat Liver. *J Biol Chem.* **1975**, 250, 5475–5480.
- (297) Tappel, A. L. Glutathione Peroxidase and Hydroperoxides. *Methods Enzym* **1978**, 52, 506–513.
- (298) Dovrtělová, G.; Nosková, K.; Juřica, J.; Turjap, M.; Zendulka, O. Can Bioactive

- Compounds of Crocus Sativus L. Influence the Metabolic Activity of Selected CYP Enzymes in the Rat? *Physiol. Res.* **2015**, *64* (February 2016), S453–S458.
- (299) Sinclair, P. R.; Gorman, N.; Walton, H. S.; Sinclair, J. F.; Lee, C. A.; Rifkind, A. B. Identification of CYP1A5 as the CYP1A Enzyme Mainly Responsible for Uroporphyrinogen Oxidation Induced by AH Receptor Ligands in Chicken Liver and Kidney. *Drug Metab. Dispos.* **1997**, *25* (7), 779–783.
- (300) Gannon, M.; Gilday, D.; Rifkind, A. B. TCDD Induces CYP1A4 and CYP1A5 in Chick Liver and Kidney and Only CYP1A4, an Enzyme Lacking Arachidonic Acid Epoxygenase Activity, in Myocardium and Vascular Endothelium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2000**, *164* (1), 24–37.
- (301) Minn, A. L. A.; Pelczar, H.; Denizot, C.; Martinet, M.; Heydel, J. M.; Walther, B.; Minn, A. L. A.; Goudonnet, H.; Artur, Y. Characterization of Microsomal Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases in the Rat Olfactory Mucosa. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33* (8), 1229–1237.
- (302) Beresford, A. P.; Ellis, W. J.; Ayrton, J.; Johnson, M. A.; Lewis, D. F. V. Cytochrome P4501A (CYP1A) Induction in Rat and Man by the Benzodioxino Derivative, Fluparoxan. *Xenobiotica* **1997**, *27* (2), 159–173.
- (303) Boobis, A. R.; Sesardic, D.; Murray, B. P.; Edwards, R. J.; Singleton, A. M.; Rich, K. J.; Murray, S.; De La Torre, R.; Segura, J.; Pelkonen, O.; et al. Species Variation in the Response of the Cytochrome P-450-Dependent Monooxygenase System to Inducers and Inhibitors. *Xenobiotica* **1990**, *20* (11), 1139–1161.
- (304) Pampori, N. A.; Shapiro, B. H. Sexual Dimorphism in Avian Hepatic Monooxygenases. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46* (5), 885–890.
- (305) Yamano, S.; Tatsuno, J.; Gonzalez, F. J. The CYP2A3 Gene Product Catalyzes Coumarin 7-Hydroxylation in Human Liver Microsomes. *Biochemistry* **1990**, *29* (5), 1322–1329.
- (306) Roberts, E. S.; Hopkins, N. E.; Foroozesh, M.; Alworth, W. L.; Halpert, J. R.; Hollenberg, P. F. Inactivation of Cytochrome P450S 2B1, 2B4, 2B6, and 2B11 by Arylalkynes. *Drug Metab. Dispos.* **1997**, *25* (11), 1242–1248.
- (307) Shen, S.; Marchick, M. R.; Davis, M. R.; Doss, G. A.; Pohl, L. R. Metabolic Activation of Diclofenac by Human Cytochrome P450 3A4: Role of 5-Hydroxydiclofenac. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12* (2), 214–222.
- (308) Naidoo, V.; Mompati, K. F.; Duncan, N.; Taggart, M. A. The Pied Crow (*Corvus Albus*) Is Insensitive to Diclofenac at Concentrations Present in Carrion. *J. Wildl.*

- Dis.* **2011**, *47* (4), 936–944.
- (309) Neville, C. F.; Ninomiya, S.; Shimada, N.; Kamataki, T.; Imaoka, S.; Funae, Y. Characterization of Specific Cytochrome P450 Enzymes Responsible for the Metabolism of Diazepam in Hepatic Microsomes of Adult Male Rats. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *45* (1), 59–65.
- (310) Chenery, R. J.; Ayrton, A.; Oldham, H. G.; Standring, P.; Norman, S. J.; Seddon, T.; Kirby, R. Diazepam Metabolism in Cultured Hepatocytes from Rat, Rabbit, Dog, Guinea Pig, and Man. *Drug Metab. Dispos.* **1987**, *15* (3), 312–317.
- (311) Hu, S. X. Effect of Age on Hepatic Cytochrome P450 of Ross 708 Broiler Chickens. *Poult. Sci.* **2013**, *92* (5), 1283–1291.
- (312) Chow, T.; Imaoka, S.; Hiroi, T.; Funae, Y. Developmental Changes in the Catalytic Activity and Expression of CYP2D Isoforms in the Rat Liver. *Drug Metab. Dispos.* **2000**, *27* (2), 188–192.
- (313) Tateishi, T.; Watanabe, M.; Nakura, H.; Tanaka, M.; Kumai, T.; Aoki, T.; Kobayashi, S. A Comparison of the Inhibitory Effects of Four Volatile Anaesthetics on the Metabolism of Chlorzoxazone, a Substrate for CYP2E1, in Rabbits. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **1998**, *42* (9), 1028–1032.
- (314) Juřica, J.; Dostálek, M.; Konečný, J.; Glatz, Z.; Hadašová, E.; Tomandl, J. HPLC Determination of Midazolam and Its Three Hydroxy Metabolites in Perfusion Medium and Plasma from Rats. **2007**, *852*, 571–577.
- (315) Elbarbry, F.; Attia, A.; Shoker, A. Validation of a New HPLC Method for Determination of Midazolam and Its Metabolites: Application to Determine Its Pharmacokinetics in Human and Measure Hepatic CYP3A Activity in Rabbits. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *50* (5), 987–993.
- (316) Donato, T. M.; Castell, J. V.; Gómez-Lechón, J. M. Cytochrome P450 Activities in Pure and Co-Cultured Rat Hepatocytes. Effects of Model Inducers. *Vitr. Cell. Dev. Biol.* **1994**, *30*, 825–832.
- (317) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9* (7), 671–675.
- (318) Pfaffl, M. W. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29* (9), 2002–2007.
- (319) Janšáková, K.; Bábíčková, J.; Havrlentová, M.; Hodosy, J.; Kraic, J.; Celec, P.; Tóthová, Ľ. The Effects of Anthocyanin-Rich Wheat Diet on the Oxidative Status and Behavior of Rats. *Croat. Med. J.* **2016**, *57* (2), 119–129.

- (320) Yu, L.; Beta, T. Identification and Antioxidant Properties of Phenolic Compounds during Production of Bread from Purple Wheat Grains. *Molecules* **2015**, *20* (9), 15525–15549.
- (321) Zhang, J.; Ding, Y.; Dong, H.; Hou, H.; Zhang, X. Distribution of Phenolic Acids and Antioxidant Activities of Different Bran Fractions from Three Pigmented Wheat Varieties. *J. Chem.* **2018**, 2018.
- (322) Villela-Castrejón, J.; Antunes-Ricardo, M.; Gutiérrez-Urbe, J. A. Bioavailability and Anti-Inflammatory Activity of Phenolic Acids Found in Spray-Dried Nejayote after Its in Vitro Digestion. *J. Funct. Foods* **2017**, *39*, 37–43.
- (323) Srovnalova, A.; Svecarova, M.; Kopečna Zapletalova, M.; Anzenbacher, P.; Bachleda, P.; Anzenbacherova, E.; Dvorak, Z. Effects of Anthocyanidins and Anthocyanins on the Expression and Catalytic Activities of CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, and CYP3A4 in Primary Human Hepatocytes and Human Liver Microsomes. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (3), 789–797.
- (324) Kamenickova, A.; Anzenbacherova, E.; Pavek, P.; Soshilov, A. A.; Denison, M. S.; Zapletalova, M.; Anzenbacher, P.; Dvorak, Z. Effects of Anthocyanins on the AhR-CYP1A1 Signaling Pathway in Human Hepatocytes and Human Cancer Cell Lines. *Toxicol. Lett.* **2013**, *221* (1), 1–8.
- (325) Briolotti, P.; Chaloin, L.; Balaguer, P.; da Silva, F.; Tománková, V.; Pascussi, J. M.; Duret, C.; Fabre, J. M.; Ramos, J.; Klieber, S.; et al. Analysis of Glycogen Synthase Kinase Inhibitors That Regulate Cytochrome P450 Expression in Primary Human Hepatocytes by Activation of  $\beta$ -Catenin, Aryl Hydrocarbon Receptor and Pregnane X Receptor Signaling. *Toxicol. Sci.* **2015**, *148* (1), 261–275.
- (326) Siest, G.; Jeannesson, E.; Marteau, J. B.; Samara, A.; Bérangère, M.; Pfister, M.; Visvikis-Siest, S. Transcription Factor and Drug-Metabolizing Enzyme Gene Expression in Lymphocytes from Healthy Human Subjects. *Drug Metab Dispos* **2008**, *36* (1), 182–189.
- (327) Boehm, O.; Zur, B.; Koch, A.; Tran, N.; Freyenhagen, R.; Hartmann, M.; Zacharowski, K. Clinical Chemistry Reference Database for Wistar Rats and C57/BL6 Mice. *Biol. Chem.* **2007**, *388* (5), 547–554.
- (328) Giknis, M. L. A.; Clifford, C. B. Clinical Laboratory Parameters for Crl: WI (Han). *Charles River Lab.* **2008**, 14.
- (329) Liang, C.-T.; Chang, M.-H.; Hong, C.-C.; Huang, K.-J. Establishing the Blood Chemistry Reference Values for SPF Rats and Mice. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.* **1999**, *25*,

55–68.

- (330) Ibrahim, Z. S.; El-Shazly, S. A.; Ahmed, M. M.; Soliman, M. M. Effects of Pomegranate on Drug Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes Expressions in Rats. *Glob. Vet.* **2016**, *16*, 481–490.
- (331) Choi, C.-S.; Chung, H.-K.; Choi, M.-K.; Kang, M.-H. Effects of Grape Pomace on the Antioxidant Defense System in Diet-Induced Hypercholesterolemic Rabbits. *Nutr. Res. Pract.* **2010**, *4* (2), 114.