

LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY PALACKÉHO V OLOMOUCI
ÚSTAV FARMAKOLOGIE



**STUDIUM OVLIVNĚNÍ ENZYMOVÝCH AKTIVIT
MIKROSOMÁLNÍCH JATERNÍCH CYTOCHROMŮ P450 LÁTKAMI
FLAVONOIDNÍ STRUKTURY POUŽÍVANÝMI JAKO
NUTRACEUTIKA**

DISERTAČNÍ PRÁCE

OLOMOUC 2015

Mgr. Michaela Kopečná Zapletalová

**FACULTY OF MEDICINE AND DENTISTRY PALACKY UNIVERSITY
IN OLOMOUC**

DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY



**STUDY OF THE INFLUENCE OF FLAVONOIDS
USED AS DIETARY SUPPLEMENTS
ON ENZYME ACTIVITIES OF LIVER MICROSOMAL
CYTOCHROMES P450**

Ph.D. THESIS

OLOMOUC 2015

Mgr. Michaela Kopečná Zapletalová

Autor práce: Mgr. Michaela Kopečná Zapletalová

Školitel: Prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně s použitím literatury, kterou cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne 17.2.2015

.....

Mgr. Michaela Kopečná Zapletalová

Souhlasím s tím, že tato disertační práce je majetkem Univerzity Palackého v Olomouci (autorský zákon č. 121/2000Sb., § 60 ods. 1), bez jejího souhlasu nesmí být výsledky použity v jiné publikaci. Souhlasím se zpřístupněním této práce v Univerzitní knihovně Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 17.2.2015

.....

Mgr. Michaela Kopečná Zapletalová

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Pavlu Anzenbacherovi, DrSc. za příkladné vedení v průběhu celého studia, osobní přístup a obětavost, za odborné konzultace, cenné rady a připomínky.

Dále bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Evě Anzenbacherové, CSc. za rady, pomoc a připomínky v průběhu mého studia.

Mé poděkování patří i Mgr. Zuzaně Matuškové, Mgr. Martině Michalové a Mgr. Monice Harvanové za spolupráci při měření vzorků.

Zvláštní dík patří také všem kolegům z Ústavu farmakologie LF UP za vytvoření velmi příjemného pracovního prostředí.

Nakonec bych ráda poděkovala mému manželovi Petrovi a rodičům za podporu a trpělivost.

Finanční podpora

Tato práce byla vypracována v rámci řešení grantového projektu GAČR P303/12/G163.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Biotransformace cizorodých látek	11
2.1.1 Cytochromy P450 (CYP)	12
2.1.1.1 Mechanismus aktivace kyslíkového atomu	12
2.1.1.2 Nomenklatura CYP	14
2.1.1.3 Polymorfismus CYP	14
2.1.1.4 Cytochromy P450 významné v metabolismu léčiv	17
2.1.2 Lékové interakce - indukce a inhibice CYP	22
2.1.2.1 Inhibice na úrovni CYP	22
2.1.2.2 Indukce na úrovni CYP	23
2.2 Flavonoidy	24
2.2.1 Antokyany	26
2.2.1.1 Biologické účinky antokyanů na lidský organismus	26
2.2.1.2 Struktura a fyzikálně chemické vlastnosti antokyanů	26
2.2.1.3 Biodostupnost a metabolismus antokyanů	30
2.2.2 Proantokyanidiny	32
2.2.2.1 Biologické účinky proantokyanidinů na lidský organismus	32
2.2.2.2 Chemická struktura proantokyanidinů	33
2.2.2.3 Biodostupnost a metabolismus proantokyanidinů	35
2.2.3 Isoflavonoidy	36
2.2.3.1 Biologické účinky isoflavonoidů na lidský organismus	36
2.2.3.2 Chemická struktura isoflavonoidů	37
2.2.3.3 Biodostupnost a metabolismus isoflavonoidů	38
3. CÍLE PRÁCE	42

OBSAH

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
4.1 Materiál	43
4.1.1 Chemikálie	43
4.1.2 Enzymy a substráty	44
4.1.3 Přístrojové vybavení	45
4.2 Metody	46
4.2.1 Stanovení antokyanidinů metodou HPLC	46
4.2.2 Stanovení enzymové aktivity lidských jaterních cytochromů P450	47
4.2.3 Stanovení enzymových aktivit a inhibičního vlivu antokyanů, proantokyanidinu a isoflavonoidů na vybrané formy cytochromů P450 <i>in vitro</i>	48
5. VÝSLEDKY	55
5.1 Stanovení inhibičního vlivu antokyanů na aktivitu cytochromů P450 v lidské jaterní mikrosomální frakci	55
5.2 Stanovení inhibičního vlivu proantokyanidinu na aktivitu cytochromů P450 v lidské jaterní mikrosomální frakci	64
5.3 Stanovení inhibičního vlivu isoflavonoidů na aktivitu cytochromů P450 v lidské jaterní mikrosomální frakci	65
5.4 Vliv genetického polymorfismu CYP na metabolismus vybraných léčiv za současného sledování inhibičního vlivu genisteinu	78
6. DISKUZE	81
7. ZÁVĚR	95
8. LITERATURA	97
9. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ	113
10. SOUHRN/SUMMARY	115
11. PŘÍLOHY	119

SEZNAM ZKRATEK

ACE acetylcholinesteráza

AhR receptor pro aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor)

CYP cytochrom P450

DMSO dimethylsulfoxid

EM rychlý metabolizátor (extensive metabolizer)

GIT gastrointestinální trakt

HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)

IC₅₀ koncentrace látky inhibující 50 % aktivity enzymu

IM středně rychlý metabolizátor (intermediate metabolizer)

K_m Michaelisova konstanta

K_i inhibiční konstanta

MFO smíšené funkční oxidázy (mixed function oxygenase)

MS hmotnostní spektrometr (mass spectrometer)

NADH redukovaný nikotinamidadeninukleotid

NADPH redukovaný nikotinamidadeninukleotid fosfát

ODMA *O*-desmetylangolensin

PAH, PAU polycyklické aromatické uhlovodíky

PM pomalý metabolizátor (poor metabolizer)

rpm otáčky za minutu

SULT sulfotransferasa

UGT uridin 5'-difosfoglukuronosyltransferasa

UM ultrarychlý metabolizátor (ultrarapid metabolizer)

UV-VIS záření v ultrafialové a viditelné oblasti

V_{max} maximální rychlost enzymatické reakce

1. ÚVOD

Lidská populace je neustále ovlivňována negativními vlivy prostředí, které snižují obranyschopnost organismu a také kvalitu života. Proto je v popředí zájmu suplementovat organismus zdraví prospěšnými látkami. S příznivými účinky je v představách populace vázán pojem nutraceutika. Nutraceutika jsou doplňky stravy, které lze definovat jako látky příznivě ovlivňující zdravotní stav člověka, snižující riziko vzniku některých závažných onemocnění a svým protektivním působením na zdraví lidí také zvyšující kvalitu jejich života.

Mezi významné látky, které lze řadit mezi nutraceutika, patří rozličné skupiny sloučenin rostlinného původu, tzv. fytochemikálií. Jedná se zejména o vitaminy, fenolové kyseliny, polynenasycené mastné kyseliny, karotenoidy, flavonoidy, a další látky, které jsou již několik let intenzivně studovány pro své účinky na zdraví člověka.

Středem zájmu v oblasti suplementace lidského organismu zdraví prospěšnými substancemi jsou rozličné látky fenolové povahy, zejména pak polyfenoly, které jsou široce zkoumány pro užití v prevenci a terapii civilizačních chorob. Polyfenoly typu flavonoidů a látky jim příbuzné představují rozsáhlou skupinou sloučenin užívaných ve formě nutraceutik. Za posledních zhruba 100 let bylo publikováno více než 60 000 prací na téma flavonoidních látek.

Antokyany, proantokyanidiny a isoflavonoidy jsou v současné době složkami řady doplňků stravy a informace o nových nutraceuticích denně přibývají. Užívány jsou zejména pro jejich protizánětlivé, antioxidační, protinádorové, imunomodulační, a v případě isoflavonoidů také fytoestrogenní účinky (Barnes a kol., 1996; Allred a kol., 2001; Scalbert a kol., 2005). Na základě těchto prospěšných účinků antokyanů a isoflavonoidů roste zájem přijímat je ve zvýšené míře také jako potravní doplňky. S tím ovšem ale souvisí zvýšená koncentrace těchto látek v organismu a možné ovlivnění aktivity biotransformačních enzymů podílejících se jak na metabolismu nutraceutik, tak na biotransformaci současně podávaných léčiv. Možné ovlivnění biotransformačních enzymů by mohlo způsobit nežádoucí účinky v podobě lékových interakcí mezi nutraceutikem a léčivem.

1. ÚVOD

Případná indukce nebo inhibice biotransformačních enzymů těmito látkami by mohla vést ke změně rychlosti eliminace či ovlivnit účinek souběžně podávaného léčivého přípravku. Vzniklé nežádoucí interakce mezi léčivem a doplňkem stravy tak mohou být příčinou selhání farmakoterapie pacientů.

Z uvedených skutečností tedy vyplývá, že je důležité zabývat se potenciálními nežádoucími interakcemi hojně užívaných nutraceutik s lidskými biotransformačními enzymy a hodnocením možných rizik vzniku lékových interakcí založených na metabolismu léčiv. Značný význam má v této oblasti i farmakogenomika, která je nástrojem sloužícím k individualizaci farmakoterapie založeným na hledání vztahu mezi metabolismem léčiva a přítomností jednotlivých genetických polymorfismů v lidské populaci.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biotransformace cizorodých látek

Hlavním úkolem metabolismu cizorodých látek (xenobiotik) je odstranění potenciálně škodlivých látek z organismu. Xenobiotika mohou mít přírodní původ, ale stejně tak se může jednat o látky synteticky vyrobené člověkem. Pod pojmem cizorodé látky si tak můžeme představit různá léčiva, drogy, environmentální polutanty (dioxiny, cigaretový kouř), agrochemikálie (pesticidy, hnojiva, růstové stimulanty), potravinová aditiva (barviva, ochucovadla, stabilizátory) apod.

Po vstupu do organismu podléhají cizorodé látky chemickým přeměnám neboli biotransformačním reakcím. Cílem biotransformace je získat produkty metabolismu - metabolity, které jsou lépe rozpustné, více hydrofilní a tudíž mohou být z organismu snadněji vylučovány. Biotransformace je dynamický proces závislý na řadě endogenních a exogenních faktorů. Hlavním orgánem biotransformace cizorodých látek jsou játra, nicméně metabolickou aktivitu vykazují i další orgány jako např. plíce, ledviny, mozek, kůže, placenta a gastrointestinální trakt (Parkinson, 2001). Procesy biotransformace ovlivňuje mnoho faktorů jako je věk, pohlaví, genetické vlivy, onemocnění apod.

Biotransformační reakce jsou katalyzovány specifickými buněčnými enzymy a obvykle se dělí na dvě fáze. V I. fázi metabolismu cizorodých látek (biotransformační) je do lipofilních látek vnesena či odhalena polární funkční skupina. Nejčastěji dochází k oxidaci, redukci nebo hydrolyze mateřské látky, čímž vzniká polárnější metabolit. Tyto reakce jsou katalyzovány enzymy I. fáze metabolismu cizorodých látek, především cytochromy P450 (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

Ve II. fázi metabolismu (konjugační) dochází ke konjugaci metabolitů vzniklých v průběhu I. fáze biotransformace s endogenními látkami za tvorby polárních konjugátů. Výsledkem je vznik vysoce polárních metabolitů, které jsou z organismu obvykle vyloučeny močí nebo žlučí. Je třeba poznamenat, že do II. fáze biotransformace mohou vstupovat jak produkty I. fáze metabolismu, tak i dosud nezměněné látky, obsahují-li vhodné funkční skupiny. Hlavními enzymy II. fáze metabolismu cizorodých látek jsou UDP-glukuronosyltransferázy (UGT), sulfotransferázy (SULF), glutathion-S-transferázy a další enzymy (Tukey a Strassburg, 2000).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou hemoproteiny účastníci se typicky I. fáze biotransformace cizorodých látek. Hemová skupina cytochromu P450 je hem b (protoporfyrin IX), podobně jako u hemoglobinu a myoglobinu. Označení P450 je odvozeno od písmene P, které značí pigment a číslo 450 odkazuje na specifickou vlastnost cytochromů P450, tedy schopnost absorbovat UV-VIS záření o vlnové délce 450 nm v redukované formě s navázaným oxidem uhelnatým na hemové železo. Vlnovou délkou tohoto maxima se cytochromy P450 odlišují od ostatních hemoproteinů.

Cytochrom P450 byl objeven v roce 1958 a o tři roky později byl pojmenován jako cytochrom P450 (Klingenberg, 1958).

Cytochromy P450 jsou v buňkách lokalizovány primárně v membráně hladkého endoplazmatického retikula (v buněčném homogenátu je to pak mikrosomální frakce) a v mitochondriích (mitochondriální frakce). Mikrosomální cytochromy P450 se podílejí na metabolismu léčiv a ostatních cizorodých látek, zatímco mitochondriální CYP jsou důležité v biosyntéze endogenních látek (cholesterol, steroidní hormony, prostaglandiny, žlučové kyseliny) (Ortiz de Montellano, 2005).

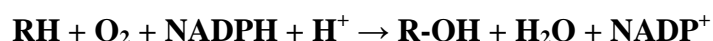
2.1.1.1 Mechanismus aktivace kyslíkového atomu

Biotransformace substrátu za účasti cytochromu P450 a molekulárního kyslíku je, (vzhledem ke schopnosti včlenit jeden atom kyslíku do molekuly substrátu a druhý atom z molekuly kyslíku poskytnout ke vzniku molekuly vody) klasickou monooxygenázovou reakcí a cytochromy P450 jsou tedy monooxygenasami nebo též oxidasami se smíšenou funkcí. Monooxygenázový systém (angl. zkratka MFO - mixed function oxygenase) se nalézá na cytosolové straně endoplazmatického retikula a sestává ze tří typických komponent: flavoproteinového enzymu (NADPH : cytochrom P450 reduktáza), který slouží jako přenašeč elektronů, hemoproteinu (cytochromu P450) a membránových lipidů, které způsobují zakotvení cytochromů P450 do membrány, zprostředkovávají přenos substrátu a stimulují tvorbu funkčně aktivního komplexu cytochrom P450-NADPH : cytochrom P450 reduktasa.

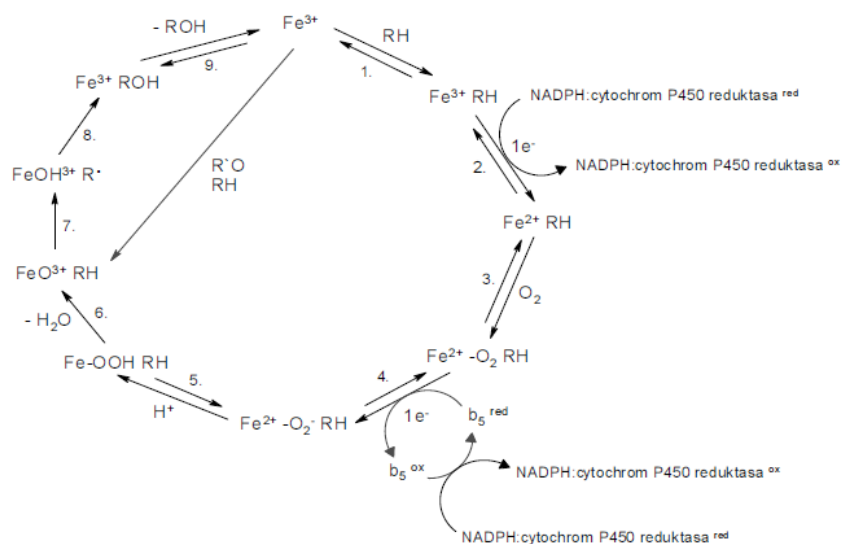
2. TEORETICKÁ ČÁST

Monooxygenace substrátů vyžaduje redukční ekvivalent v podobě redukovaného nikotinamidadenindinukleotid fosfátu (NADPH) nebo nikotinamidadenindinukleotidu (NADH) (Guengerich a Johnson, 1997).

Monooxygenázová reakce katalyzovaná cytochromy P450 se dá zjednodušeně vyjádřit následující rovnicí, kde RH je substrát a R-OH (hydroxylovaný resp. monooxygenovaný substrát) a molekula vody jsou produkty reakce:



Oxygenace substrátu a následná regenerace cytochromu P450 je cyklický proces a vyžaduje postupně přenos 2 elektronů z NADPH (Guengerich, 2007). Reakční cyklus cytochromů P450 je založen na postupné dvouelektronové redukci cytochromu P450 a následném zabudování atomu kyslíku do substrátu, probíhá tedy uspořádaným mechanismem a má několik fází (Obr. 1).



Obrázek 1. Reakční cyklus cytochromu P450 (dle Guengerich, 2013)

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1.1.2 Nomenklatura CYP

Cytochromy P450 jsou řazeny podle stupně homologie jejich primární struktury (aminokyselinového pořadí). Nadrodina CYP je tedy dále členěna na tzv. rodiny označované arabskou číslicí za zkratkou CYP (např. CYP3). Cytochromy P450 zařazené do jedné rodiny mezi sebou musí vykazovat minimálně 40% homologii v sekvenci aminokyselin. Dalším krokem v nomenklatuře cytochromu P450 je zařazení do podrodin, kde je nutné sdílení alespoň 60% homologie aminokyselinové sekvence proteinů.

Členové podrodiny se označují velkým písmenem přímo za číslicí označující rodinu (např. CYP3A). Konečně posledním znakem je arabská číslice poukazující na konkrétní formu cytochromu P450 (např. CYP3A4) (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).

U člověka bylo dosud identifikováno 14 rodin cytochromů. V biotransformaci cizorodých látek jsou nejdůležitější izoenzymy z rodin CYP1, CYP2, CYP3, které se účastní většiny biotransformačních reakcí.

2.1.1.3 Polymorfismus CYP

Genetický polymorfismus je definován jako monogenní charakteristický rys, který je vyjádřen v populaci nejméně dvěma fenotypy s frekvencí výskytu minimálně 1%. V metabolismu léčiv lze genetický polymorfismus charakterizovat na základě genotypu nebo fenotypu. Mutací genu pro cytochrom P450 může vzniknout enzym s nižší, vyšší, pozměněnou nebo nulovou aktivitou. Mutace rovněž vůbec nemusí mít na aktivitu enzymu vliv. Stanovení genotypu nebo fenotypu konkrétní formy cytochromu P450 přispívá k individualizaci farmakoterapie. Znalost genotypu pacienta by mohla přispět ke zlepšení účinnosti léku a snížení toxicity, a to výběrem správného léčivého přípravku konkrétnímu pacientovi. Genotypizace, příp. fenotypizace tak může předejít či omezit výskyt nežádoucích účinků. Tyto metody jsou také vhodným nástrojem k usnadnění výběru konkrétního léčiva v případě, kdy je pacient nositelem polymorfismu se sníženou pravděpodobností správné odpovědi na podaný léčivý přípravek. V těchto případech je vhodné zvolit terapii jiným léčivem, které není metabolizované cytochromem P450, popř. zvolit léčivo metabolizované jinou formou CYP.

2. TEORETICKÁ ČÁST

Genotypizace enzymů metabolizujících léčiva je klinicky velmi důležitá pro určení vhodné dávky některých léků, čímž zabraňuje možným terapeutickým chybám, nežádoucím účinkům a dokonce i toxicitě léčiva. Některé typické nežádoucí účinky způsobené polymorfismy CYP jsou uvedeny v tabulce 1.

Enzym	Výskyt polymorfismu	Léčivo	Nežádoucí účinky (u pomalých metabolizátorů)
CYP1A2	5-10%	antipsychotika	
CYP2C9	2-3% (homozygoti)	warfarin	hemoragie
		tolbutamid	hypoglykémie
	15-20% (heterozygoti)	fenytoin	toxicita
		losartan	snížení antihypertenzního účinku
CYP2C19	2-4% bělochů	diazepam	prodloužená sedace
	10-25% asiátů (homozygoti)		
CYP2D6	5-10% pomalí metabolizátoři	antiarytmika	arytmie
		β-blokátory	bradykardie
	1-10% ultrarychlí metabolizátoři	tricyklická antidepresiva	toxicita
		opioidy	neúčinnost kodeinu

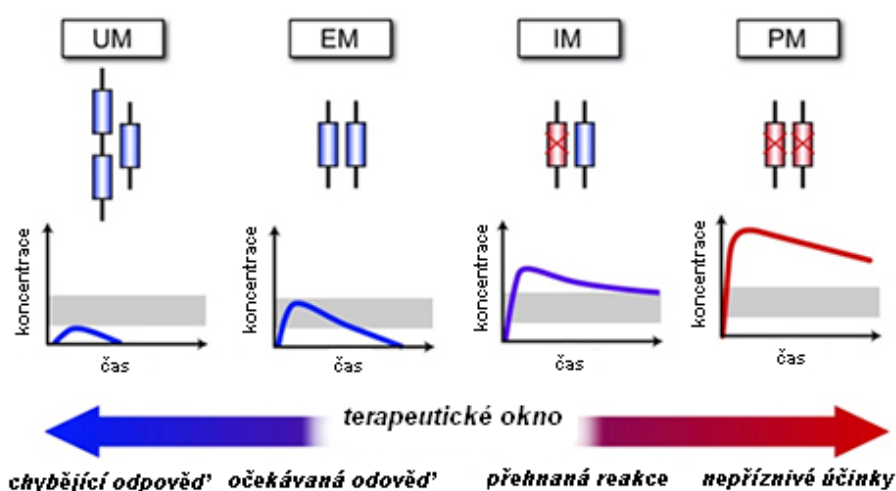
Tabulka 1. Genový polymorfismus cytochromů P450 a možné nežádoucí účinky léčiv (Meyer, 2000; Miners a kol., 1998)

Na základě schopnosti biotransformovat určitou látku se lidská populace dělí až na čtyři typy metabolizátoru: pomalé (PM, poor metabolizer), střední (IM, intermediate metabolizer), normální (EM, extensive metabolizer) a ultrarychlé (UM, ultrarapid metabolizer) metabolizátory (Obr. 2). Genotypizace lidské populace je tedy velmi důležitá pro vedení farmakoterapie či odhadování rizika nežádoucích lékových interakcí.

2. TEORETICKÁ ČÁST

Jedinci, kteří jsou označováni jako „pomalí metabolizátoři“ (PM) mají ve svém genomu neaktivní alelu enzymu a v důsledku toho je pak léčivo metabolizováno velmi omezeně, např. jinými formami CYP s nižší aktivitou, nebo dokonce vůbec ne. Přítomnost nefunkční alely může mít u těchto jedinců za následek selhání lékové terapie v případě prodrugs – léčiv, která vyžadují metabolickou aktivaci, případně se mohou léčiva z důvodu vysokých hladin v organismu stát pro pacienta toxickými.

Středně rychlí metabolizátoři (IM) jsou heterozygoti s jednou normální a jednou nefunkční alelou dané isoformy nebo homozygoti s oběma alelami isoformy enzymu s nízkou aktivitou. Rychlí metabolizátoři (EM), jsou jedinci s oběma alelami pro funkční formu enzymu a léčiva tedy metabolizují „normálně“. Ultrarychlí metabolizátoři (UM) mají více než 2 kopie alel pro daný cytochrom P450 a to má za následek jeho vyšší expresi. U těchto jedinců dochází k intenzivnímu metabolismu léčiva, a proto mohou vyžadovat vyšší dávky pro dosažení správného terapeutického účinku.



Obrázek 2. Rozdělení populace do čtyř skupin metabolizátorů

(upraveno dle <http://www.gbhealthwatch.com/Trait-Beta-Blocker-Response.php>)

Některé alelické varianty cytochromu P450 jsou společné u všech populací (např. CYP2D6*5), jiné jsou typické pro určité etnické skupiny (např. CYP2D6*17 pro africkou populaci) (Masimirembwa a kol., 1995). Mezi cytochromy P450 s popsáním genotypovým polymorfismem lze zařadit téměř všechny známé formy. Nejlépe jsou popsány polymorfismy u CYP2D6 a CYP2C19 (Ingelman-Sundberg a kol., 2007).

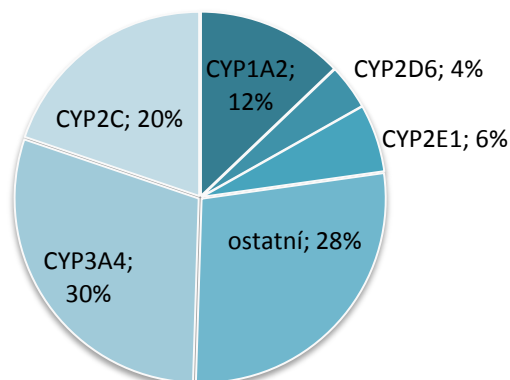
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1.1.4 Cytochromy P450 významné v metabolismu léčiv

Na úvod je třeba zmínit, že na významnost jednotlivých forem cytochromu P450 je možné pohlížet z více hledisek. Důležitým faktorem je podíl daných cytochromů P450 na metabolismu cizorodých látek. K nejdůležitějším cytochromům P450, které metabolizují cizorodé látky, patří cytochromy P450 CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6, CYP2C (2C8, 2C9, 2C18, 2C19), CYP2E1 a CYP3A4 lokalizované v játrech.

Za přeměnu xenobiotik v jiných tkáních jsou zodpovědné především formy CYP1A1, CYP2B6, CYP2E1 a CYP3A4 (Bertz a Granneman, 1997). Obsah celkového CYP proteinu v játrech je ovšem v porovnání s ostatními tkáněmi značně vysoký a tudíž lze na cytochromy P450 exprimované v játrech pohlížet jako na nejvýznamnější (Obr. 3) (Hrycay a Bandiera, 2008). Obecně lze shrnout, že na metabolismu cizorodých látek se nejčastěji podílejí formy 3A4/5/7, CYP2D6 a CYP2C9 (Evans a Relling, 1999). Z druhého pohledu, tedy hlediska kvantity cytochromů P450 ve tkáních, jsou nejdůležitější CYP3A4 a enzymy podrodiny CYP2C, méně pak CYP2E1 a CYP1A2.

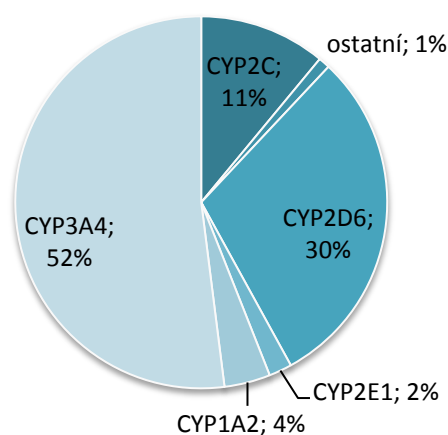
Množství cytochromů P450 ve tkáních závisí na mnoha faktorech jako je genetický polymorfismus a rovněž mají vliv i endogenní příčiny (pohlaví, věk, výživa, kouření, konzumace alkoholu, fyziologický stav a působení léčiv). Významným faktorem je zde tzv. enzymová indukce, tj. zvýšení hladiny určité formy CYP v důsledku zvýšení exprese dané formy CYP v důsledku přítomnosti dalších látek, např. indukce CYP1A1/2 polycyklickými aromatickými uhlovodíky nebo CYP2C a CYP3A4/5 barbituráty (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).



Obrázek 3. Průměrný podíl jednotlivých CYP forem na celkovém obsahu P450 v játrech (Zuber a kol., 2002)

2. TEORETICKÁ ČÁST

Nejdůležitějšími především jaterními formami cytochromu P450, účastníci se v metabolismu léčiv, jsou CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5 a CYP4F12 (Obr. 4). Společnou vlastností těchto forem cytochromu P450 je široká substrátová specifita v porovnání s CYP podílejícími se na metabolismu endogenních substrátů, které mají substrátovou specifitu zpravidla užší (Guengerich a kol., 2005).



Obrázek 4. Průměrný podíl jednotlivých CYP na metabolismu léčiv (Zuber a kol., 2002)

Z pohledu celkového množství jaterních cytochromů P450, a také s ohledem na jejich význam v metabolismu léčiv, patří enzymy třídy CYP3A u člověka k těm nejméně významným. CYP3A tvoří přibližně 30-40% celkového jaterního CYP a účastní se metabolismu asi 50% klinicky nejpoužívanějších léčiv. Hlavním cytochromem P450 z podrodiny CYP3A účastnícím se metabolismu léčiv je CYP3A4, který je rovněž nejdůležitějším CYP v metabolismu xenobiotik u člověka vůbec. Kromě CYP3A4, zahrnuje rodina CYP3A u člověka další významné podrodiny, a sice CYP3A5 a CYP3A7 (Guengerich, 2003).

Forma CYP3A4 je ovšem, jak již bylo zmíněno, nejdůležitějším enzymem z podrodiny CYP3A. CYP3A4 patří k nejvíce exprimovaným CYP v játrech a ve střevě; tvoří asi 30% jaterních CYP (Zuber a kol., 2002). Aktivita CYP3A4 vykazuje velkou interindividuální variabilitu, na které se podílí jak genetické faktory, tak i vnější vlivy včetně indukce.

Interindividuální rozdíly mezi jedinci se mohou lišit více než desetinásobně (Guengerich, 2005). Hlavní příčinami mohou být genetický polymorfismus, indukce nebo inhibice (Shimada a kol., 1994; Floyd a kol., 2003).

2. TEORETICKÁ ČÁST

CYP3A4 zodpovídá za metabolismus velmi širokého spektra léčiv. Metabolická dráha řady léčiv zahrnuje *C*-hydroxylaci, *N*-oxidaci, *C*-oxidaci, *N*-dealkylaci, *O*-dealkylaci, redukci nitroskupiny, a dehydrogenaci (Li a kol., 1995).

Široká substrátová specifita CYP3A4 je často příčinou vzniku velmi závažných interakcí. CYP3A4 je dokonce schopen navázat do aktivního místa enzymu současně dva a více substrátů (Shou a kol., 1994). V *in vitro* CYP3A4 studiích je proto vhodné použití alespoň dvou modelových substrátů odlišné chemické struktury (např. testosteron a midazolam) (Korzekwa a kol., 1998).

Další důležitou formou cytochromu P450 v metabolismu léčiv je CYP2D6, který se rovněž vyznačuje širokou substrátovou specificitou a patří mezi nejlépe prostudované CYP. V organismu se CYP2D6 nachází především v játrech ale i v mozku, plicích a GIT. Kvantitativně je CYP2D6 málo zastoupen (tvoří jen asi 4%), nicméně v metabolismu léčiv je po CYP3A4 druhým nejvýznamnějším enzymem (metabolizuje asi 30% léčiv). CYP2D6 není indukovatelný a variabilita v jeho aktivitě je tedy spojená s genetickým polymorfismem. Expres tohoto cytochromu vykazuje vůbec nejvýraznější genetický polymorfismus, jehož důsledkem je výskyt čtyř fenotypů v populaci (PM, IM, EM a UM) (Vincent-Viry a kol., 2000).

Enzymy z podrodiny CYP2C představují asi 20% celkového jaterního cytochromu P450 a metabolizují přibližně 11% klinicky používaných léčiv (Guengerich, 2005). U lidí je podrodina CYP2C zastoupena čtyřmi formami, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19, z nichž pro metabolismus léčiv jsou nejdůležitější CYP2C9 a CYP2C19.

CYP2C9 je nejvíce exprimován v játrech a jeho hladina je nejvyšší z enzymů podrodiny CYP2C. Podílí se na metabolismu zhruba 15 % všech léčiv široké škály struktur. Obecně lze říci, že metabolizuje léčiva s úzkým terapeutickým indexem jako např. *S*-warfarin a fenytoin (Goldstein a deMorais, 1994).

2. TEORETICKÁ ČÁST

Druhým významným zástupcem z podrodiny CYP2C je CYP2C19, který se vyskytuje hlavně v játrech a je vysoce polymorfní. Na základě schopnosti metabolizovat modelový substrát *S*-mefenytin a další CYP2C19 substráty může být populace rozdělena na extenzivní a pomalé metabolizátory. Typickými inhibitory jsou fluvoxamin, ketokonazol a omeprazol (Anzenbacher a Zanger, 2012). V kavkazské populaci se vyskytují asi 3% pomalých metabolizátorů, v asijské populaci přibližně 20% PM (Ingelman-Sundberg a kol., 1994). U pomalých metabolizátorů CYP2C19 mohou mít změny v genotypu za následek řadu nežádoucích účinků, jako např. u pacientů léčených clopidogrelem mohou být pozorovány výrazně nižší hladiny aktivního metabolitu (Simon a kol., 2009).

Podrodina CYP1A zahrnuje formy CYP1A1 a CYP1A2. Forma CYP1A1 je jen v malé míře zastoupena v játrech; není-li indukován, vyskytuje se především extrahepatálně - v plicích a placentě. Forma CYP1A2 je primárně exprimovaná v játrech, ale její přítomnost byla zjištěna i v plicích. Extrahepatická exprese je, v porovnání s CYP1A1, minimální. CYP1A2 tvoří 13 % celkového jaterního cytochromu P450. Spíše než v biotransformaci léčiv, je však tento enzym důležitý v metabolismu dalších xenobiotik.

U podrodiny CYP1A je významná přeměna některých cizorodých látek na karcinogeny. CYP1A1 katalyzuje hydroxylaci benzo[*a*]pyrenu a CYP1A2 se účastní *N*-hydroxylace aromatických aminů. CYP1A2 je snadno indukovatelný polycyklickými aromatickými uhlovodíky nebo aromatickými aminy přítomnými v cigaretovém kouři a grilovaném mase. Indukce CYP1A2 je řízena prostřednictvím aryl uhlovodíkového receptoru, tedy receptoru pro polycyklické aromatické uhlovodíky (AhR) (Nguyen a Bradfield, 2008).

Podrodinu 2E reprezentuje u člověka pouze jedna isoforma - CYP2E1. Tato forma tvoří 10% celkového jaterního CYP a metabolizuje asi 2% léčiv (Zuber a kol., 2002; Anzenbacher a Zanger, 2012). Substráty pro CYP2E1 mohou být inhalační celková anestetika - halothan, isofluran, enfluran. Tento enzym se účastní také metabolismu teofylinu a je zapojen do biotransformací paracetamolu a ethanolu. Je významným enzymem metabolicky aktivujícím xenobiotika, jako jsou nitrosaminy, fenol, benzen a vinylchlorid (Pelkonen, 2008).

2. TEORETICKÁ ČÁST

CYP2A6 je mez jaterními isoformami CYP zastoupen minoritně. Tvoří pouze 1-5% celkového jaterního CYP. Je významně exprimován v plicní tkáni a je nejvýznamnějším CYP při oxidaci nikotinu (Nakajima, 2001). Podílí se na metabolizaci kumarinu a nikotinu (Sai a kol., 1999). CYP2A6 je polymorfní enzym - bylo popsáno více než 50 různých alelických variant, nicméně změna na úrovni rychlosti metabolizace substrátů byla pozorována pouze u 12 z nich.

Důležitým jaterním CYP v metabolismu léčiv je také CYP2B6. Tvoří zhruba 3-6% z celkového obsahu jaterního CYP a metabolizuje několik léčiv, např. cyklofosamid, ketamin a propofol. Kromě léků je CYP2B6 schopen detoxikovat karcinogenní látky a environmentální polutanty, jako jsou např. pesticidy a herbicidy (Turpeinen a Zanger, 2012).

Enzym	Lokalizace	Typické substráty	Typické inhibitory	Významný polymorfismus
CYP1A1	játra, mozek, srdce, plíce, GIT	PAU (benzo[a]pyren)	PAU, dioxiny	Ne
CYP1A2	játra	kofein, paracetamol, PAU	fluvoxamin, ciprofloxacín	Ne
CYP2A6	játra	kumarin, steroidy, nikotin	barbituráty, dexametazon	?
CYP1B1/2	mozek, srdce, plíce, placenta, játra, ledviny, GIT	morfin	nikotin	Ne
CYP2B6	játra, srdce	nikotin	barbituráty	Ne
CYP2C8	játra, ledviny	taxol, retinoidy	?	Ano
CYP2C9/10	játra	diklofenak, tolbutamid	barbituráty, rifampicin	Ano
CYP2C19	játra, srdce	mefenytol, omeprazol, diazepam	barbituráty, rifampicin	Ano
CYP2D6	játra, mozek, srdce	β -blokátory, antidepresiva		Ano
CYP2E1	játra, srdce, plíce, mozek	etanol, chlorzoxazon, paracetamol	etanol	Ne
CYP3A4/5	játra, ledviny, GIT, srdce, plíce, mozek, placenta	blokátory Ca-kanálů, steroidy, taxol	barbituráty, steroidy	Ne/Ano
CYP3A7	fetus, placenta	viz. CYP3A4/5	barbituráty, steroidy	Ano

Tabulka 2. Přehled nejdůležitějších CYP v metabolismu xenobiotik (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Ingelman-Sundberg, 1999)

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1.2 Lékové interakce – indukce a inhibice CYP

Jak již bylo zmíněno, cytochromy P450 patří mezi nejdůležitější enzymy I. fáze metabolismu léčiv. Většina léčiv je metabolizována několika různými formami cytochromu P450 na celou řadu metabolitů. Léčivé přípravky metabolizované těmito enzymy mohou vstoupit do lékových interakcí s jinými léčivy (Guengerich, 1997). Tyto interakce vedou k nežádoucím, často i toxickým účinkům léčiva. Rovněž mohou vést ke snížení plazmatické hladiny léčivé látky, tedy k poklesu hladiny léčiva v cílové tkáni a podání farmakologicky aktivní mateřské látky tak nemusí vyvolat požadovanou klinickou odezvu.

Lékové interakce jsou založeny na skutečnosti, že řada látek má schopnost inhibovat aktivitu některých cytochromů P450 nebo soutěžit o vazebné místo CYP s jiným léčivem; jiné látky naopak mohou vyvolat indukci cytochromu P450 (Pelkonen a kol., 2008) a v důsledku zvýšené hladiny indukované formy CYP pak léčivo druhé, podané po indukční fázi, je intenzivně metabolizováno. Tím se ale může stát, že toto druhé léčivo nedosáhne terapeutické hladiny.

V případě, že je léčivo metabolizováno pouze jednou formou cytochromu P450, její inhibice nebo indukce zásadně ovlivní farmakologický účinek léčivé látky. V běžné klinické praxi je nejčastější příčinou lékových interakcí inhibice cytochromu P450 další, současně podanou látkou.

2.1.2.1 Inhibice na úrovni CYP

Polymorfismy na úrovni cytochromového systému mohou vést ke snížení aktivity enzymu vedoucí až k jeho neúčinnosti. Inhibice metabolismu buď soutěží s jinou látkou, nebo v důsledku polymorfismu se projeví vyšší biologickou dostupností léčiva, které není metabolizováno. V plazmě jsou pak změřeny vyšší koncentrace léčivé látky a nízké koncentrace metabolitu. Zpomalená eliminace léčiva se projeví prodloužením biologického poločasu eliminace léčivého přípravku ($t_{1/2}$).

2. TEORETICKÁ ČÁST

Inhibice může být reverzibilní nebo ireverzibilní. Reverzibilní inhibice je nejčastější případ inhibice enzymové aktivity. Podstata je v reverzibilní vazbě inhibující, např. druhé, současně podané léčivé látky nebo jejího stabilního metabolitu na CYP.

Ireverzibilní inhibice cytochromů P450 vzniklým, pevně navázaným substrátem se nazývá "mechanism-based" inhibice (Rando, 1984). Inhibiční efekt v tomto případě trvá po delší dobu. Autokatalytická inhibice je také nazývána "suicide processing" neboli "sebevražedná". Dochází k ní v případě, kdy se metabolit léčivého přípravku váže na CYP a ireverzibilně tak změní jeho strukturu. Výsledkem je ztráta funkce enzymu. Většinou však úplná inaktivace nenastane a metabolity takového sebevražedného inhibitoru jsou pak nadále detekovatelné (Benedetti a Bani, 1998).

2.1.2.2 Indukce na úrovni CYP

Termínem indukce se označuje zvýšení aktivity enzymu, tedy zrychlení metabolismu léčiva, snížení jeho plasmatických hladin a rovněž s tím související snížení terapeutického účinku v důsledku indukce exprese příslušné formy (formy) CYP. Biotransformace léčiv enzymem s indukovanou expresí probíhá rychle. Příčinou je většinou skutečnost, že metabolity léku mají malý, případně žádný farmakologický účinek. V případě, že metabolity vykazují větší účinek než mateřská látka, může naopak dojít při enzymatické indukci k projevům intoxikace.

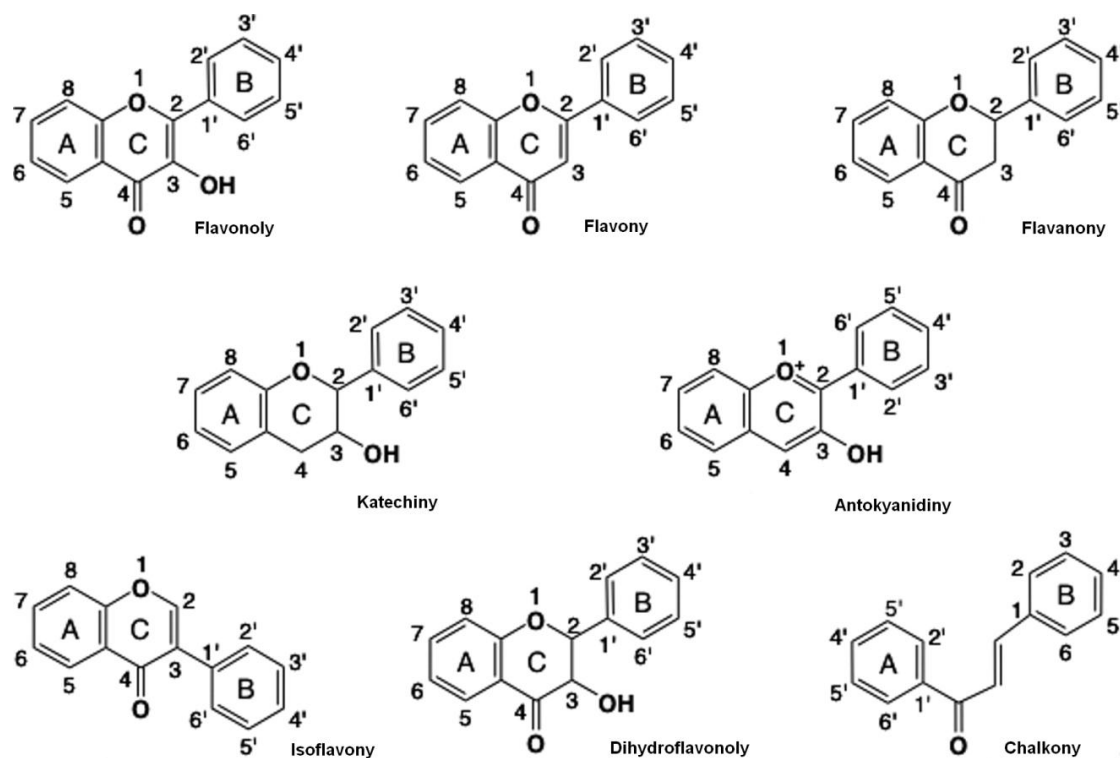
Rozlišujeme indukci prostřednictvím zvýšené syntézy enzymu, nebo prostřednictvím stabilizace struktury enzymu. Klasickým příkladem je indukce CYP3A a CYP2C barbituráty nebo indukce forem CYP1A, CYP3A, CYP2C karbamazepiny. U většiny CYP je jejich zvýšená aktivita způsobena transkripcí příslušného genu vyvolanou induktorem. Výjimku představuje CYP2E1, který je typickým příkladem indukce prostřednictvím stabilizace enzymu postranlačními modifikacemi (Lin a Lu, 1998; Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001; Cederbaum, 2006).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou polyfenolické biologicky aktivní přírodní látky čítající na 5000 různých struktur. Chemicky jsou odvozeny od fenylochromanu nebo derivátů difenylochromanu.

Flavonoidní látky obsahují ve své struktuře flavan (cyklický skelet), který se skládá ze dvou substituovaných benzenových kruhů (A a B) a pyranového kruhu (C). Jednotlivé flavonoidy se od sebe liší substitucí na všech třech kruzích. Substituenty mohou být hydroxylové nebo methoxylové skupiny. Podle stupně oxidace tříuhlíkatého řetězce spojující kruh A a B se flavonoidy dělí do několika strukturních tříd (Obr. 5) (Bravo, 1998).



Obrázek 5. Struktury nejvýznamnějších zástupců flavonoidů (upraveno dle ebm.sagepub.com)

Flavonoidy jsou většinou v poloze 3 vázány s cukry za tvorby flavonoidních glykosidů. Sacharidovou část těchto glykosidů nejčastěji představuje glukóza, galaktóza a rhamnóza. Cukerná část může být dále acylována (např. kyselinou benzoovou, malonovou, gallovou).

2. TEORETICKÁ ČÁST

Přítomnost cukrů a hydroxylových skupin (často v poloze 3'-, 4'-, 5' nebo 7') zvyšuje rozpustnost ve vodě, naopak se substituovanými methylovými skupinami se rozpustnost ve vodě snižuje. Flavonoidy se nejčastěji vyskytují jako glykosidy s β -glykosidicky vázaným cukrem a jako polymery, které jsou rozložitelné ve větší míře v trávicím traktu (Hollman a Katan, 1997; Heim a kol., 2002).

Rozsáhlé epidemiologické studie ukazují, že strava bohatá na flavonoidy je spojena s dlouhověkostí a s poklesem výskytu kardiovaskulárních onemocnění (tzv. francouzský paradox) (Renaud a kol., 1992; Arts a kol., 2005; Chong a kol., 2010). Flavonoidy mají také antioxidační vlastnosti a vykazují i další biologické účinky (antivirové, antibakteriální, protizánětlivé, vazodilatační, protirakovinové) (Cassidy, 2003; Coppo a Marchese, 2014). Kromě toho jsou schopné potlačit peroxidaci lipidů, agregaci destiček a zlepšovat propustnost a odolnost cév (Heinonen a kol., 1998; Middleton, 1998; Pandey a Rizvi, 2009).

V současnosti zájem o flavonoidní látky roste, především díky jejich potenciálním antioxidačním vlastnostem a schopnosti vychytávat volné radikály.

V dalších kapitolách bude pozornost zaměřena na tři významné podskupiny látek flavonoidní struktury: antokyany, proantokyanidiny a isoflavonoidy.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.2.1 Antokyany

Antokyany (antokyaniny) jsou sekundární metabolity rostlin, které tvoří důležitou skupinu rostlinných pigmentů zodpovědných za charakteristické modré, fialové či červené zbarvení rostlinných pletiv. Dosud bylo identifikováno více než 700 přirozeně se vyskytujících antokyanů.

2.2.1.1 Biologické účinky antokyanů na lidský organismus

Antokyany jsou v současné době v popředí zájmu vzhledem k širokému spektru jejich prospěšných účinků na lidské zdraví.

Kromě toho, že vykazují silnou antioxidační aktivitu, dokonce vyšší než vitaminů C a E, jsou často spojovány s protizánětlivými, antimutagenními a hepatoprotektivními účinky a se schopností regulovat propustnost kapilár. Díky tomu jsou někdy označovány jako vitamin P (Manach a kol., 2005).

Rovněž byl popsán jejich příznivý vliv v prevenci kardiovaskulárních onemocnění, metabolického syndromu, diabetes mellitus 2. typu, neurodegenerativních onemocnění a zlepšení kognitivních funkcí (De Pascual-Teresa a kol., 2010; Wallace, 2011). Antokyany jsou dále spojovány se snížením rizika vzniku některých typů karcinomů, jako je karcinom prsu či prostaty (Wallace a Giusti, 2014).

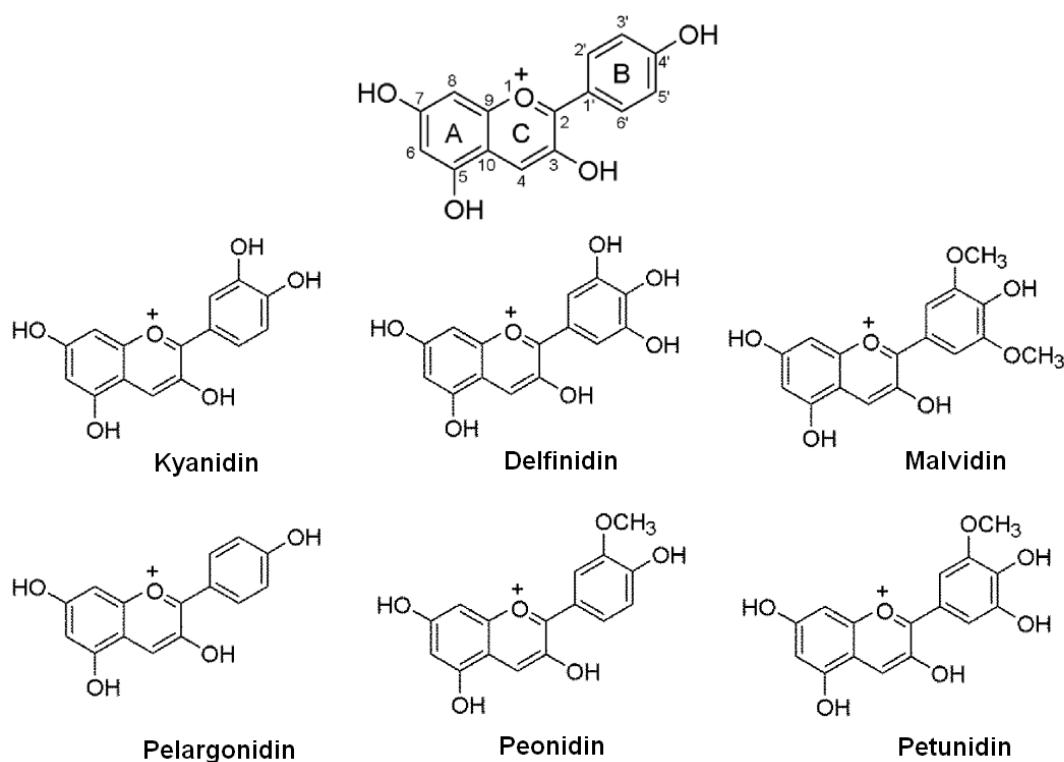
2.2.1.2 Struktura a fyzikálně chemické vlastnosti antokyanů

Základní strukturou antokyanů jsou aglykony nazývané antokyanidiny. V přírodě se nachází 17 různých antokyanidinů, z nichž nejrozšířenější jsou kyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin, pelargonidin a malvidin (Obr. 6).

K rozdílům v jejich chemické struktuře dochází na 3' a 5' pozici B-kruhu. Ve formě aglykonů je jejich výskyt ovšem vzácný. Nejčastěji jsou v čerstvých rostlinných materiálech antokyany nacházeny v glykosylované formě. Výjimkou jsou luteolinidin a apigeninidin, nacházející se ve formě aglykonu v čiroku (Wu a Prior, 2005).

2. TEORETICKÁ ČÁST

Primárně se antokyany vyskytují jako *O*-glykosidy příslušného antokyanidinového aglykonu, jsou to tedy glykosidy polyhydroxy- a polymethoxy- derivátů 2-fenylbenzopyriliového neboli flavyliového kationtu. Flavyliový kation tvoří aromatický kruh A, který je spojen přes tři uhlíky heterocyklického kruhu C obsahujícího kyslík s dalším aromatickým kruhem B.



Obrázek 6. Struktury nejvýznamnějších zástupců antokyanidinů

Antokyany mají dále navázanou cukernou složku, a v řadě případů obsahují ještě acylovou skupinu. Antokyanidiny mohou být glykosylovány jedním či více cukernými zbytky. Sacharidová složka zvyšuje stabilitu a rozpustnost antokyanů ve vodě a je vázána hlavně ve 3- pozici na C-kruhu, někdy i v 5- či 7- pozici na A-kruhu. Nejčastěji cukernou složku antokyanů představují D-glukosa, D-galaktosa, L-rhamnosa, D-xylosa a L-arabiosa, které se mohou vyskytovat ve formě monoglykosidů, diglykosidů nebo triglykosidů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

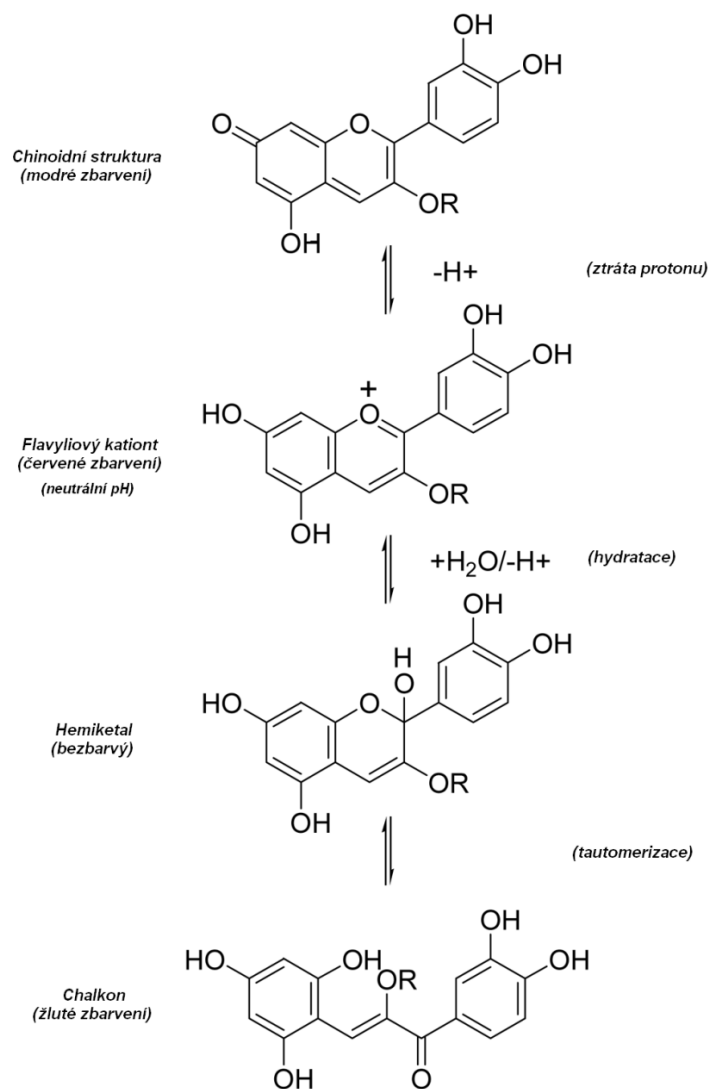
Jak již bylo naznačeno dříve, cukerné části antokyanů mohou být dále acylovány celou řadou aromatických nebo alifatických kyselin. Nejběžnějšími acylovými reziduy jsou deriváty kyseliny skořicové (např. kyseliny kávová, kumarová, jantarová, jablečná nebo šťavelová) (Wallace a Giusti, 2014).

Ve vodných roztocích existují antokyanidiny ve čtyřech formách, jejichž rovnováha je závislá především na pH roztoku a struktuře daného antokyanidinu (Obr. 6). Protože se nacházejí ve formě flavyliového kationtu, jejich stabilita je závislá na hodnotě pH, což ovlivňuje jejich zbarvení od červených odstínů až po modré. Zbarvení antokyanů tedy není ovlivněno pouze jejich strukturou (počtem hydroxylových skupin), jak je uvedeno výše, ale také jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Jako stabilní červený flavyliový kation se antokyaniny vyskytují pouze při hodnotě pH nižší než 2 (McGhie a Walton, 2007).

Se zvyšující se hodnotou pH dochází k rychlé ztrátě protonu za vzniku modré chinoidní struktury. Současně probíhá mnohem pomalejší hydratace na bezbarvou hemiketalovou formu, která následně tautomerizuje na žlutě zbarvený chalkon (Obr. 7) (Cooke a kol., 2005; McGhie a Walton, 2007).

2. TEORETICKÁ ČÁST

Tato jedinečnost v chemické struktuře je jedním z klíčových faktorů, který ovlivňuje vstřebávání, metabolismus a biologickou dostupnost antokyanů.



Obrázek 7. Vliv pH na strukturu antokyanů (upraveno dle McGhie a Walton, 2007)

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.2.1.3 Biodostupnost a metabolismus antokyanů

Biodostupnost, neboli biologická dostupnost, popisuje podíl z přijaté dávky, který dosáhne systémové cirkulace. Její velikost závisí na řadě faktorů gastrointestinálního traktu a na fyzikálně-chemických vlastnostech látky. Vstřebávání a metabolismus antokyanů jsou úzce spojeny s jejich biologickými účinky v organismu.

Antokyanany jsou vstřebávány v žaludku, na rozdíl od jiných flavonoidních látek, které se vstřebávají již z ústní dutiny, či z dalších částí trávicího traktu (Passamonti a kol., 2003; Talavéra a kol., 2003).

Biologická dostupnost antokyanů je dána především jejich chemickou strukturou. Ze studií zaměřených na farmakokinetiku antokyanů je jen malé množství těch, jejichž cílem je biologická dostupnost, nicméně obecně lze říci, že antokyanany mají velmi nízkou biologickou dostupnost s hladinami plazmatických koncentrací nižšími než 1% přijaté dávky (Cao a kol., 2004). Antokyanany jsou jedny z mála rostlinných polyfenolů, které mohou být detekovány v plazmě ve své nativní formě (glykosidy).

Antokyanany jsou absorbovány především v žaludku, nicméně bylo prokázáno i efektivní vstřebávání antokyanů v tenkém střevě (Talavéra a kol., 2004). K nejintenzivnějšímu vstřebávání antokyanů v tenkém střevě dochází v lačníku, v duodenální části je pak absorbován menší podíl antokyanů. Naproti tomu v ileu a tlustém střevě k absorpci těchto látek nedochází (Matuschek a kol., 2006).

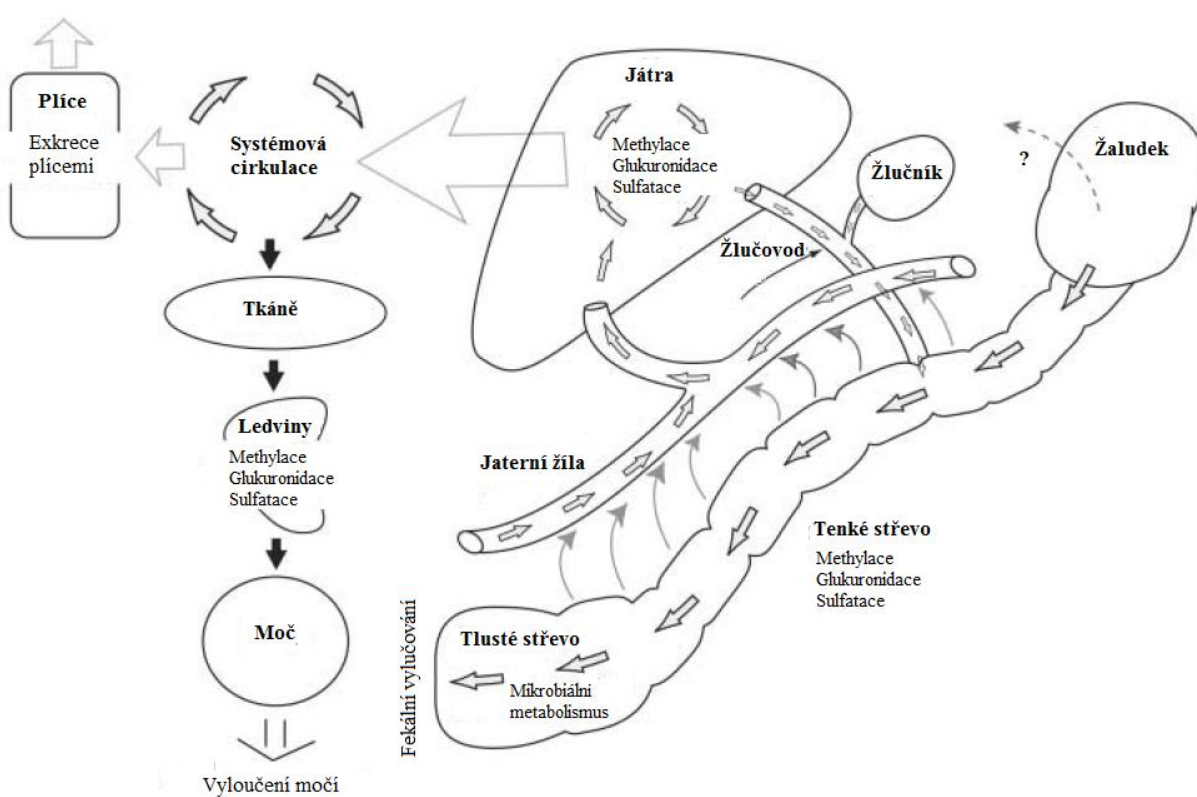
Absorpce antokyanů v organismu je velmi rychlá. Maximální plazmatické koncentrace bývá zpravidla dosaženo v rozmezí 45 minut až 3 hodin. Všeobecně platí, že absorpce antokyanů závisí na struktuře aglykonu a druhu navázaného sacharidu.

Vzhledem k nízké absorpci antokyanů dosáhne většina z nich do tlustého střeva intaktní, kde jsou dále degradovány působením bakterií střevní mikroflóry na fenolické kyseliny a aldehydy. Hlavní metabolit antokyanů vznikající působením střevních bakterií je kyselina protokatechová. Je třeba podotknout, že různorodost ve složení střevní mikroflóry může rovněž hrát významnou roli v biologické dostupnosti antokyanů (Kay, 2006; Kay a kol., 2009).

2. TEORETICKÁ ČÁST

Degradační produkty tak představují většinu absorbovaných derivátů antokyanů a jsou z velké části zodpovědné za prospěšné účinky, které jsou těmto látkám přisuzovány.

Antokyany jsou v játrech methylovány, glukuronidovány nebo sulfatovány, přičemž vzniklé metabolity mohou být navraceny žlučí zpět do střev. Jak intaktní, tak i metabolizované antokyany, jsou poté distribuovány do orgánů a tkání a následně vyloučeny močí. Předpokládané dráhy osudu antokyanů v lidském organismu jsou znázorněny na obrázku 8.



Obrázek 8. Možné cesty vstřebávání, metabolismu a vylučování antokyanů (upraveno dle Kay, 2006)

Vzhledem ke skutečnosti, že řada metabolitů a degradačních produktů antokyanů nebyla dosud identifikována, lze soudit, že tento nedostatek může být vysvětlením udávané nízké biologické dostupnosti antokyanů v porovnání s ostatními látkami ze skupiny flavonoidů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.2.2 Proantokyanidiny

Proantokyanidiny představují další významnou skupinu rostlinných polyfenolů. Jsou řazeny do podskupiny flavonoidů zvané flavanoly. V přírodě se flavanoly mohou vyskytovat jako monomery, nazývané katechiny a dále jako polymery, známé pod široce užívaným označením proantokyanidiny nebo též kondenzované taniny.

2.2.2.1 Biologické účinky proantokyanidinů na lidský organismus

Biologický účinek proantokyanidinů je připisován především proantokyanidinům typu A obsaženým ve slupce a dužině plodů bohatých na kondenzované taniny (např. *Vaccinium macrocarpon*). V současnosti je farmaceutický výzkum prospěšných účinků těchto látek orientován hlavně na jejich použití v prevenci a také léčbě mikrobiálních infekcí močových cest. V této souvislosti byl prokázán inhibiční vliv proantokyanidinů na uropatogenní kmeny *Escherichia coli* a na některé zástupce bakterií z rodů *Klebsiella* a *Pseudomonas* (Cos a kol., 2004).

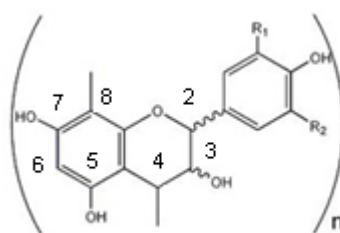
Proantokyanidiny jsou rovněž zodpovědné za snížení rizika recidivujícího výskytu chronického zánětu prostaty, jejich příjem v dietě rovněž souvisí se zlepšením stavu u symptomů dolních cest močových (Howell, 2002; Howell a kol., 2005) a mají obecně protektivní vliv na prostatu (Wang a kol., 2014). Bylo prokázáno, že proantokyanidiny jsou dále zodpovědné za preventivní působení proti vývoji inzulinové rezistence a metabolického syndromu (Lerman a kol., 2010). Významná je též jejich schopnost příznivě ovlivnit průběh diabetes mellitus 2. typu (Hanhineva a kol., 2010).

Proantokyanidiny jsou známy také díky svým protinádorovým vlastnostem a kardioprotektivnímu působení v důsledku jejich antioxidačních vlastností, schopnosti vyvolání vasorelaxace a inhibice agregace trombocytů (Mekhfí a kol., 2006). Tyto látky rovněž vykazují schopnost inhibovat systém renin-angiotensin-aldosteron působením na ACE. Inhibice ACE oligomerními proantokyanidiny je úzce spojena s jejich strukturou a zvyšuje se s rostoucím počtem podjednotek a mírou hydroxylace (Ottaviani a kol., 2006).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.2.2.2 Chemická struktura proantokyanidinů

Struktura proantokyanidinů je založena na flavanu, přičemž v pozici C3 je vázána hydroxylová skupina (Obr. 9). Proantokyanidiny jsou komplexní sloučeniny složené ze dvou základních strukturálních jednotek, kterými jsou katechin a epikatechin (Beecher, 2003). Jedná se o vysoce hydroxylované molekuly, které mohou tvořit nerozpustné komplexy se sacharidy a proteiny.



Obrázek 9. Základní chemická struktura proantokyanidinů

Strukturálně se proantokyanidiny mohou vyskytovat jako dimery, oligomery a polymery těchto jednodušších flavanových monomerů (katechinů) spojené mezi uhlíky C4 a C8 (nebo C6).

Proantokyanidiny skupin B a C jsou charakteristické vazbou C-C mezi C-4 horní flavanolové jednotky a C-6 nebo C-8 dolní jednotky. Proantokyanidiny skupiny A obsahují navíc etherový můstek mezi C-2 horní jednotky a C-7, případně C-5 dolní jednotky (Obr. 10). Připojením dalších flavanů do struktury proantokyanidinu vznikají polymery zahrnující až padesát monomerů (Ferreira a Slade, 2002).

Proantokyanidiny se tedy vyznačují širokou strukturální rozmanitostí způsobenou rozličným počtem a polohou hydroxylových skupin, stereochemií na centrech chiralit, či typem a polohou vazeb.

2. TEORETICKÁ ČÁST

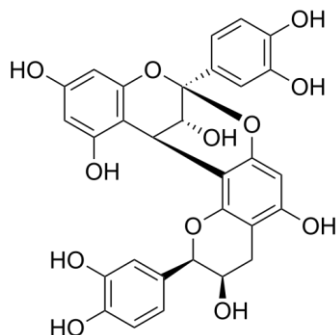
V tabulce 3 je uvedeno rozdělení proantokyanidinů do jednotlivých skupin podle pozice hydroxylů na základní flavanové struktuře.

typ proantokyanidinu	pozice hydroxylů ve struktuře proantokyanidinu
prokyanidin	3,5,7,3',4'-OH
prodelfinidin	3,5,7,3',4',5'-OH
propelargonidin	3,5,7,4'-OH
profisetinidin	3,7,3',4'-OH
prorobinetinidin	3,7,3',4',5'-OH
proguibourtinidin	3,7,4'-OH
proterakacinidin	3,7,8,4'-OH
promelakacinidin	3,7,8,3',4'-OH

Tabulka 3. Rozdělení antokyanidinů do skupin dle pozic hydroxylů na flavanech

Kromě již zmíněných dvou základních jednotek ve své struktuře, katechinu a epikatechinu, mohou proantokyanidiny obsahovat také jednodušší flavanoly, jako například gallokatechin, galloepikatechin a epikatechin-3-gallát. Nejčastějšími proantokyanidiny jsou zejména polyepikatechiny a kopolymery prokyanidinů a prodelfinidinů (Cos a kol., 2004).

Nejrozsáhlejší skupinu proantokyanidinů tvoří prokyanidiny skupiny B. Nicméně, velmi významnou skupinou z pohledu biologického účinku proantokyanidinů na lidský organismus jsou proantokyanidiny typu A (Obr. 10).



Obrázek 10. Struktura proantokyanidinu A2

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.2.2.3 Biodostupnost a metabolismus proantokyanidinů

Proantokyanidiny patří k nejčastěji se vyskytujícím flavonoidům v lidské dietě, průměrný denní příjem převyšuje 100 mg (Scalbert a Williamson, 2000).

Na rozdíl od většiny ostatních flavonoidů se proantokyanidiny nacházejí v potravě především ve formě aglykonů, případně vázané na kyselinu gallovou (Lee a kol., 1995). V tenkém střevě dochází pravděpodobně ke vstřebávání oligomerů obsahujících ve své struktuře maximálně tři jednotky. Větší molekuly, které nejsou resorbovány v tenkém střevě, se dostávají do tlustého střeva, kde jsou metabolizovány střevní bakteriální mikroflórou (Hollman, 2004). Obecně je absorpce proantokyanidinů poměrně rychlá.

Po resorpci z trávicího traktu jsou proantokyanidiny dále biotransformovány enzymy ve tkáních a orgánech. Přeměny jsou velmi podobné transformacím v metabolismu léčiv a dalších cizorodých látek. Proantokyanidiny se tedy mohou konjugovat s kyselinou glukuronovou, sírovou a případně s glycinem. Dále mohou podléhat methylačním reakcím či různým kombinacím zmíněných přeměn. Všechny tyto reakce, společně s bakteriálními přeměnami v trávicím traktu, mají za následek tvorbu obrovského množství rozličných metabolitů.

Z organismu jsou proantokyanidiny vylučovány, stejně jako ostatní flavonoidy, převážně ve formě polárních ve vodě dobře rozpustných konjugátů, močí a žlučí. Proantokyanidiny také pravděpodobně podstupují enterohepatální cirkulaci, což má za následkem prodlouženou eliminaci těchto látek z organismu (Olthof a kol., 2000).

Biologická dostupnost různých druhů proantokyanidinů není příliš rozdílná, může však být snížena tvorbou proantokyanidinových dimerů. Obecně lze říci, že biodostupnost významným způsobem limituje fyziologické účinky proantokyanidinů, stejně jako u ostatních zástupců polyfenolů. Je známo, že flavonoidy podléhají v organismu člověka rozsáhlým a různorodým přeměnám. Vždy je proto třeba věnovat zvýšenou pozornost také studiu možných účinků degradačních produktů těchto látek.

2. TEORETICKÁ ČÁST

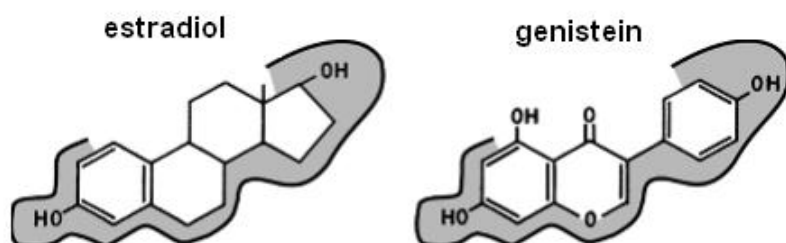
2.2.3 Isoflavonoidy

Isoflavonoidy představují významnou skupinu nízkomolekulárních sekundárních metabolitů rostlin produkovaných především zástupci z čeledi bobovitých (*Leguminosae*). V současnosti je známo přibližně 1600 různých isoflavonoidů, z nichž asi 220 bylo popsáno v neleguminózních čeledích.

2.2.3.1 Biologické účinky isoflavonoidů na lidský organismus

Isoflavonoidy zaujímají zvláštní postavení vzhledem k širokému spektru svých biologických účinků, díky čemuž vyvolaly v posledních letech mimořádný zájem farmakologů.

Značnou pozornost zasluhují pro svou fytoestrogenní aktivitu, neboť se svou chemickou strukturou a biologickou aktivitou podobají estradiolu, lidskému estrogenu (Obr. 11) (Demmig-Adams a McCauley, 2005; Castañeda-Ovando a kol., 2009).



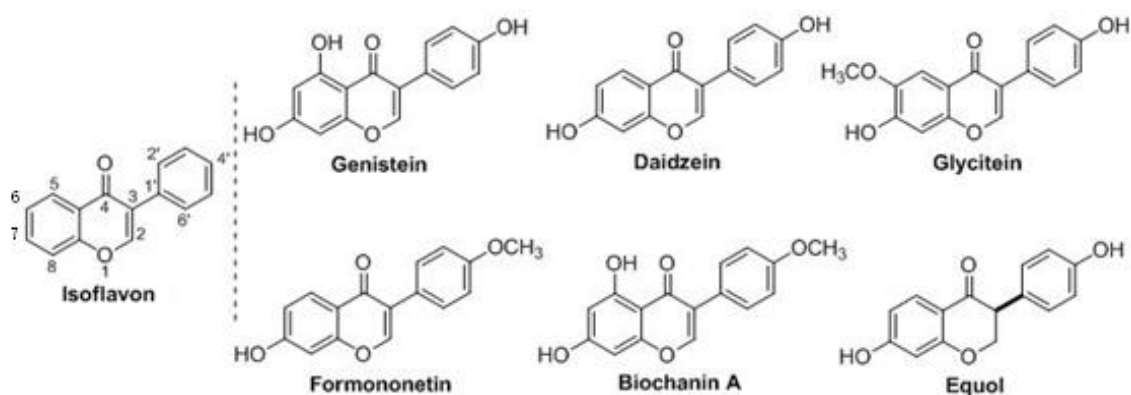
Obrázek 11. Srovnání struktury estradiolu a genisteinu vázajících se do estrogenního receptoru (upraveno dle Demmig-Adams a McCauley, 2005)

Vzhledem ke své estrogenní aktivitě snižují riziko rakoviny prsu a působí také jako antioxidanty (Sarkar a Li, 2003; Ruiz-Larrea a kol., 1997; Lee a kol., 2012). Kromě toho byla prokázána řada pozitivních účinků sójových isoflavonoidů na zdravotní stav žen v menopauze (Krebs a kol., 2004; Barentsen, 2004; Kreijkamp-Kaspers a kol., 2004), snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění, aterosklerózy, osteoporózy a jiných degenerativních onemocnění, jako je ischemická choroba srdeční (Clarkson, 2002; Clair a Anthony, 2005). Proto isoflavonoidy i nadále zůstávají aktuálním tématem na poli vědeckého výzkumu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.2.3.2 Chemická struktura isoflavonoidů

Isoflavonoidy představují rozsáhlou skupinu organických sloučenin, které se strukturně odlišují od ostatních tříd flavonoidů vazbou benzenového kruhu (kruhu B) v pozici 3 heterocyklického systému. Jejich struktura je založena na 3-fenylchroman-4-onu (Obr. 12). Rozmanitost struktur isoflavonoidů je dána nejen složitostí a počtem substituentů v základní molekule, ale i různým oxidačním stupněm a přítomností dalších heterocyklických kruhů (Andersen a Markham, 2006).



Obrázek 12. Struktura isoflavonu a z něj odvozených nejvýznamnějších isoflavonoidů

Isoflavonoidy se mohou vyskytovat ve volné formě jako aglykony, nebo jako glykosidy konjugované s glukosou nebo rhamnosou. Nejběžnější formou isoflavonoidů jsou 7-*O*-glykosidy. K tvorbě *O*-glykosidické vazby bývá nejčastěji využívána OH skupina na 7. uhlíku. Isoflavonoidy se vyskytují v různých oxidačních stupních, také ve formě dimerů a heterodimerů (Reynaud a kol., 2005).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.2.3.3 Biodostupnost a metabolismus isoflavonoidů

Mezi nejvýznamnější isoflavonoidy patří aglykony daidzein, genistein, formononetin a biochanin A, jakož i jejich glykosidy daidzin, genistin, ononin a sissotrin.

Vstřebání isoflavonoidů je obecně nejvyšší ze všech flavonoidních skupin (Manach a kol., 2005). Metabolity aglykonů byly detekovány v plazmě již za 3 minuty po podání s maximální koncentrací v rozmezí 4-8 hodin, z čehož vyplývá, že absorpce volných forem isoflavonoidů v žaludku je rychlá a efektivní. Glykosidy isoflavonoidů jsou hydrolyzovány před absorpcí a v plazmě nebyly detekovány (Setchell a kol., 2001).

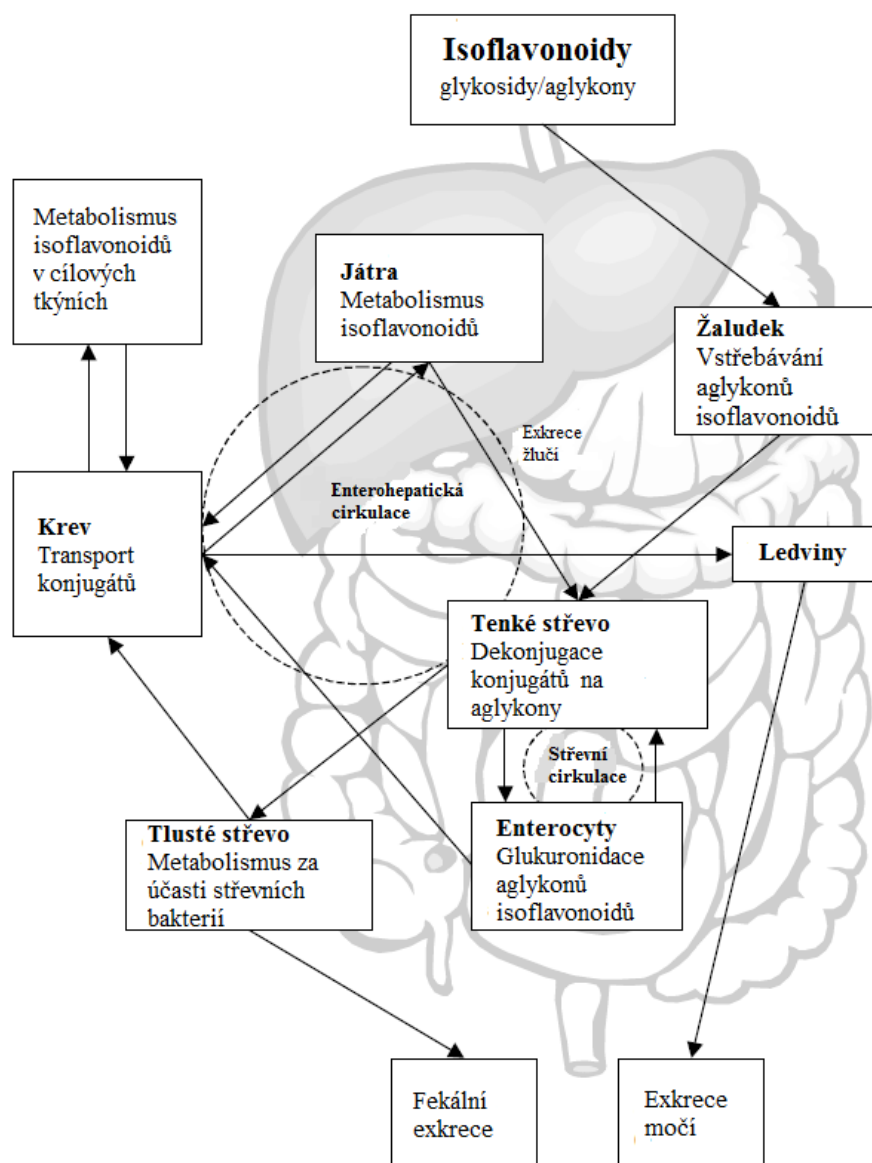
Aglykony snadno podléhají konjugaci při účasti střevních cytochromů P450 za vzniku glukuronidů a sulfátů. Vzniklé konjugáty, ale i aglykony, mohou být v organismu dále transportovány krví do cílové tkáně, tedy do jater, kde jsou podrobeny dalšímu metabolismu. Další cestou může být jejich vstup do enterohepatální cirkulace (Obr. 13). Na základě výše uvedeného lze usoudit, že osud isoflavonoidů v lidském organismu je velmi podobný s osudem endogenních estrogenů (Jia a kol., 2004).

Rychlost vstřebání je však ovlivněna řadou faktorů jako je rozpustnost látek ve střevě, složení střevní mikroflóry, stravování, ale i věk a pohlaví. Isoflavonoidy tedy podléhají v gastrointestinálním traktu rozličným metabolickým přeměnám. Střevní bakteriální glykosidázy štěpí glykosidické konjugáty a vzniklé aglykony podléhají dalším fázím biotransformace (Heinonen a kol., 2002).

Po vstupu do organismu může rovněž docházet ke změnám chemické struktury isoflavonoidů demethylací, methylací, hydroxylací či hydrogenací. Vzniklé sloučeniny se mohou dále konjugovat v játrech a ostatních tkáních na formu β -glukuronidů nebo sulfátů. Následně jsou hydrolyzovány a část konjugátů se dostává do kontaktu s mikroflórou tlustého střeva. Zatímco hydrolýzou glykosidů vznikají aktivnější sloučeniny, další degradace a transformace aglykonů vyvolává produkci více nebo méně aktivních látek (Cassidy a kol., 2006).

2. TEORETICKÁ ČÁST

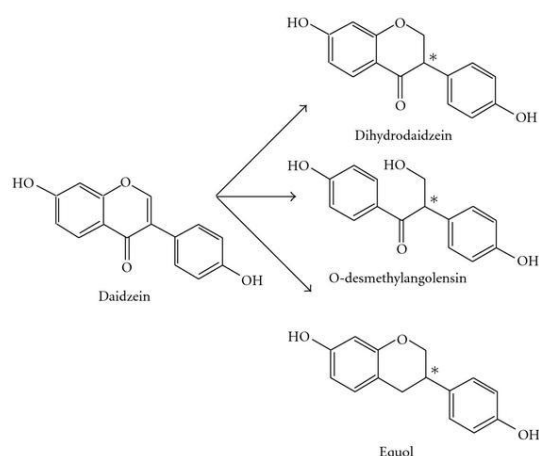
Hlavními metabolity isoflavonoidů jsou 7-*O* glukuronid a 4'-*O*-glukuronid. V lidské plazmě a moči pak byly nalezeny další metabolity, jako např. dihydrodaidzein, dihydrogenistein, dihydroequol, *O*-desmethylangolensin a 6 hydroxy-*O*-desmethylangolensin. Schopnost produkovat metabolity je také z velké části ovlivněna osídlením střev specifickými bakteriálními kmeny. Nejdůležitějšími bakteriálními kmeny podílejícími se na metabolismu isoflavonoidů jsou *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., a *Bacteroides* spp. (Hawksworth a kol., 1971).



Obrázek 13. Osud isoflavonoidů z pohledu metabolismu v organismu člověka (upraveno dle Heinonen, 2006)

2. TEORETICKÁ ČÁST

Velmi důležitou úlohu hrají střevní bakterie zodpovědné za přeměnu daidzeinu na equol, metabolit daidzeinu vykazující prospěšné účinky na lidský organismus (Sathyamoorthy a Wang, 1997). Equol je biologicky aktivnější než je jeho prekurzor daidzein i další metabolit daidzeinu *O*-desmethylangolensin (ODMA) (Obr. 14). Po perorálním podání daidzeinu byl equol nalezen v plasmě po 12–36 hodinách. Equol existuje ve dvou diastoisomerech S-equol a R⁺ equol, které vykazují rozdílné biologické vlastnosti.



Obrázek 14. Hlavní produkty metabolismu daidzeinu – dihydrodaidzein, *O*-desmethylangolensin (ODMA) a equol

Schopnost metabolizovat daidzein na účinné metabolity však vykazuje značné rozdíly mezi jednotlivci. Bakteriální mikroflóra zodpovědná za tvorbu equolu je popsána u 30-50% populace, 80-90% populace má střevní mikroflóru osídlenou bakteriemi se schopností tvorby *O*-desmethylangolensinu (Arai a kol., 2000). Bakteriální metabolismus isoflavonoidů tedy vykazuje značnou interindividuální variabilitu, která je způsobena jak rozdíly v populaci střevních bakterií, tak i rozmanitostí stravy člověka, která může ovlivňovat metabolickou aktivitu těchto bakterií.

2. TEORETICKÁ ČÁST

V předkládané práci byly ke studiu interakcí s lidskými jaterními mikrosomálními cytochromy P450 vybrány následující látky flavonoidní struktury, které se nejčastěji vyskytují v doplňcích stravy:

antokyanidiny (aglykony): kyanidin, delphinidin, malvidin, peonidin, petunidin, pelargonidin (Obr. 6),

antokyany (glykosidy): kyanidin-3-*O*-glukosid, kyanidin-3-*O*-rutinosid, kyanidin-3,5-di-*O*-glukosid, kyanidin-3-*O*-sophorosid, kyanidin-3-*O*-arabinosid, kyanidin-3-*O*-rhamnosid, kyanidin-3-*O*-galaktosid, kyanidin-3-*O*-sambubiosid, kyanidin-3-*O*-lathyrosid, delphinidin-3-*O*-glukosid, delphinidin-3-*O*-rutinosid, delphinidin-3,5-di-*O*-glukosid, delphinidin-3-*O*-sambubiosid, delphinidin-3-*O*-rhamnosid, malvidin-3-*O*-glukosid, malvidin-3,5-di-*O*-glukosid, malvidin-3-*O*-galaktosid, peonidin-3-*O*-glukosid, peonidin-3-*O*-rutinosid, pelargonidin-3,5-di-*O*-glukosid, pelargonidin-3-*O*-rutinosid (Příloha č. 1),

proantokyanidin: prokyanidin A2 (Obr. 10),

isoflavonoidy – aglykony: daidzein, genistein, biochanin A, formononetin, glycitein (Obr. 12),

isoflavonoidy – glykosidy: daidzin, puerarin, genistin, sissotrin, ononin, glycitin (Příloha č. 2) a **metabolit daidzeinu** equol (Obr. 14).

3. CÍLE PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo, vzhledem k hojnému užívání nutraceutik lidskou populací a tedy možnému ovlivnění hladin současně podávaných léčiv, studium potenciálních interakcí vybraných látek flavonoidní struktury – antokyanů, proantokyanidinu a isoflavonoidů, s nejvýznamnějšími enzymy biotransformace léčiv - cytochromy P450.

Konkrétními cíli studia interakcí testovaných látek s biotransformačními enzymy bylo:

→ Studovat inhibiční vliv antokyanů, proantokyanidinu a isoflavonoidů na enzymovou aktivitu cytochromů P450 obsažených v lidské jaterní mikrosomální frakci *in vitro*.

→ Posoudit vliv genetického polymorfismu vybraných CYP na metabolismus léčiv používaných současně jako markerové substráty pro stanovení *in vitro* enzymových aktivit CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6, respektive midazolamu, diklofenaku, S-mefenytinu a bufuralolu, za současného posouzení vlivu testovaného isoflavonoidu – genisteinu.

→ Zhodnotit potenciální riziko vzniku nežádoucích lékových interakcí vyplývajících z podání testovaných látek současně s dalšími léčivy, které slouží jako substráty studovaných biotransformačních enzymů.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

Kyanidin chlorid (CYA), delphinidin chlorid (DEL), malvidin chlorid (MAL), peonidin chlorid (PEO), petunidin chlorid (PET), pelargonidin chlorid (PEL), peonidin-3-*O*-glukosid chlorid (PEO-1), peonidin-3-*O*-rutinosid chlorid (PEO-2), pelargonidin-3,5-di-*O*-glukosid chlorid (PEL-1), pelargonidin-3-*O*-rutinosid chlorid (PEL-2), delphinidin-3-*O*-glukosid chlorid (DEL-1), delphinidin-3-*O*-rutinosid chlorid (DEL-2), delphinidin-3,5-di-*O*-glukosid chlorid (DEL-3), delphinidin-3-*O*-sambubiosid chlorid (DEL-4), delphinidin-3-*O*-rhamnosid chlorid (DEL-5), malvidin-3-*O*-glukosid chlorid (MAL-1), malvidin-3,5-di-*O*-glukosid chlorid (MAL-2), malvidin-3-*O*-galaktosid chlorid (MAL-3), kyanidin-3-*O*-glukosid chlorid (CYA-1), kyanidin-3-*O*-rutinosid chlorid (CYA-2), kyanidin-3,5-di-*O*-glukosid chlorid (CYA-3), kyanidin-3-*O*-sophorosid chlorid (CYA-4), kyanidin-3-*O*-arabinosid chlorid (CYA-5), kyanidin-3-*O*-rhamnosid chlorid (CYA-6), kyanidin-3-*O*-galaktosid chlorid (CYA-7), kyanidin-3-*O*-sambubiosid chlorid (CYA-8), kyanidin-3-*O*-lathyrosid chlorid (CYA-9), prokyanidin A2, daidzein (4',7-dihydroxyisoflavon), genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavon), biochanin A (5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavon), formononetin (7-hydroxy-4'-methoxyisoflavon), glycitein (4',7-dihydroxy-6-methoxyisoflavon), daidzin (daidzein-7-*O*-glukosid), puerarin (daidzein-8-*C*-glukosid), genistin (genistein-7-*O*-glukosid), sissotrin (biochanin A-7-*O*-glukosid), ononin (formononetin-7-*O*-glukosid), glycitin (glycitein-7-*O*-glukosid) a (+/-)-equol (4',7-dihydroxyisoflavan, 4',7-isoflavandiol) byly zakoupeny od firmy Extrasynthese (Genay, France).

Acetonitril a methanol (Merck, Česká republika), dusík a oxid uhelnatý (Linde Technoplyn, Česká republika), uhlíčan sodný a chlorid draselný (Lachema, Česká republika). Ostatní chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (Prague). Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1.2 Enzymy a substráty

Směsné lidské jaterní mikrosomy byly zakoupeny od firem Biopredic (Rennes, Francie) a Xenotech LLC (Lenexa, KS, USA). Mikrosomy byly získány v souladu s etickými pravidly země původu.

Byly použity směsné lidské jaterní mikrosomy od firmy Biopredic (dárči: 20 mužů a 6 žen) o proteinové koncentraci 25 mg/ml a od firmy (dárči: 26 mužů, 24 žen) s koncentrací 20 mg/ml. Pro farmakogenomické studie byly použity genotypizované lidské jaterní mikrosomy od firmy Xenotech LLC. Tyto geneticky definované mikrosomy byly získány od individuálních dárců pro tři alelické kategorie, a to rychlé metabolizátory, středně rychlé metabolizátory a pomalé metabolizátory.

Podrobná charakteristika jednotlivých forem je uvedena v tabulce 4.

Enzym	Označení	Alelická varianta	Koncentrace proteinu
2C9	PM	CYP2C9*?/*?	20 mg/ml
	IM	CYP2C9*1/*2	20 mg/ml
	EM	CYP2C9*1/*1	20 mg/ml
2C19	PM	CYP2C19*2/*2	20 mg/ml
	IM	CYP2C19*1/*2	20 mg/ml
	EM	CYP2C19*1/*1	20 mg/ml
2D6	PM	CYP2D6*4/*4	20 mg/ml
	IM	CYP2D6*4/*41	20 mg/ml
	EM	CYP2D6*2x2/*41	20 mg/ml
3A5	PM	CYP3A5*3/*3	20 mg/ml
	IM	CYP3A5*1/*3	20 mg/ml
	EM	CYP3A5*1/*1	20 mg/ml

Tabulka 4. Charakteristika použitých genotypizovaných mikrosomů, včetně genotypu a koncentrace proteinu.

Označení: PM – pomalý metabolizátor, IM – středně rychlý metabolizátor, EM – rychlý metabolizátor.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Substráty a metabolity pro stanovení enzymových aktivit cytochromů P450, testosteron, diklofenak, kumarin, chlorzoxazon, bufuralol, resorufin, *S*-mefenytin, 7-hydroxykumarin, 7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)kumarin, 1-hydroxymidazolam, 6-hydroxychlorzoxazon, 1-hydroxybufuralol, a 4-hydroxymefenytin byly pořízeny od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká Republika), 7-ethoxyresorufin, 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)kumarin, 4-hydroxydiklofenak byly zakoupeny od firmy Fluka (Buchs, Switzerland), 6 β -hydroxytestosteron byl pořízen od firmy Ultrafine (Manchester, UK) a midazolam byl zakoupen od firmy Abcam (Cambridge, UK).

4.1.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy AX 105 Delta-Range, Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko), analytické váhy GR-202, analytické váhy Sartorius 4503 MP 6E (Göttingen, Německo), centrifuga BR4i (Jouan, Saint Nazaire, Francie), centrifuga mini spin Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Německo), HPLC systém: řídicí jednotka CBM-20A (Shimadzu systém controller, Japonsko), software CLASS-VP (Shimadzu, Japonsko), detektory (Shimadzu UV-VIS detektor SPP-20A; Shimadzu fluorescenční detektor RF-10AXL, Japonsko), vyhřívání kolony CTO-10AC (Shimadzu column oven, Japonsko), autosampler Autoinjector SIL-10ACHT (Shimadzu, Japonsko), degaser mobilní fáze DGU-20A5 (Prominence degasser, Japonsko), pumpa LC-20AD (Shimadzu Liquid chromatogram, Japonsko), chlazená centrifuga Z 323 K (Hermle, dodává Biotech, Praha, CZ), pH metr Schott CG 843 (Fischer Scientific, Pardubice, CZ), předkolona RP-18 (LiChroCart 4-4, Merck, Germany), reverzní stacionární fáze RP-18 (LiChroCART 250-4, Merck, Germany), spektrofluorometr VARIAN CARY 4000 UV-VIS, TECAN Infinite M200 (od firmy Schoeller Instruments, Praha, CZ), suchá bloková lázeň MD-MP01-D (od Biotech, Praha, CZ), třepačka IKA MS 3 basic (MERCY s.r.o, Brno), ultrazvuk K 10 (Kraintek, Podhájska, Slovensko), vodní lázeň WB 14 (Mettler, Schwabach, Německo), vortex Heidolph Reax Top (od Fischer Scientific, Pardubice, CZ), Watrex Ultrapur (Watrex, Praha, CZ).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.2 Metody

4.2.1 Stanovení antokyanidinů metodou HPLC

Metoda stanovení obsahu antokyanidinů v doplňcích stravy je založena na disoluci vzorku v HCl (DMSO), následné izolaci antokyanů a úpravě kyselou hydrolyzou. V konečném kroku je vzorek analyzován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Durst a Wrolstad, 2001).

Příprava vzorku zahrnuje disoluci ve vodní lázni po dobu 1 hod. při 37°C v celkovém objemu 3 ml HCl (DMSO). Vzniklá suspenze je poté odstředěna (5000g, 10 minut). Supernatant je odebrán a analyzován. Úprava vzorku se skládá z následujících kroků:

- a) odpaření roztoku (DMSO) při 40°C pod dusíkem,
- b) disoluce odparku v 0,5 ml 2M HCl a převedení do mikrozkušavek,
- c) hydrolyza 30 minut ve vroucí vodě,
- d) zchlazení vzorku v ledové lázni,
- e) odpaření vzorku při 40°C pod dusíkem do odparku,
- f) disoluce odparku ve 200 μ l 10% CH₃COOH/ 5% acetonitril/ 1% H₃PO₄,
- g) převedení do vialek.

Separace probíhá na reverzní stacionární fázi RP-18 s předkolonou RP-18 při gradientové eluci s průtokem 1 ml mobilní fáze za minutu (Tab. 5). UV detekce probíhá při 520 nm.

Čas	Podíl mobilní fáze A [%] CH ₃ COOH:acetonitril:H ₃ PO ₄ (10:5:1)	Podíl mobilní fáze B [%] 100% acetonitril
0	95	5
20	80	20
25	95	5
30	95	5

Tabulka 5. HPLC gradient pro separaci antokyanidinů na koloně C₁₈

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.2.2 Stanovení enzymové aktivity lidských jaterních cytochromů P450

Pro stanovení enzymových aktivit jednotlivých forem cytochromů P450 v jaterní mikrosomální frakci byly použity standardní metody, založené na využití markerových substrátů pro jednotlivé formy cytochromů P450.

Vlastnímu stanovení enzymových aktivit, a tedy potenciálnímu inhibičnímu vlivu testovaných látek, předcházelo určení parametrů popisujících reakční kinetiku enzymových reakcí katalyzovaných cytochromy P450 v použité jaterní mikrosomální frakci.

Byla stanovena Michaelisova konstanta (K_m) a hodnota maximální rychlosti reakce (V_{max}).

Ke stanovení těchto parametrů byla použita vzestupná koncentrační řada substrátu pro určitý cytochrom P450. Na základě výsledných parametrů byly určeny koncentrace substrátů vhodné pro stanovení inhibičního vlivu testovaných látek (Tab. 6).

Enzym	Markerový substrát	Metabolit	K_m
CYP1A2	7-ethoxyresorufin	resorufin	1,4 $\mu\text{mol/l}$
CYP2A6	kumarin	7-hydroxykumarin	14,5 $\mu\text{mol/l}$
CYP2B6	7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)-kumarin	7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)-kumarin	15,3 $\mu\text{mol/l}$
CYP2C9	diklofenak	4'-hydroxydiklofenak	20 $\mu\text{mol/l}$
CYP2C19	S-mefenytin	4'-hydroxymefenytin	81 $\mu\text{mol/l}$
CYP2D6	bufuralol	1'-hydroxybufuralol	14,3 $\mu\text{mol/l}$
CYP2E1	chlorzoxazon	6-hydroxychlorzoxazon	56,4 $\mu\text{mol/l}$
CYP3A4/5	testosteron	6 β -hydroxytestosteron	97,2 $\mu\text{mol/l}$
CYP3A4/5	midazolam	1'-hydroxymidazolam	2,2 $\mu\text{mol/l}$

Tabulka 6. Používané markerové substráty, výsledné metabolity a Michaelisovy konstanty (K_m) stanoveny v lidské jaterní mikrosomální frakci.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.2.3 Stanovení enzymových aktivit a inhibičního vlivu antokyanů, proantokyanidinu a isoflavonoidů na vybrané formy cytochromů P450 *in vitro*

Inhibiční efekt antokyanů a proantokyanidinu na enzymovou aktivitu jednotlivých CYP byl sledován na šesti koncentračních úrovních testovaných látek - 0, 10, 20, 40, 80, 100 M. V případě inhibičních studií s isoflavonoidy pak byla použita koncentrační řada – 0, 10, 25, 50, 75 a 100 μM.

Jako potenciální inhibitory byly ze skupiny antokyanů použity chemické standardy šesti nejvýznamnějších antokyanových aglykonů – antokyanidinů, a to: kyanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin a petunidin.

Dále byl testován potenciální vliv na enzymovou aktivitu 21 antokyanových glykosidů, a to: kyanidin-3-*O*-glukosid, kyanidin-3-*O*-rutinosid, kyanidin-3,5-di-*O*-glukosid, kyanidin-3-*O*-sophorosid, kyanidin-3-*O*-arabinosid, kyanidin-3-*O*-rhamnosid, kyanidin-3-*O*-galaktosid, kyanidin-3-*O*-sambubiosid, kyanidin-3-*O*-lathyrosid, delfinidin-3-*O*-glukosid, delfinidin-3-*O*-rutinosid, delfinidin-3,5-di-*O*-glucosid, delfinidin-3-*O*-sambubiosid chlorid, delfinidin-3-*O*-rhamnosid, malvidin-3-*O*-glukosid, malvidin-3,5-di-*O*-glukosid, malvidin-3-*O*-galaktosid, pelargonidin-3,5-di-*O*-glukosid, pelargonidin-3-*O*-rutinosid, peonidin-3-*O*-glukosid a peonidin-3-*O*-rutinosid.

Jako zástupce proantokyanidinů byl v inhibičních studiích použit prokyanidin A2.

Ze skupiny isoflavonoidních látek byly pro inhibiční experimenty zvoleny aglykony daidzein, genistein, biochanin A, formononetin a glycitein, z glykosidů isoflavonoidů pak byl testován potenciální inhibiční vliv na enzymovou aktivitu cytochromů P450 daidzinu, puerarinu, genistinu, sissotrinu, ononinu, glycitinu a metabolitu daidzeinu - equolu.

Testované látky ze skupiny antokyanů byly, v případě aglykonů, rozpuštěny v deionizované vodě okyselené HCOOH na pH 3,08, v případě glykosidů pak v čisté vodě, stejně jako tomu bylo u prokyanidinu A2. Zásobní roztoky isoflavonoidů byly připraveny rozpuštěním v dimethylsulfoxidu (DMSO).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Koncentrace markerových substrátů pro stanovení enzymových aktivit byly zvoleny na základě experimentálně zjištěných hodnot K_m (Tab. 6).

Pro kvantitativní stanovení substrátu a metabolitu ve vzorcích byl použit HPLC systém ve spojení s různým typem detektoru (UV-VIS, fluorescenčním nebo hmotnostně spektrometrickým - MS). Jako stacionární fáze byla pro stanovení metabolitů v HPLC systému využita reverzní fáze C_{18} . Mobilní fází byla zpravidla směs acetonitrilu (popř. methanolu) a pufru (nejčastěji fosfátového) v různém poměru.

Na následujících stranách jsou shrnuty experimentální podmínky pro stanovení enzymových aktivit a inhibičního vlivu antokyanů a isoflavonoidů na jednotlivé formy cytochromů P450, na něž je tato práce zaměřena (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4/5).

CYP1A2 (Chang a Waxman, 1998)

Objem reakční směsi: 100 μ l

Mikrosomální frakce: 35 pmol cytochromu P450

Substrát: 1,4 μ M 7-ethoxyresorufin
100mM KH_2PO_4 pufr (pH 7,4)

Inhibitor:

Antokyan: 0, 10, 20, 40, 80, 100 μ M
Isoflavonoidy: 0, 10, 25, 50, 75, 100 μ M

Preinkubace:

30 min při 37 °C

NADPH-generující systém: 0,8mM $NADP^+$; 5,8mM isocitrát;
8mM Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

Inkubace:

15 min při 37 °C

Zastavení reakce: 200 μ l metanolu

Centrifugace při 14 000 ot/min, 10 minut, 4°C
centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)
200 μ l supernatantu přepipetováno do vialek

HPLC analýza s fluorescenční detekcí (excitace při 535 nm, emise při 585 nm)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

CYP2A6 (Waxman a Chang, 1998)

Objem reakční směsi: 100 μ l

Mikrosomální frakce: 35 pmol cytochromu P450

Substrát: 14,5 μ M kumarin

100mM KH_2PO_4 pufr (pH 7,4)

Inhibitor:

Antokyany: 0, 10, 20, 40, 80, 100 μ M

Isoflavonoidy: 0, 10, 25, 50, 75, 100 μ M

Preinkubace:

30 min při 37 $^{\circ}$ C

NADPH-generující systém: 0,8mM NADP^+ ; 5,8mM isocitrát;

8mM Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

Inkubace:

15 min při 37 $^{\circ}$ C

Zastavení reakce: 200 μ l metanolu

Centrifugace při 14 000 ot/min, 10 minut, 4 $^{\circ}$ C

centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)

200 μ l supernatantu přepipetováno do vialek

HPLC analýza s fluorescenční detekcí (excitace při 535 nm, emise při 585 nm)

CYP2B6 (Morse a Lu, 1998)

Objem reakční směsi: 100 μ l

Mikrosomální frakce: 35 pmol cytochromu P450

Substrát: 15,3 μ M 7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)kumarin

100mM KH_2PO_4 pufr (pH 7,4)

Inhibitor:

Antokyany: 0, 10, 20, 40, 80, 100 μ M

Isoflavonoidy: 0, 10, 25, 50, 75, 100 μ M

Preinkubace:

30 min při 37 $^{\circ}$ C

NADPH-generující systém: 0,8mM NADP^+ ; 5,8mM isocitrát;

8mM Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

Inkubace:

15 min při 37 $^{\circ}$ C

Zastavení reakce: 200 μ l metanolu

Centrifugace při 14 000 ot/min, 10 minut, 4 $^{\circ}$ C

centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)

200 μ l supernatantu přepipetováno do vialek

HPLC analýza s fluorescenční detekcí (excitace při 535 nm, emise při 585 nm)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

CYP2C9 (Crespi a kol., 1998b)

Objem reakční směsi: 200 μ l

Mikrosomální frakce: 35 pmol cytochromu P450

100mM KH_2PO_4 pufr (pH 7,4)

Inhibitor:

Antokyany: 0, 10, 20, 40, 80, 100 μ M

Isoflavonoidy: 0, 10, 25, 50, 75, 100 μ M

Preinkubace:

30 min při 37 $^\circ\text{C}$

Substrát: 20 μ M diklofenak

NADPH-generující systém: 0,8mM NADP^+ ; 5,8mM isocitrát;

8mM Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

Inkubace:

25 min při 37 $^\circ\text{C}$

Zastavení reakce: 50 μ l ACN/ CH_3COOH (94:6)

Centrifugace při 14 000 ot/min, 10 minut, 4 $^\circ\text{C}$

centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)

150 μ l supernatantu přepipetováno do vialek

HPLC analýza s UV detekcí při 280 nm

CYP2C19 (Cypex 2C19 QC assai, www.cypex.co.uk)

Objem reakční směsi: 200 μ l

Mikrosomální frakce: 62 pmol cytochromu P450

100mM KH_2PO_4 pufr (pH 7,4)

Inhibitor: 0, 10, 25, 50, 75, 100 μ M

NADPH-generující systém: 0,8mM NADP^+ ; 5,8mM isocitrát;

8mM Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

Preinkubace:

15 min při 37 $^\circ\text{C}$

Substrát: 81 μ M S-mefenytoin

Inkubace:

30 min při 37 $^\circ\text{C}$

Zastavení reakce: 200 μ l ACN/(0,1%)HCOOH

Centrifugace při 14 000 ot/min, 15 minut, 4 $^\circ\text{C}$

centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)

195 μ l pipetováno do mikrotitrační destičky

Interní standart:

Methoxymefenytoin (1mM) 5 μ l

Analýza RF/MS

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

CYP2D6 (Crespi a kol., 1998a)

Objem reakční směsi: 200 μ l

Mikrosomální frakce: 70 pmol cytochromu P450

Substrát: 14,3 μ M bufuralol

100mM KH_2PO_4 pufr (pH 7,4)

Inhibitor: 0, 10, 25, 50, 75, 100 μ M

Preinkubace:

30 min při 37 $^{\circ}\text{C}$

NADPH-generující systém: 0,8mM NADP^+ ; 5,8mM isocitrát;

8mM Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

Inkubace:

20 min při 37 $^{\circ}\text{C}$

Zastavení reakce: 20 μ l 70% HClO_4

Centrifugace při 3 000 ot/min, 5 minut

centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)

150 μ l supernatantu přepipetováno do vialek

HPLC analýze s fluorescenční detekcí (excitace při 252nm, emise při 302nm).

CYP2E1 (Lucas a kol., 1996)

Objem reakční směsi: 1000 μ l

Mikrosomální frakce: 160 pmol cytochromu P450

100mM KH_2PO_4 pufr (pH 7,4)

Inhibitor: 0, 10, 25, 50, 75, 100 μ M

NADPH-generující systém: 0,5mM NADP^+ ; 4mM isocitrát;

5mM Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenasa 0,2 U/ml

Preinkubace:

30 min při 37 $^{\circ}\text{C}$

Substrát: 56,4 μ M chlorzoxazon

Inkubace:

20 min při 37 $^{\circ}\text{C}$

Zastavení reakce: 50 μ l 42,5% H_3PO_4

20 s vířivá extrakce do 2 ml směsi 2-propanol/chloroform (15/85)

Centrifugace při 2 000 ot/min, 10 minut, 4 $^{\circ}\text{C}$

centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)

Odpipetovat 1 ml spodní vrstvy a odpařit pod dusíkem

Odparek rozpustit ve 200 μ l mobilní fáze (0,5% $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{ACN}$ (3:1))

200 μ l supernatantu přepipetováno do vialek

HPLC analýza s UV detekcí při 287 nm

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

CYP3A4 (Guengerich a kol., 1986)

Objem reakční směsi: 500 μ l

Mikrosomální frakce: 100 pmol cytochromu P450

100mM KH_2PO_4 pufr (pH 7,4)

Inhibitor:

Antokyany: 0, 10, 20, 40, 80, 100 μ M

Isoflavonoidy: 0, 10, 25, 50, 75, 100 μ M

NADPH-generující systém: 0,8mM NADP^+ ; 5,8mM isocitrát;

8mM Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

Preinkubace:

30 min při 37 $^{\circ}\text{C}$

Substrát: 97,2 μ M testosteron

Inkubace:

20 min při 37 $^{\circ}\text{C}$

Zastavení reakce: 100 μ l 1M Na_2CO_3 /2M NaCl

15 s vířivá extrakce do 2 ml dichlormethanu

Centrifugace při 3 000 ot/min, 5 minut, 4 $^{\circ}\text{C}$

centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)

Odpipetovat 1 ml spodní vrstvy a odpařit pod dusíkem

Odparek rozpustit ve 200 μ l mobilní fáze (64% metanol)

200 μ l supernatantu přepipetováno do vialek

HPLC analýza s UV detekcí při 245 nm

CYP3A4 (Kronbach a kol., 1989)

Objem reakční směsi: 100 μ l

Mikrosomální frakce: 12,56 pmol cytochromu P450

100mM KH_2PO_4 pufr (pH 7,4)

Inhibitor: 0, 10, 25, 50, 75, 100 μ M

NADPH-generující systém: 0,8mM NADP^+ ; 5,8mM isocitrát;

8mM Mg^{2+} ; isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml

Preinkubace:

15 min při 37 $^{\circ}\text{C}$

Substrát: 30,7 μ M midazolam

Inkubace:

15 min při 37 $^{\circ}\text{C}$

Zastavení reakce: 100 μ l methanolu (vychlazeného)

Vortex 10s

Centrifugace při 13 400 ot/min, 5 minut, 4 $^{\circ}\text{C}$

centrifuga BR4i, Jouan (Saint Nazaire, Francie; rotor AB.214)

150 μ l supernatantu přepipetováno do vialek

HPLC analýza s UV detekcí při 240 nm

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Výsledný inhibiční efekt testovaných látek na aktivitu cytochromů P450 byl následně graficky vyhodnocen, kdy do grafů byly vyneseny hodnoty aktivit jednotlivých cytochromů P450 vyjádřené v procentech.

Míra inhibice byla stanovena jako procentuální úbytek vzniklého produktu vzhledem ke kontrole (100%), která neobsahovala v reakční směsi potenciální inhibitory – testované antokyany, proantokyanidin a isoflavonoidy.

Pokud byla daná forma cytochromů P450 některou z testovaných látek výrazně inhibována, byla následně stanovena hodnota K_i , příp. IC_{50} . Pro stanovení byl použit Dixonův nebo Lineweaverův-Burkův výnos. Stanovení jsou, v případě Dixonových výnosů, založena na ovlivnění enzymové aktivity příslušných cytochromů P450 použitím tří koncentrací markerového substrátu ($1/2 K_m$, K_m a $2 K_m$).

Pro konstrukci Lineweaverových-Burkových výnosů je třeba stanovení na šesti koncentračních úrovních testovaného inhibitoru (0, 10, 25, 50, 75, 100 μM).

Výsledné parametry enzymové kinetiky pro určení hodnot K_i a IC_{50} byly vyčísleny užitím grafického software Sigma Plot 8.0.2 softwaru (SPSS, Chicago, IL).

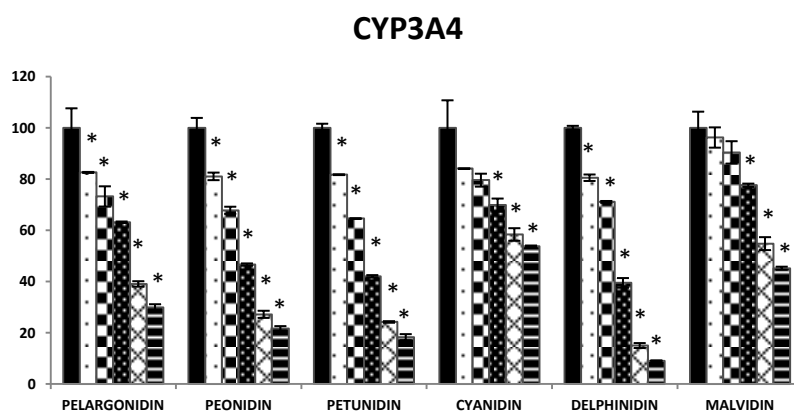
5. VÝSLEDKY

5.1 Stanovení inhibičního vlivu antokyanů na aktivitu cytochromů P450 v lidské jaterní mikrosomální frakci

Stanovení inhibičního vlivu antokyanidinů na enzymovou aktivitu CYP

Potenciální inhibiční vliv na enzymovou aktivitu pěti forem cytochromu P450 přítomných v lidských jaterních mikrozomech (CYP3A4, CYP2C9, CYP1A2, CYP2A6 a CYP2B6) byl testován u šesti antokyanidinů.

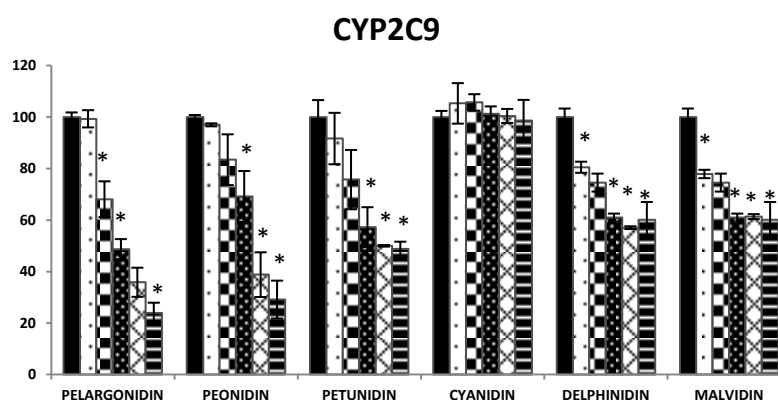
Výrazná inhibice markerové aktivity byla pozorována u CYP3A4 a to se všemi testovanými látkami. Nejvýraznější inhibice pak byla stanovena v případě delphinidinu (Obr. 15). Při nejvyšší testované koncentraci delphinidinu (100 μM) došlo k poklesu enzymové aktivity CYP3A4 na 8 %. Petunidin způsobil v nejvyšší testované koncentraci pokles enzymové aktivity CYP3A4 na 18 %, peonidin na 22 % a pelargonidin na 28 % ve srovnání s kontrolní hodnotou.



Obrázek 15. Inhibiční efekt antokyanidinů v koncentracích 0, 10, 20, 40, 80, 100 μM na enzymovou aktivitu CYP3A4

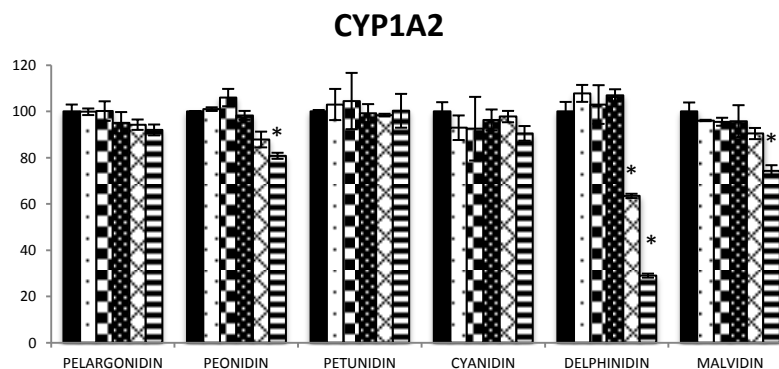
5. VÝSLEDKY

Enzymová aktivita CYP2C9 byla signifikantně ovlivněna třemi antokyanidiny – pelargonidinem, peonidinem a petunidinem (Obr. 16). K nejvýraznějšímu poklesu CYP2C9 došlo inhibicí pelargonidinem - na 22 % při 100 μ M koncentraci použitého antokyanidinu, z původní 100 % enzymové aktivity v kontrolních vzorcích (tj. bez přídavku testovaných látek). Peonidin inhiboval enzymovou aktivitu CYP2C9 přibližně na 28 %, petunidin způsobil pokles na 48 %.



Obrázek 16. Inhibiční efekt antokyanidinů v koncentracích 0, 10, 20, 40, 80, 100 μ M na enzymovou aktivitu CYP2C9

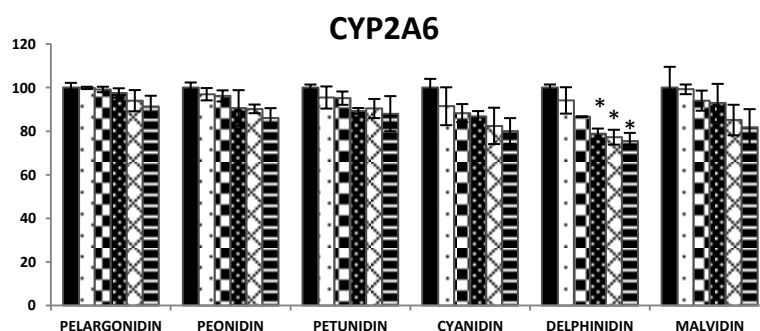
V případě potenciálního inhibičního vlivu na enzymovou aktivitu CYP1A2 byla výrazná inhibice pozorována delphinidinem. V tomto případě byl pozorován pokles při použití nejvyšší koncentrace testované látky (100 μ M) na 30 %. Ostatní antokyanidiny způsobily snížení enzymové aktivity CYP1A2 pouze mezi 10-20 % ve srovnání s kontrolními hodnotami (bez přídavku potenciálního inhibitoru) (Obr. 17).



Obrázek 17. Inhibiční efekt antokyanidinů v koncentracích 0, 10, 20, 40, 80, 100 μ M na enzymovou aktivitu CYP1A2

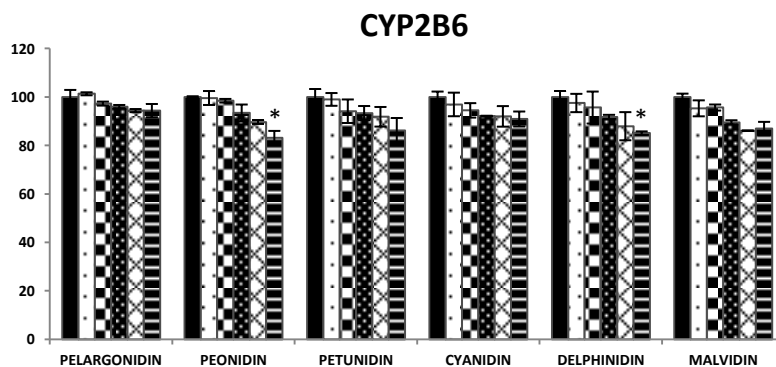
5. VÝSLEDKY

Testované antokyanidiny dále pouze slabě interagovaly s CYP2A6 a CYP2B6. U těchto forem cytochromu P450 nebyla enzymová aktivita výrazně snížena ani v přítomnosti vyšších koncentrací testovaných látek. Maximální pokles enzymové aktivity CYP2A6 v přítomnosti 100 μM koncentrace antokyanidinů byl zaznamenán mezi 10-20 % vůči kontrolám (Obr. 18).



Obrázek 18. Inhibiční efekt antokyanidinů v koncentracích 0, 10, 20, 40, 80, 100 μM na enzymovou aktivitu CYP2A6

Podobná situace byla pozorována také v případě enzymové aktivity CYP2B6, kdy inhibice aktivity tohoto enzymu neklesla ani u jednoho z testovaných antokyanidinů pod 85 % z původní 100 % aktivity v kontrolních vzorcích (bez přítomnosti inhibitoru) při nejvyšší koncentraci testovaných látek (Obr. 19).



Obrázek 19. Inhibiční efekt antokyanidinů v koncentracích 0, 10, 20, 40, 80, 100 μM na enzymovou aktivitu CYP2B6

5. VÝSLEDKY

V dalších krocích byly u testovaných antokyanidinů, které signifikantně inhibovaly enzymovou aktivitu některých z testovaných cytochromů P450, zjištěny hodnoty inhibiční koncentrace - IC₅₀.

Konkrétně se jednalo o inhibici enzymových aktivit CYP3A4 pelargonidinem, peonidinem, petunidinem, kyanidinem, delphinidinem a malvidinem, CYP2C9 – pelargonidinem, peonidinem a petunidinem a CYP1A2 - delphinidinem (Tab. 7).

Enzym	Testovaná látka	IC ₅₀
CYP3A4	pelargonidin	55 μM
	peonidin	36 μM
	petunidin	32 μM
	kyanidin	129 μM
	delphinidin	31 μM
	malvidin	90 μM
CYP2C9	pelargonidin	25 μM
	peonidin	61 μM
	petunidin	21 μM
CYP1A2	delphinidin	59 μM

Tabulka 7. Inhibice CYP3A4, CYP2C9 a CYP1A2 antokyanidiny vyjádřená jako IC₅₀

5. VÝSLEDKY

Stanovení inhibičního vlivu antokyaninů na aktivitu cytochromů P450 v lidské jaterní mikrosomální frakci

Stanovení možného inhibičního vlivu na enzymovou aktivitu některých forem cytochromu P450 přítomných v lidských jaterních mikrosomech (CYP3A4, CYP2C9, CYP2A6 a CYP2B6) bylo provedeno také s antokyaniny, tedy glykosidy dříve studovaných antokyanidinů.

Největší inhibiční efekt testovaných antokyaninů na enzymovou aktivitu byl pozorován, stejně jako v případě aglykonů – antokyanidinů, u formy CYP3A4.

V přítomnosti nejvyšší koncentrace testované látky v reakční směsi (tj. 100 μ M) došlo v případě testované látky CYA-6 (kyanidin-3-rhamnosid) k poklesu enzymové aktivity CYP3A4 přibližně na 28 % z původní hodnoty v kontrolních vzorcích.

U třinácti testovaných antokyaninů (DEL-1, delfinidin-3-glukosid; DEL-2, delfinidin-3-rutinosid; DEL-3, delfinidin-3,5-di-glukosid; DEL-4, delfinidin-3-sambubiosid; DEL-5, delfinidin-3-rhamnosid; MAL-1, malvidin-3-glukosid; MAL-3, malvidin-3-galaktosid; CYA-1, kyanidin-3-glukosid; CYA-2, kyanidin-3-rutinosid; CYA-4, kyanidin-3-sophorosid; CYA-5, kyanidin-3-arabinosid; CYA-8, kyanidin-3-sambubiosid; CYA-9, kyanidin-3-lathyrosid) bylo pozorováno snížení enzymové aktivity CYP3A4 v rozmezí 40 – 60 % oproti kontrolním hodnotám.

Ostatní testované antokyaniny způsobily pokles enzymové aktivity pouze v rozmezí 10-30 % (Obr. 20).

Enzymová aktivita CYP2C9 byla, stejně jako v případě CYP3A4, nejvíce inhibována antokyaninem CYA-6 (kyanidin-3-rhamnosid), a to na 43 % vzhledem ke kontrole, při 100 μ M koncentraci inhibitoru. Dále byla u formy CYP2C9 zaznamenána inhibice DEL-1 (delfinidin-3-glukosid) s poklesem aktivity na 58 % a CYA-9 (kyanidin-3-lathyrosid), který vykazoval inhibici na 62 %, při 100 μ M koncentraci antokyaninu v reakční směsi.

U zbylých testovaných látek ze skupiny antokyaninů byla enzymová aktivita CYP2C9 nejvyšší použitou koncentrací zkoumaných látek snížena průměrně o 10 – 25 % (Obr. 21).

5. VÝSLEDKY

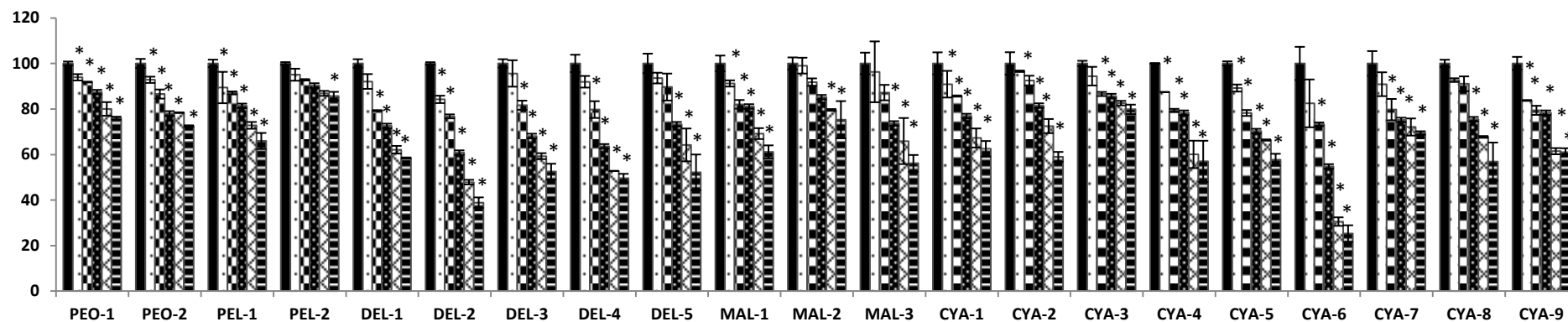
Inhibiční efekt byl sledován také u enzymové aktivity CYP2A6. Rozsah inhibice rostl se zvyšující se koncentrací testované látky, avšak inhibice aktivity tohoto enzymu neklesla ani u jednoho z testovaných antokyaninů pod 70 % z původní 100 % aktivity v kontrolních vzorcích (tedy ve vzorcích bez přítomnosti testovaných látek). Nejvyšší pokles enzymové aktivity byl pozorován u CYA-6 (kyanidin-3-rhamnosid) a CYA-9 (kyanidin-3-lathyrosid). V obou případech testované antokyaniny způsobily snížení aktivity CYP2A6 na 70 % (Obr. 22).

Enzymová aktivita CYP2B6 byla nejvýrazněji inhibována antokyaninem CYA-2 (kyanidin-3-rutinosid), který způsobil při nejvyšší koncentraci testované látky (100 μ M) pokles na 50 %. Dalším testovaným antokyaninem, který měl významný inhibiční vliv na aktivitu CYP2B6 byl CYA-6 (kyanidin-3-rhamnosid) se snížením na 60 % z původní 100 % aktivity v kontrolních vzorcích při nejvyšší koncentraci zkoumaného antokyaninu.

Mírnější ovlivnění enzymové aktivity CYP2B6 bylo pozorováno se čtyřmi dalšími testovanými antokyaniny, konkrétně se jednalo o DEL-2 (delfinidin-3-rutinosid), MAL-3 (malvidin-3-galaktosid), CYA-4 (kyanidin-3-sophorosid) a CYA-9 (kyanidin-3-lathyrosid). U těchto látek bylo zjištěno snížení enzymové aktivity CYP2B6 na 70 - 80 % původních (kontrolních) hodnot při maximálních použitých koncentracích testovaných látek (100 μ M). Ostatní antokyaniny způsobily pouze 5 – 20 % snížení enzymové aktivity CYP2B6 vůči kontrolním vzorkům (Obr. 23).

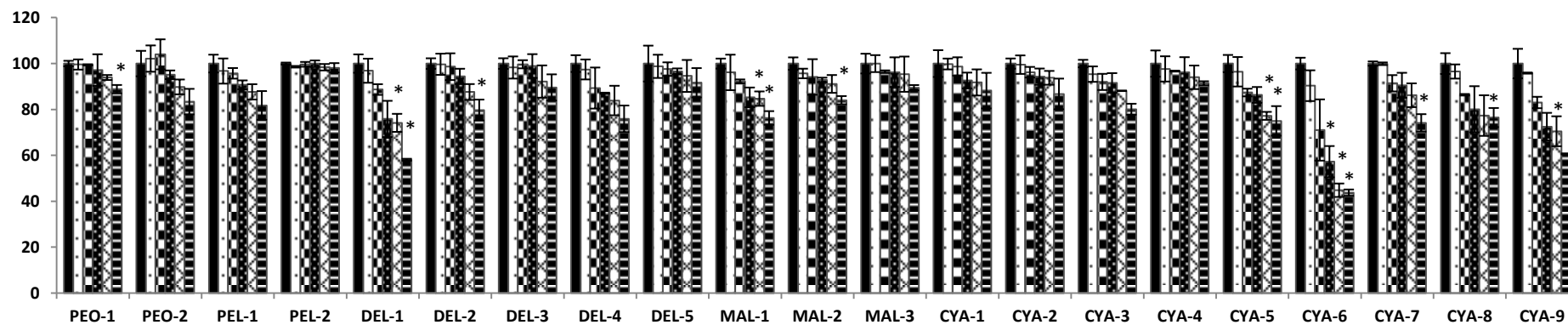
Kompletní shrnutí výsledků inhibičního vlivu testovaných antokyaninů na specifickou enzymovou aktivitu testovaných cytochromů P450 (CYP3A4, CYP2C9, CYP2A6 a CYP2B6) je graficky znázorněno v následujících grafech (Obr. 20 – 23).

CYP3A4



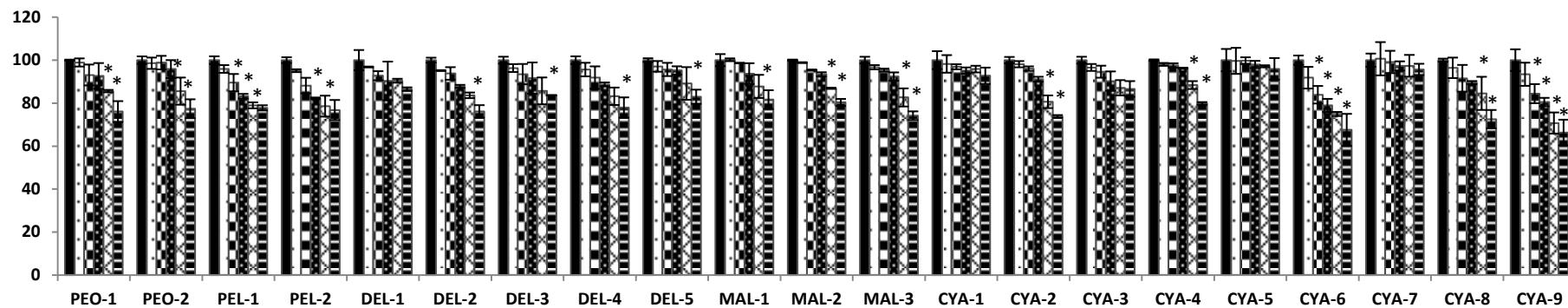
Obrázek 20. Inhibiční efekt antokyaninů v koncentracích 0, 10, 20, 40, 80, 100 µM na enzymovou aktivitu CYP3A4

CYP2C9



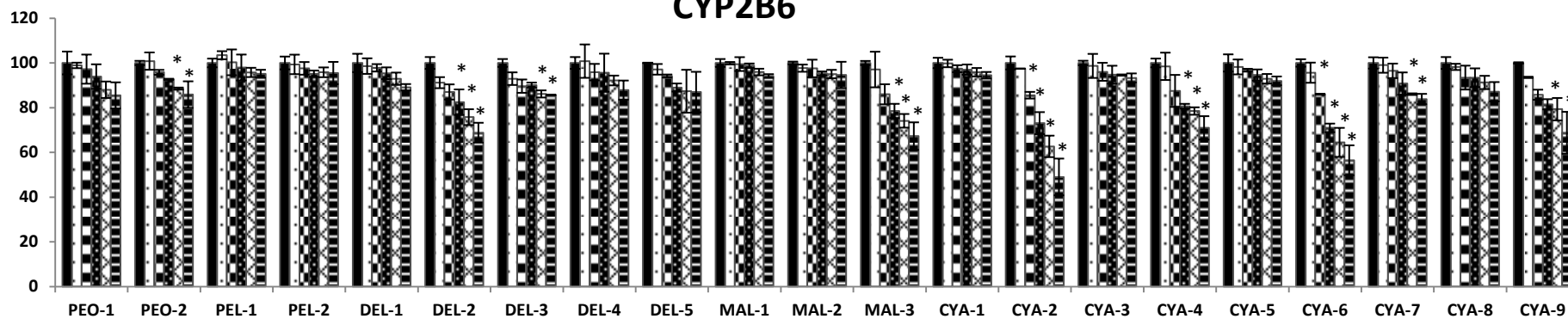
Obrázek 21. Inhibiční efekt antokyaninů v koncentracích 0, 10, 20, 40, 80, 100 µM na enzymovou aktivitu CYP2C9

CYP2A6



Obrázek 22. Inhibiční efekt antokyanidinů v koncentracích 0, 10, 20, 40, 80, 100 µM na enzymovou aktivitu CYP2A6

CYP2B6



Obrázek 23. Inhibiční efekt antokyanidinů v koncentracích 0, 10, 20, 40, 80, 100 µM na enzymovou aktivitu CYP2B6

5. VÝSLEDKY

Vhledem k výraznému inhibičnímu potenciálu některých testovaných antokyaninů vůči CYP3A4, CYP2C9 a CYP2B6 byly v dalších krocích u látek, které signifikantně ovlivňovaly enzymovou aktivitu daných CYP, zjištěny hodnoty inhibiční koncentrace - IC_{50} .

Hodnoty IC_{50} byly stanoveny pro inhibici enzymové aktivity CYP3A4 testovanými antokyaniny s označením DEL-2 (delfinidin-3-rutinosid), DEL-3 (delfinidin-3,5-di-glukosid), DEL-4 (delfinidin-3-sambubiosid), DEL-5 (delfinidin-3-rhamnosid) a CYA-6 (kyanidin-3-rhamnosid). Dále pro inhibice CYP2C9 látkou CYA-6 (kyanidin-3-rhamnosid) a CYP2B6 antokyaniny CYA-2 (kyanidin-3-rutinosid) a CYA-6 (kyanidin-3-rhamnosid).

Kompletní seznam testovaných antokyaninů, které v inhibičních studiích významně interagovali s některou ze sledovaných forem CYP a k nim příslušné hodnoty inhibičních koncentrací (IC_{50}), jsou uvedeny v Tabulce 8.

Enzym	Testovaná látka	IC_{50}
CYP3A4	DEL-2 (delfinidin-3-rutinosid)	69 μ M
	DEL-3 (delfinidin-3,5-di-glukosid)	88 μ M
	DEL-4 (delfinidin-3-sambubiosid)	77 μ M
	DEL-5 (delfinidin-3-rhamnosid)	82 μ M
	CYA-6 (kyanidin-3-rhamnosid)	53 μ M
CYP2C9	CYA-6 (kyanidin-3-rhamnosid)	68 μ M
CYP2B6	CYA-2 (kyanidin-3-rutinosid)	77 μ M
	CYA-6 (kyanidin-3-rhamnosid)	92 μ M

Tabulka 8. Inhibice CYP3A4, CYP2C9 a CYP2B6 antokyaniny vyjádřená jako IC_{50}

5. VÝSLEDKY

5.2 Stanovení inhibičního vlivu proantokyanidinu na aktivitu cytochromů P450 v lidské jaterní mikrosomální frakci

V inhibičních studiích s prokyanidinem A2 bylo potenciální ovlivnění enzymové aktivity testováno u tří významných forem cytochromu P450, a to CYP3A4, CYP2C9 a CYP1A2.

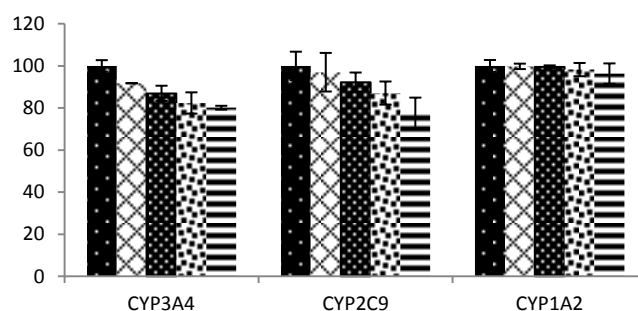
Ukázalo se, že míra inhibice markerové aktivity u enzymů CYP3A4 a CYP2C9 rostla se zvyšující se koncentrací prokyanidinu A2. Nicméně sledovaná inhibice enzymové aktivity příslušných enzymů neklesla pod 75 % ve srovnání s kontrolními vzorky (bez přítomnosti prokyanidinu A2).

V případě enzymové aktivity CYP3A4 bylo při použití maximální koncentrace sledované látky pozorováno snížení aktivity na 80 % vůči kontrole bez potenciálního inhibitoru.

Enzymová aktivita CYP2C9 byla v přítomnosti nejvyšší koncentrace (100 μM) testovaného prokyanidinu A2 v reakční směsi inhibována přibližně na 75 % z původní hodnoty ve srovnávacích vzorcích.

Zanedbatelný inhibiční efekt prokyanidinu A2 byl zjištěn u enzymové aktivity CYP1A2. V případě tohoto enzymu nedošlo ke snížení sledované aktivity ani v přítomnosti nejvyšší koncentrace testované látky. Pozorovaný pokles při 100 μM koncentraci byl pouze asi 5 %, což je hodnota pohybující se v rámci nebo na rozhraní experimentální chyby.

Na obrázku 24 jsou shrnuty grafy pro stanovení inhibičního efektu prokyanidinu A2 na markerovou aktivitu testovaných forem cytochromu P450.



Obrázek 24. Inhibiční efekt prokyanidinu A2 v koncentracích 0, 10, 20, 40, 80, 100 μM na enzymovou aktivitu vybraných forem cytochromu P450

5. VÝSLEDKY

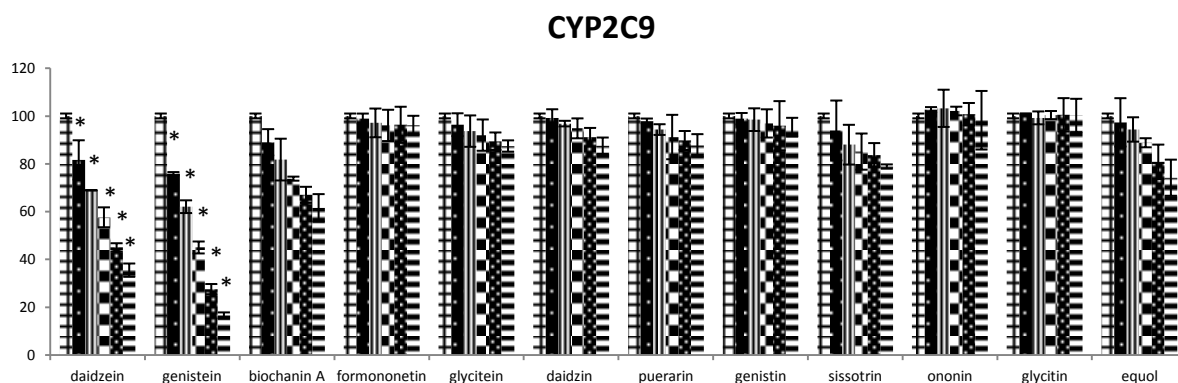
5.3 Stanovení inhibičního vlivu isoflavonoidů na aktivitu cytochromů P450 v lidské jaterní mikrosomální frakci

Studium možných interakcí isoflavonoidů s cytochromy P450 bylo provedeno s osmi jaterními enzymy, které se nejčastěji účastní metabolismu léčiv v lidském organismu (viz. Obr. 4). Jednalo se o formy CYP2C9, CYP3A4, CYP2E1, CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP2B6 a CYP2A6.

Isoflavonoidy byly do reakční směsi přidávány v koncentrační řadě 0, 10, 25, 50, 75 a 100 μM .

Ze získaných dat vyplývá, že nejvýraznější inhibiční efekt isoflavonoidů se projevil na aktivitách CYP2C9 a CYP3A4.

Výrazný inhibiční vliv na enzymovou aktivitu CYP2C9 měl aglykon genistein, který způsobil při nejvyšší koncentraci testované látky (100 μM) pokles na 18 %. Významná inhibice byla u CYP2C9 rovněž pozorována s dalším významným zástupcem ze skupiny isoflavonoidů, daidzeinem, který způsobil 100 μM koncentrací pokles enzymové aktivity na 36 % v porovnání s kontrolními vzorky bez testovaného isoflavonoidu. Další inhibice CYP2C9 isoflavonoidy byla zaznamenána s biochaninem A, který zapříčinil v nejvyšší testované koncentraci (tj. 100 μM) snížení aktivity dané formy CYP na 60 % původní hodnoty (Obr. 25).



Obrázek 25. Inhibiční efekt isoflavonoidů v koncentracích 0, 10, 25, 50, 75, 100 μM na enzymovou aktivitu CYP2C9

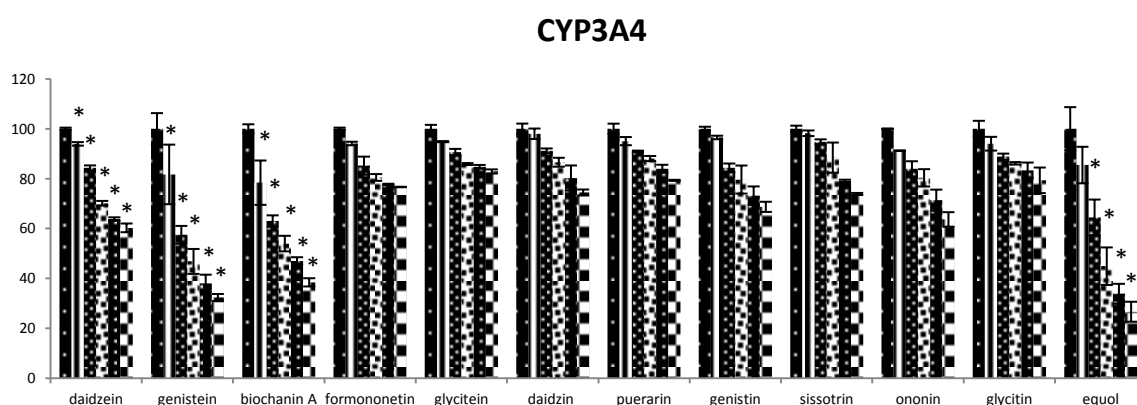
5. VÝSLEDKY

Signifikantní inhibiční efekt isoflavonoidů byl pozorován také u enzymové aktivity CYP3A4. V inhibičních studiích byly v tomto případě použity dva modelové substráty pro CYP3A4, testosteron a midazolam.

Významné ovlivnění enzymové aktivity CYP3A4 bylo pozorováno s testovanou látkou equol, a to při použití obou markerových substrátů pro CYP3A4.

Enzymová aktivita testované formy CYP3A4 byla equolem, za specifické reakce 6 β -hydroxylace testosteronu, výrazně inhibována již při 50 μ M koncentraci testované látky. Za těchto podmínek byl pozorován pokles aktivity na 40 % z původní hodnoty v kontrolních vzorcích. Maximální koncentrací inhibitoru (100 μ M) pak došlo ke snížení enzymové aktivity přibližně na 25 % oproti srovnávacím vzorkům (bez přidavku inhibitoru).

Další významné inhibice CYP3A4 isoflavonoidy byly zaznamenány s aglykony genisteinem a biochaninem A. Stanovením pomocí markerového substrátu testosteronu byla enzymová aktivita snížena již při 25 μ M koncentraci genisteinu v reakční směsi asi na 45 %. Nejvyšší koncentrace genisteinu pak způsobila snížení aktivity CYP3A4 na 35 % v porovnání s kontrolními hodnotami. V případě biochaninu A pak byl zaznamenán maximální pokles na 40 %.



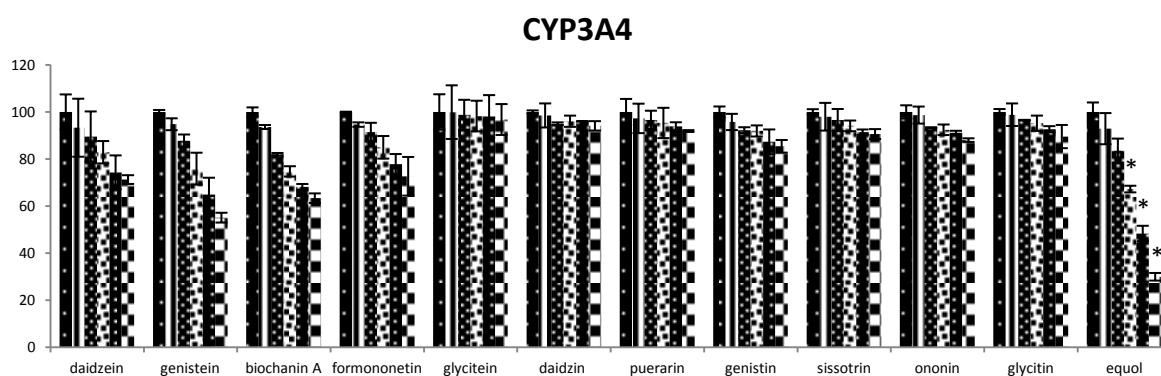
Obrázek 26. Inhibiční efekt isoflavonoidů v koncentracích 0, 10, 25, 50, 75, 100 μ M na enzymovou aktivitu CYP3A4 při použití testosteronu jako specifického substrátu

5. VÝSLEDKY

Mírnější ovlivnění enzymové aktivity CYP3A4 bylo pozorováno při použití testosteronu jako substrátu se třemi dalšími testovanými isoflavonoidy. Jednalo o aglykon daidzein, a glykosidy ononin a genistin. U těchto testovaných látek bylo zjištěno snížení enzymové aktivity CYP3A4 na 60 - 70 % původních hodnot při maximálních použitých koncentracích látek v experimentech (100 μ M). Ostatní isoflavonoidy inhibovaly enzymovou aktivitu CYP3A4 mírněji, pozorované snížení aktivity bylo v rozsahu 15 – 25 % vůči kontrolním vzorkům (Obr. 26).

Inhibiční experimenty zaměřené na potenciální ovlivnění enzymové aktivity CYP3A4 byly, jak je zmíněno výše, provedeny také užitím midazolamu, jako dalšího markerového substrátu vhodného pro tuto formu cytochromu P450. Stejně jako u stanovení s testosteronem byl opět, i v případě specifické 1'-hydroxylace midazolamu, nejvýraznější inhibiční efekt pozorován s equolem. Použitím maximální koncentrace testované látky (100 μ M) v reakční směsi došlo k inhibici na 25 %. Snížení enzymové aktivity CYP3A4 bylo dále pozorováno s aglykonem genisteinem, kdy došlo ke snížení na 55 % oproti kontrolním vzorkům.

Významná, ačkoli mírnější, inhibice CYP3A4 isoflavonoidy byla ve stanoveních s midazolamem dále zjištěna se třemi dalšími testovanými aglykony – biochaninem A, daidzeinem a formononetinem. U těchto látek byla míra inhibice stanovena mezi 25 – 40 % při nejvyšších koncentracích použitých v experimentu.

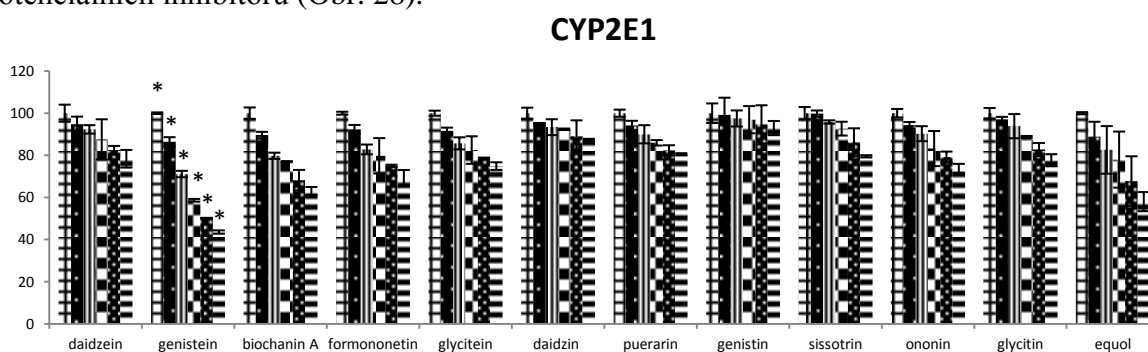


Obrázek 27. Inhibiční efekt isoflavonoidů v koncentracích 0, 10, 25, 50, 75, 100 μ M na enzymovou aktivitu CYP3A4 při použití midazolamu jako specifického substrátu

Zbylé z testovaných isoflavonoidních látek ovlivňovaly enzymovou aktivitu CYP3A4 pouze slabě v rozsahu nepřevyšujícím 15 % snížení ve srovnání původními hodnotami (Obr. 27).

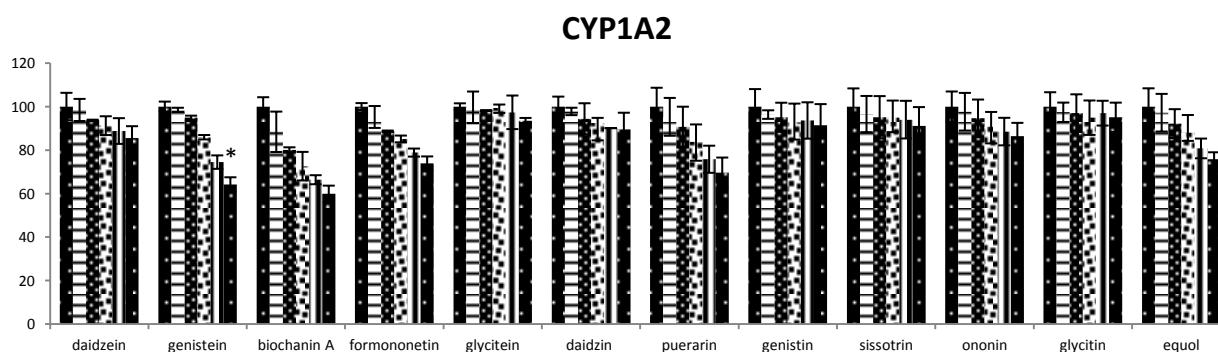
5. VÝSLEDKY

Také u enzymové aktivity CYP2E1 byl sledován rostoucí rozsah inhibice markerové aktivity tohoto enzymu se zvyšujícími se koncentracemi testovaných látek. U deseti sledovaných isoflavonoidů byl prokázán pokles aktivity pod 80 %. Nejvýrazněji byla forma CYP2E1 inhibována genisteinem a equolem, kdy nejvyššími koncentracemi testovaných látek došlo ke snížení asi na 45 % v případě genisteinu a přibližně na 60 % u inhibice equolem, vždy vztaženo k původním (100 %) aktivitám v kontrolních vzorcích bez přítomnosti potenciálních inhibitorů (Obr. 28).



Obrázek 28. Inhibiční efekt isoflavonoidů v koncentracích 0, 10, 25, 50, 75, 100 µM na enzymovou aktivitu CYP2E1

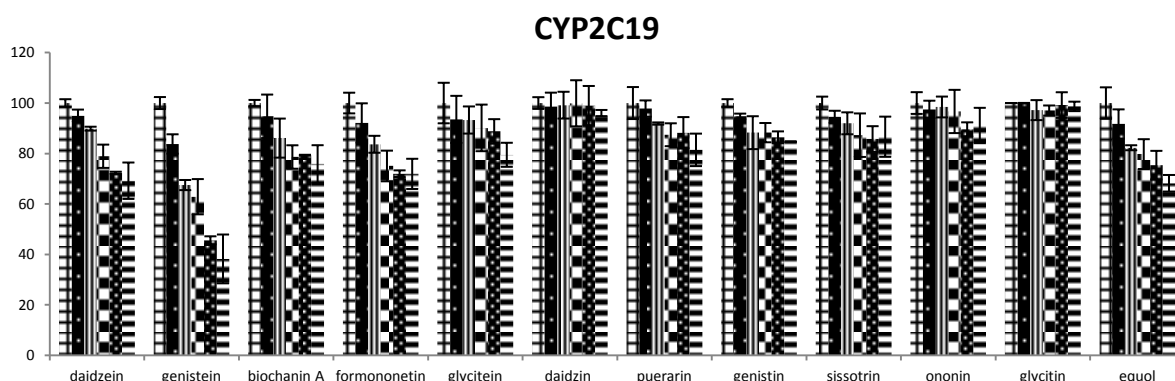
Testované isoflavonoidy měly rovněž značný inhibiční efekt na enzymovou aktivitu CYP1A2, kdy bylo v pěti případech pozorováno snížení enzymové aktivity tohoto enzymu pod 70 %. Nejvíce byla aktivita CYP1A2 ovlivněna přítomností biochaninu A a genisteinu, kdy zaznamenaný pokles dosahoval u obou testovaných látek přibližně na 60 % vůči 100 % srovnávacím hodnotám, tedy bez přidavku sledovaných isoflavonoidů. Významné snížení enzymové aktivity CYP1A2 bylo zjištěno s puerarinem, formononetinem a equolem, u těchto látek byl pozorován pokles na 70 % (Obr. 29).



Obrázek 29. Inhibiční efekt isoflavonoidů v koncentracích 0, 10, 25, 50, 75, 100 µM na enzymovou aktivitu CYP1A2

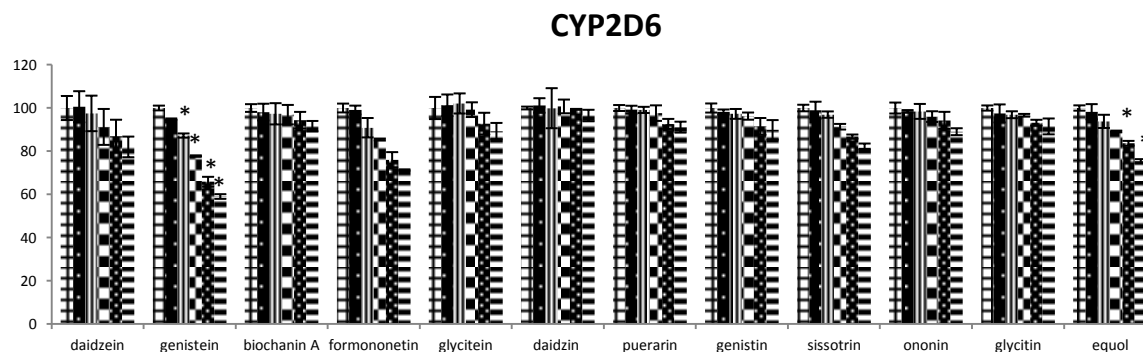
5. VÝSLEDKY

Inhibiční efekt isoflavonoidů byl pozorován také u formy CYP2C19. Výrazná inhibice byla v tomto případě zjištěna s genisteinem, kdy došlo ke snížení enzymové aktivity CYP2C19 asi na 40 % při 100 μM koncentraci. Mírnější inhibice byla pozorována také s dalšími testovanými látkami, konkrétně se jednalo o daidzein, biochanin A, formononetin a equol. U těchto látek bylo zjištěno snížení enzymové aktivity CYP2C19 na 60 - 70 % původních hodnot při maximálních použitých koncentracích testovaných látek (100 μM) (Obr. 30).



Obrázek 30. Inhibiční efekt isoflavonoidů v koncentracích 0, 10, 25, 50, 75, 100 μM na enzymovou aktivitu CYP2C19

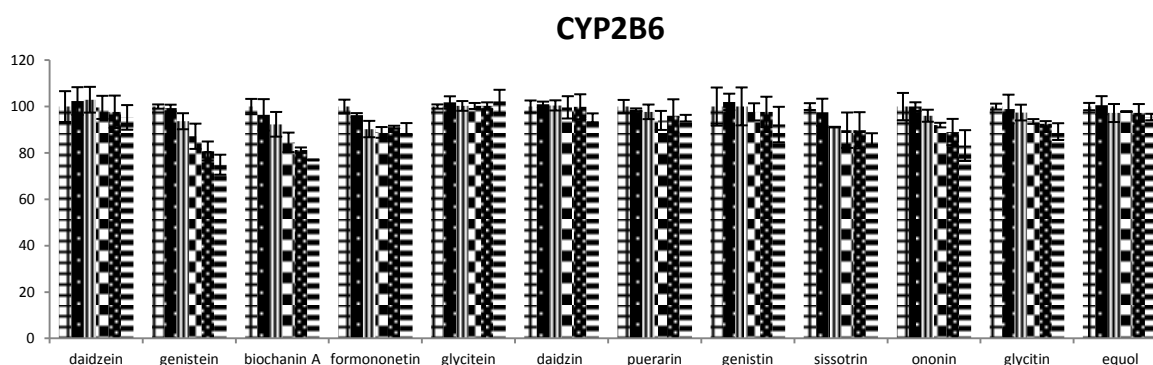
Inhibice enzymové aktivity testovanými isoflavonoidy byla pozorována také u CYP2D6. Ve větším rozsahu byla tato forma inhibována dvěma v experimentu použitými látkami. Nejvýraznější inhibiční efekt na sledovanou aktivitu CYP2D6 byl způsoben genisteinem, který při nejvyšší testované koncentraci snižoval enzymovou aktivitu na 60 %. Další isoflavonoidní aglykon – formononetin, inhiboval za stejných podmínek tuto formu CYP přibližně na 70 %. Přítomností daidzeinu, equolu a sissotrinu došlo ke snížení enzymové aktivity CYP2D6 přibližně na 80 % (Obr. 31).



Obrázek 31. Inhibiční efekt isoflavonoidů v koncentracích 0, 10, 25, 50, 75, 100 μM na enzymovou aktivitu CYP2D6

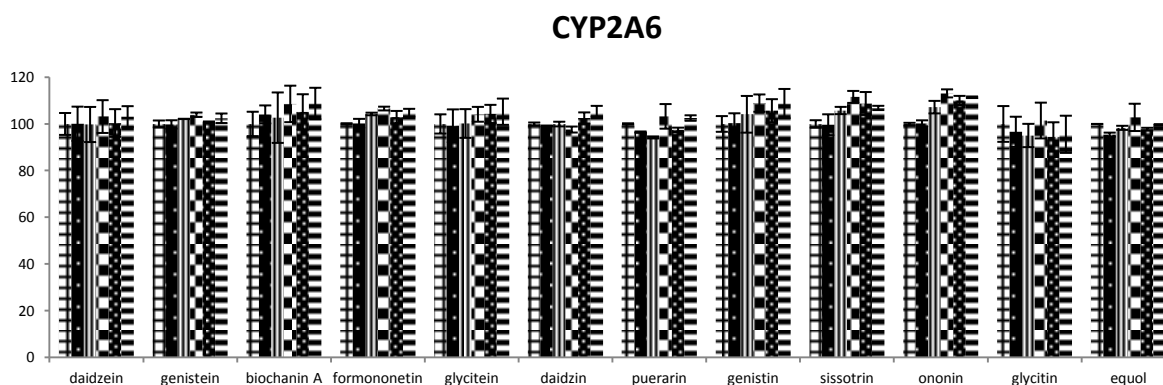
5. VÝSLEDKY

Testované isoflavonoidy neměly výrazný inhibiční efekt na enzymovou aktivitu CYP2B6. Míra inhibice markerové aktivity CYP2B6 se zvyšovala s rostoucí koncentrací testovaných isoflavonoidů, avšak nebyla zaznamenána výraznější inhibice enzymové aktivity. Nejvíce byla v případě formy CYP2B6 enzymová aktivita ovlivněna opět aglykonem genisteinem, ovšem maximální koncentrace této testované látky v reakční směsi způsobila snížení aktivity pouze na 75 % z původní 100 % hodnoty v kontrolních vzorcích (Obr. 32).



Obrázek 32. Inhibiční efekt isoflavonoidů v koncentracích 0, 10, 25, 50, 75, 100 μM na enzymovou aktivitu CYP2B6

Ze získaných výsledků inhibičních experimentů s isoflavonoidy bylo zjištěno, že enzymová aktivita CYP2A6 nebyla testovanými látkami ovlivněna ani jedním z potenciálních inhibitorů použitých v prováděných inhibičních studiích (Obr. 33).



Obrázek 33. Inhibiční efekt isoflavonoidů v koncentracích 0, 10, 25, 50, 75, 100 μM na enzymovou aktivitu CYP2A6

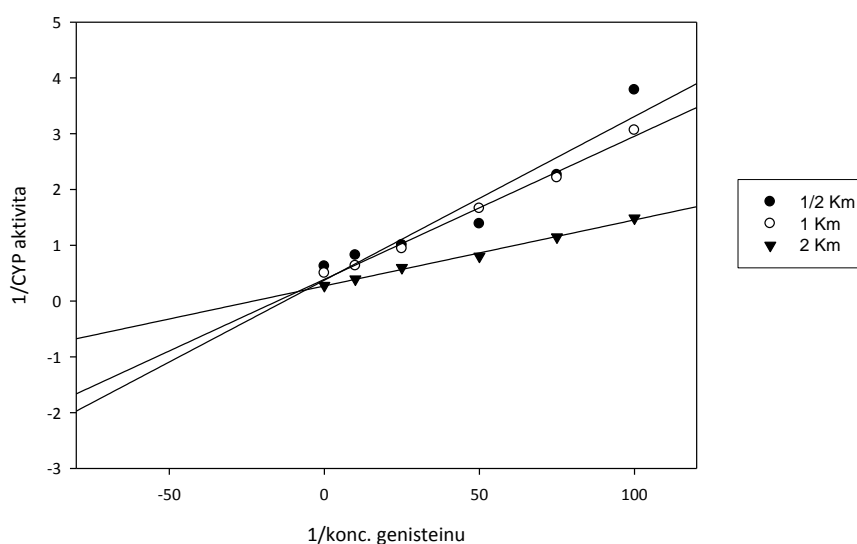
5. VÝSLEDKY

Následně po provedených inhibičních studiích s isoflavonoidy bylo v dalších krocích u testovaných látek, které signifikantně inhibovaly enzymovou aktivitu vybraných testovaných cytochromů P450, zjištěno o jaký typ enzymové inhibice se jedná. Konkrétně se jednalo o inhibici enzymových aktivit CYP2C9 genisteinem a daidzeinem, a CYP3A4 equolem, genisteinem a biochaninem A.

Pro stanovení typu enzymové inhibice u výrazně inhibujících isoflavonoidů byly provedeny experimenty umožňující sestavení Dixonových a Lineweaverových-Burkových výnosů. Stanovení jsou, v případě Dixonových výnosů, založena na ovlivnění enzymové aktivity příslušných cytochromů P450 použitím tří koncentrací markerového substrátu ($1/2 K_m$, K_m a $2 K_m$).

Pro konstrukci výnosů dle Lineweavera a Burka je třeba stanovení na šesti koncentračních úrovních testovaného inhibitoru (0, 10, 25, 50, 75, 100 μM).

Na základě průběhu Dixonova výnosu interagoval testovaný isoflavonoidní aglykon genistein s CYP2C9 jako plně nekomepetitivní inhibitor s inhibiční konstantou K_i 36 μM (Kotyk a Horák, 1977) (Obr. 34).

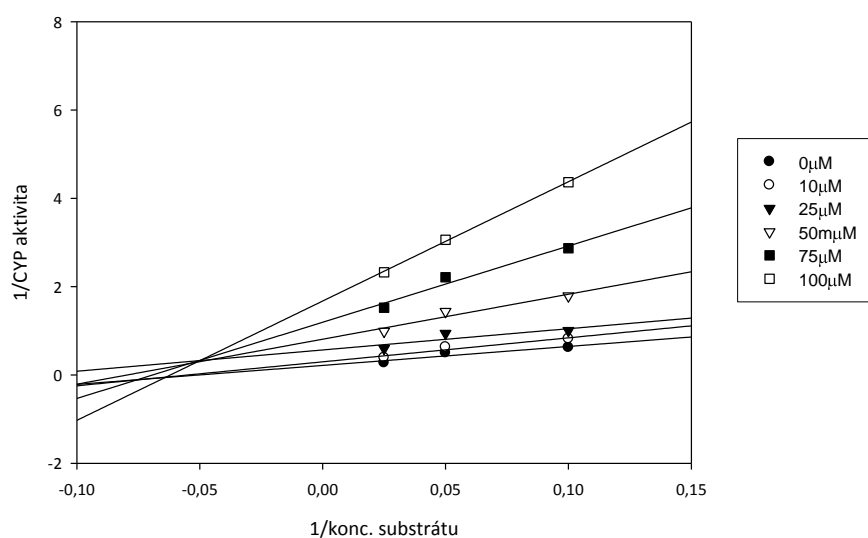


Obrázek 34. Průběh Dixonova výnosu pro inhibici CYP2C9 genisteinem

5. VÝSLEDKY

Vzhledem k signifikantnímu inhibičnímu efektu genisteinu na enzymovou aktivitu CYP2C9, kdy v inhibičních experimentech způsobil pokles aktivity při 100 μM koncentraci testované látky na 18 % z původní 100 % aktivity, byl dále k určení typu této inhibice sestrojen výnos podle Lineweavera a Burka.

V případě ovlivnění CYP2C9 genisteinem inhiboval testovaný isoflavonoid rovněž dle Lineweaverova-Burkova výnosu markerovou aktivitu tohoto enzymu plně nekompetitivně (Kotyk a Horák, 1977) (Obr. 35).



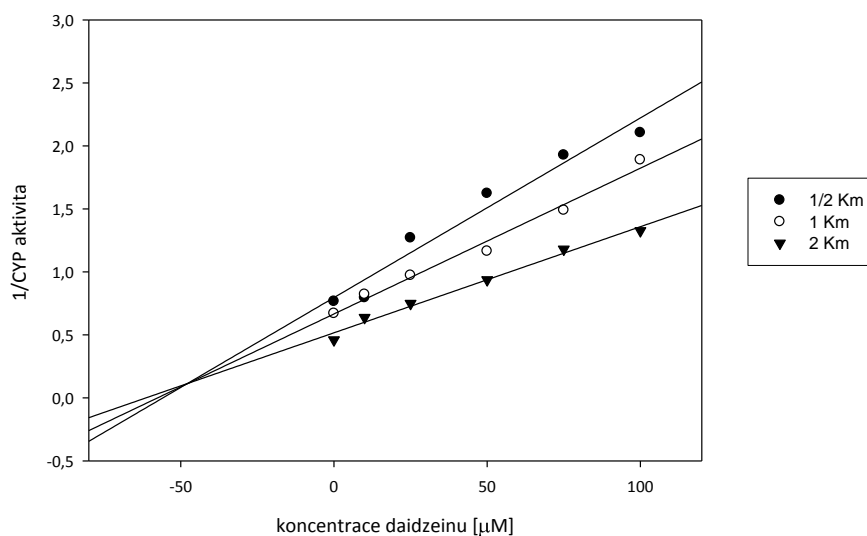
Obrázek 35. Průběh Lineweaverova-Burkova výnosu pro inhibici CYP2C9 genisteinem

Významné ovlivnění enzymové aktivity CYP2C9 bylo v inhibičních studiích pozorováno také s významným zástupcem skupiny isoflavonoidů aglykonem daidzeinem, jehož 100 μM koncentrací v reakční směsi byl pozorován pokles enzymové aktivity dané formy cytochromu P450 na 36 % v porovnání s kontrolními vzorky bez přítomnosti daidzeinu.

5. VÝSLEDKY

Na základě průběhu Dixonova výnosu vyplývá, pro výše uvedenou inhibici CYP2C9 daidzeinem, že tento testovaný isoflavonoid je vůči CYP2C9 pravděpodobně plně nekompetitivním inhibitorem (Kotyk a Horák, 1977) (Obr. 36).

Zjištěná hodnota K_i je podle sestrojeného Dixonova výnosu v případě inhibice enzymové aktivity CYP2C9 daidzeinem $61 \mu\text{M}$.

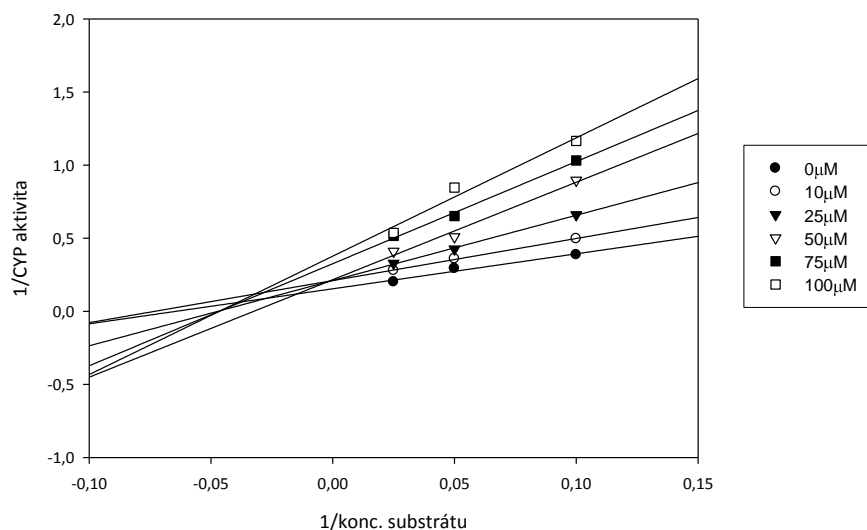


Obrázek 36. Průběh Dixonova výnosu pro inhibici CYP2C9 daidzeinem

K určení resp. potvrzení nalezeného typu inhibice v případě ovlivnění enzymové aktivity CYP2C9 daidzeinem byl zkonstruován i výnos podle Lineweavera a Burka.

5. VÝSLEDKY

Dle průběhu křivek se dá i na základě tohoto sestrojeného grafu usuzovat na plně nekompetitivní inhibici enzymatické aktivity formy CYP2C9 daidzeinem (Kotyk a Horák, 1977) (Obr. 37).



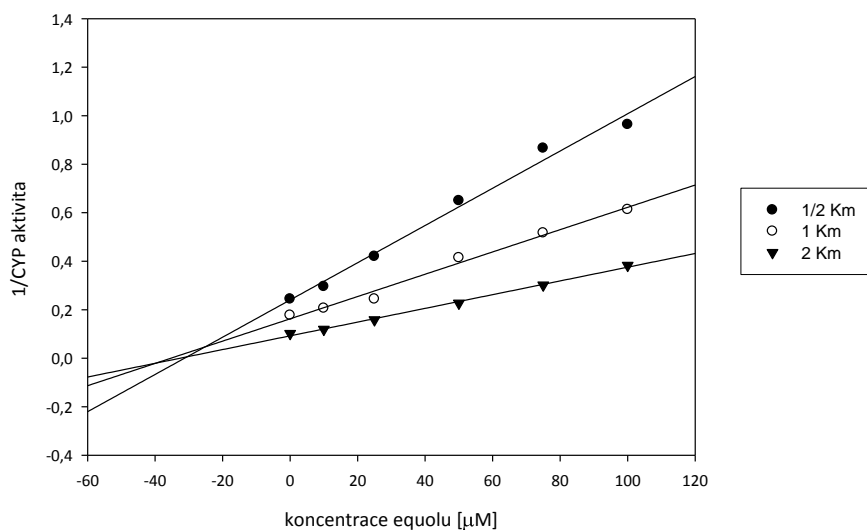
Obrázek 37. Průběh Lineweaverova-Burkova výnosu pro inhibici CYP2C9 daidzeinem

Na základě signifikantního poklesu enzymové aktivity CYP3A4 na 25 % původní kontrolní hodnoty vlivem přítomnosti nejvyšší testované koncentrace isoflavonoidní látky equolu, byly rovněž provedeny experimenty umožňující vytvoření Dixonova a Lineweaverova-Burkova výnosu s následným určením typu inhibice aktivity CYP3A4 equolem a stanovením hodnot inhibičních konstant pro jednotlivé výnosy (K_i).

Z průběhu Dixonova výnosu vyplývá, že se testovaná látka equol chovala vůči CYP3A4 jako plně nekompetitivní inhibitor (Kotyk a Horák, 1977) (Obr. 38).

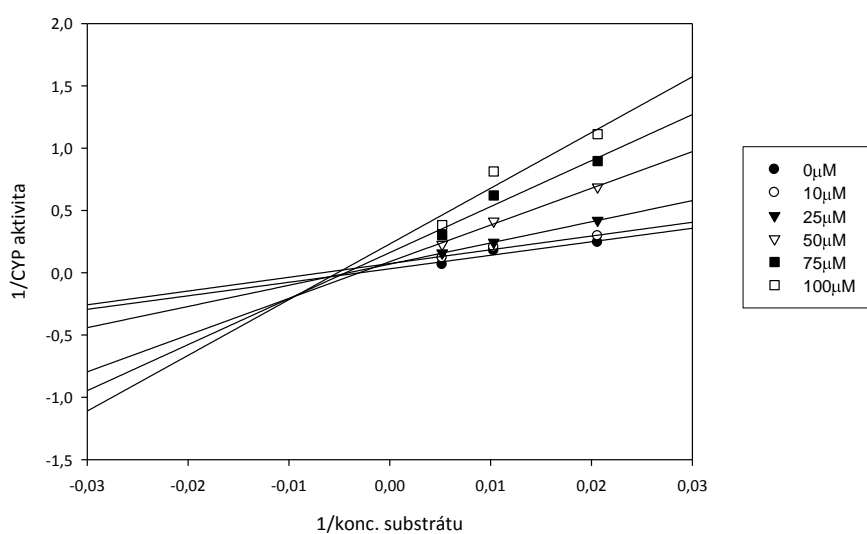
5. VÝSLEDKY

Inhibiční konstanta (K_i) byla stanovena pro inhibici CYP3A4 equolem podle Dixonova výnosu $38 \mu\text{M}$.



Obrázek 38. Průběh Dixonova výnosu pro inhibici CYP3A4 equolem

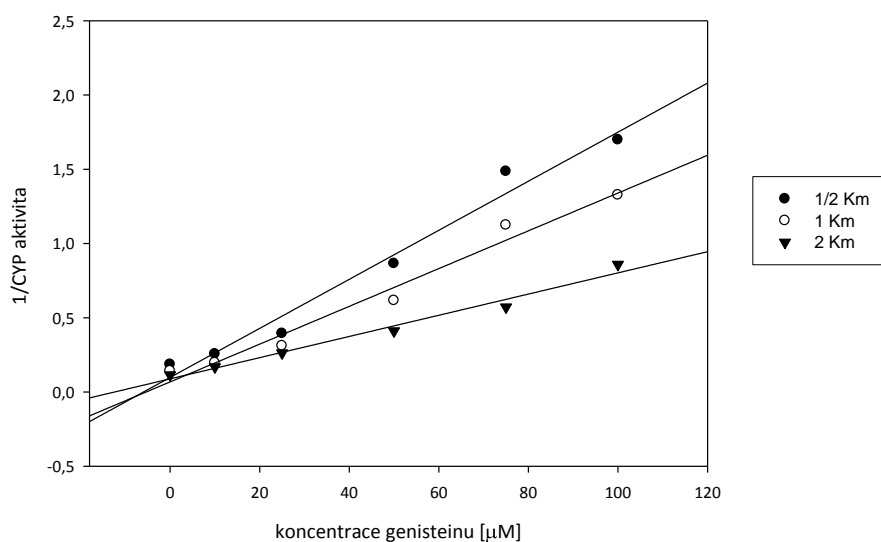
Zkonstruováním Lineweaverova-Burkova výnosu a následným vyhodnocením dat bylo zjištěno, že stejně jako v případě výsledků vyplývajících na základě sestavení Dixonova výnosu pro inhibici enzymové aktivity CYP3A4 equolem, probíhá i dle průběhu Lineweaverova-Burkova výnosu tato inhibice equolem plně nekompetitivním mechanismem (Kotyk a Horák, 1977) (Obr. 39).



Obrázek 39. Průběh Lineweaverova-Burkova výnosu pro inhibici CYP3A4 equolem

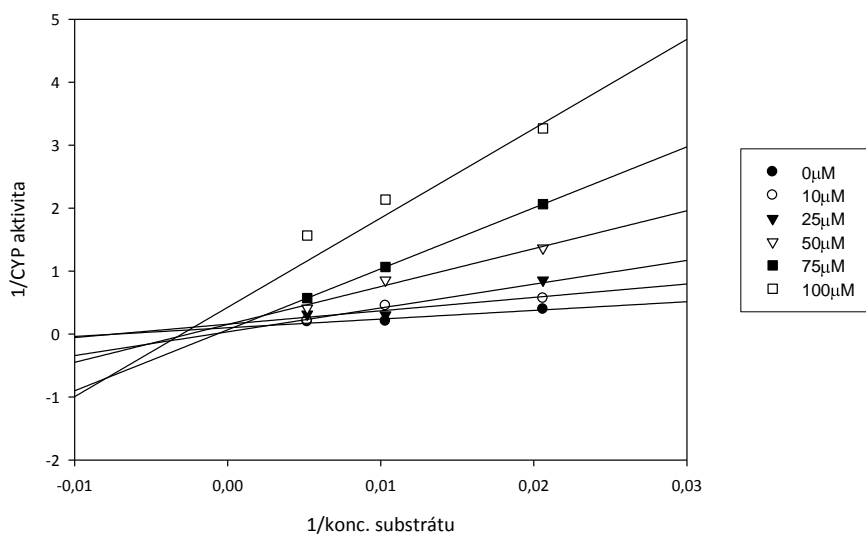
5. VÝSLEDKY

Na základě dat získaných v inhibičních studiích poukazujících na široký inhibiční potenciál isoflavonoidů vůči CYP3A4, bylo pozorováno snížení aktivity také genisteinem (na 35 %). Vyhodnocením výsledků a podle tvaru závislostí v Dixonově výnosu interagoval genistein s CYP3A4 plně nekompetitivním mechanismem s inhibiční konstantou K_i 23 μM (Obr. 40).



Obrázek 40. Průběh Dixonova výnosu pro inhibici CYP3A4 genisteinem

Pro inhibici CYP3A4 genisteinem vyplývá také z průběhu Lineweaverova-Burkova výnosu, že se vůči CYP3A4 chová jako plně nekompetitivní inhibitor (Obr. 41).

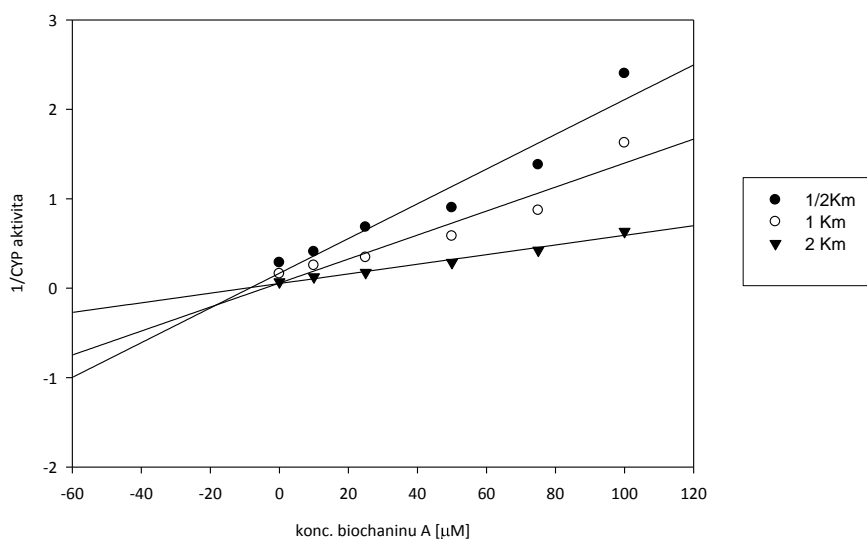


Obrázek 41. Průběh Lineweaverova-Burkova výnosu pro inhibici CYP3A4 genisteinem

5. VÝSLEDKY

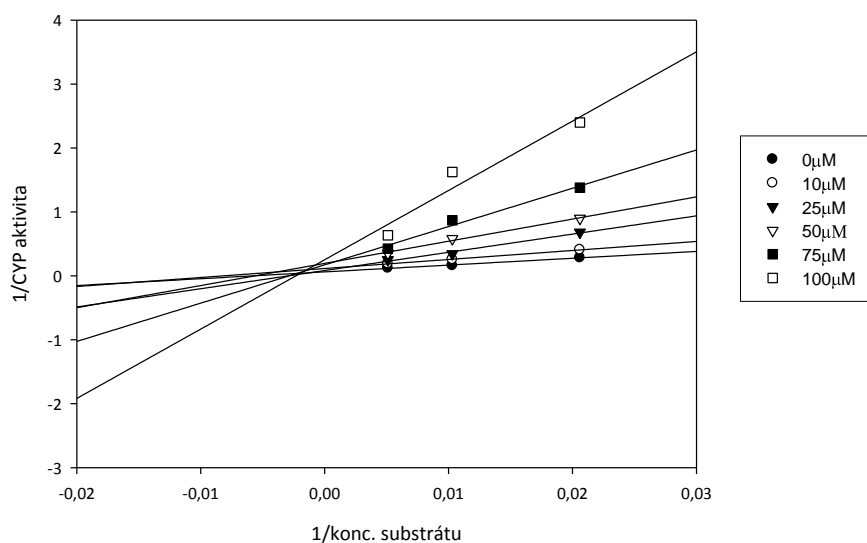
V případě inhibice CYP3A4 testovanými isoflavonoidními látkami bylo významné ovlivnění enzymové aktivity (na 40 %) zaznamenáno také s biochaninem A.

Sestrojením Dixonova výnosu bylo zjištěno, že inhibice CYP3A4 biochaninem A probíhá plně nekompetitivním mechanismem (Obr. 42) s hodnotou inhibiční konstanty K_i 58 μM .



Obrázek 42. Průběh Dixonova výnosu pro inhibici CYP3A4 biochaninem A

Podle průběhu Lineweaverova-Burkova výnosu pro inhibici CYP3A4 biochaninem A bylo rovněž určeno, že se v tomto případě jedná o nekompetitivní typ inhibice (Obr. 43).



Obrázek 43. Průběh Lineweaverova-Burkova výnosu pro inhibici CYP3A4 biochaninem A

5. VÝSLEDKY

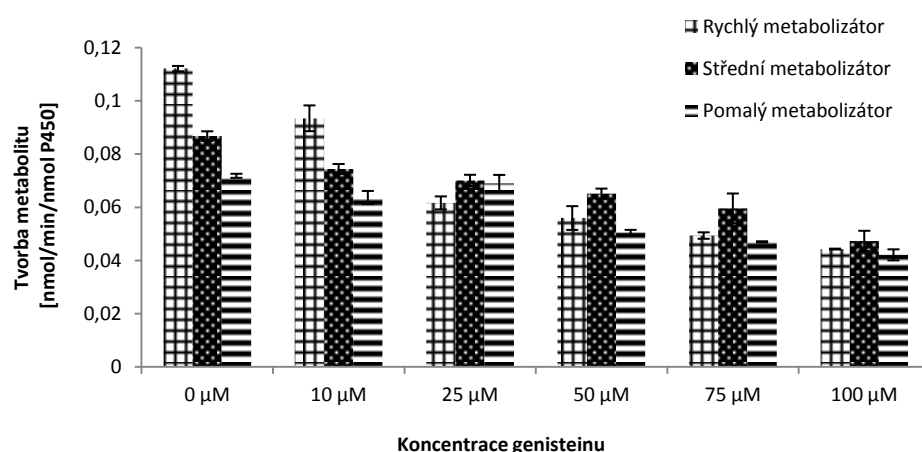
5.4 Vliv genetického polymorfismu CYP na metabolismus vybraných léčiv za současného sledování inhibičního vlivu genisteinu

Vliv genetického polymorfismu CYP na metabolismus léčiv používaných zároveň jako markerové substráty pro stanovení *in vitro* enzymových aktivit byl studován v kombinaci s posouzením inhibičního efektu genisteinu. V experimentech byly použity lidské jaterní genotypizované mikrosomální frakce CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6.

Pro každou z testovaných CYP forem byly studie provedeny s mikrosomy získanými od individuálních dárců charakterizující rychlého, středně rychlého a pomalého metabolizátora. Genistein byl do reakční směsi přidáván v koncentracích 0, 10, 25, 50, 75 a 100 μM .

V případě vlivu genetického polymorfismu CYP3A5 na metabolismus midazolamu, respektive tvorbu 1'-hydroxymidazolamu, byly v experimentech použity alelické varianty CYP3A5*1/*1, CYP3A5*1/*3 a CYP3A5*3/*3 (fenotypy EM, IM a PM).

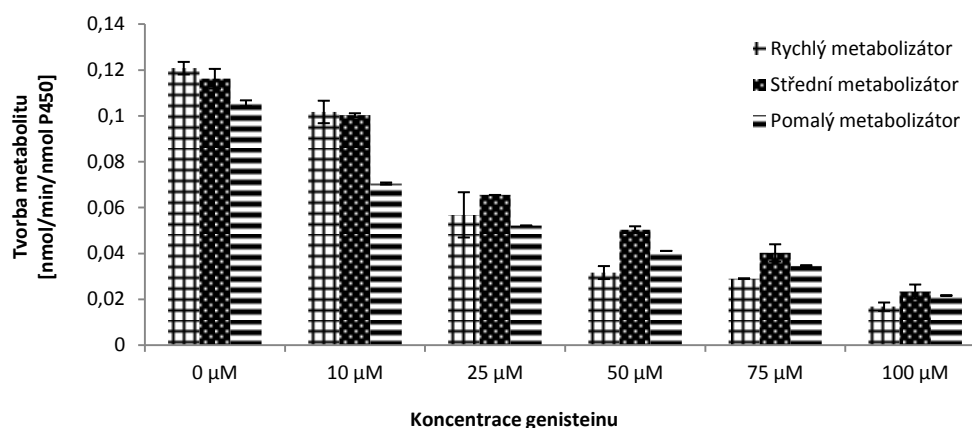
Na základě získaných dat lze usoudit, že výraznější efekt polymorfismu se u CYP3A5 projevuje především v nízkých koncentracích testované látky, tj. 10 μM a to u všech tří typů fenotypů, EM, IM i PM (Obr. 44).



Obrázek 44. Vliv genetického polymorfismu CYP3A5 na metabolismus midazolamu v přítomnosti genisteinu u fenotypu rychlého, středního a pomalého metabolizátora

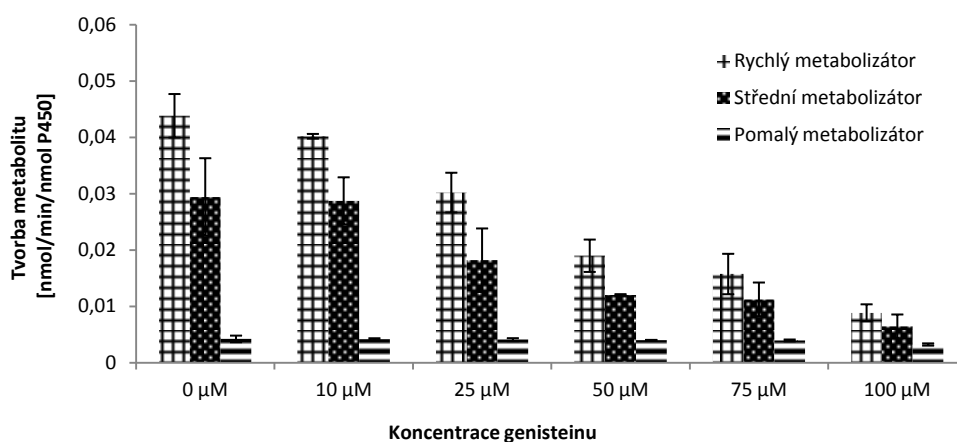
5. VÝSLEDKY

Výrazný vliv polymorfismu CYP2C9 (CYP2C9*1/*1, CYP2C9*1/*2 a CYP2C9*?/*?; fenotypy EM, IM a PM) na tvorbu 4'-hydroxydiklofenaku v přítomnosti genisteinu byl pozorován u pomalého metabolizátora, a to především v oblasti nižších testovaných koncentrací genisteinu, kdy při 10 μM koncentraci genisteinu byl zaznamenán pokles o 44 % (Obr. 45).



Obrázek 45. Vliv genetického polymorfismu CYP2C9 na metabolismus diklofenaku v přítomnosti genisteinu u fenotypu rychlého, středního a pomalého metabolizátora

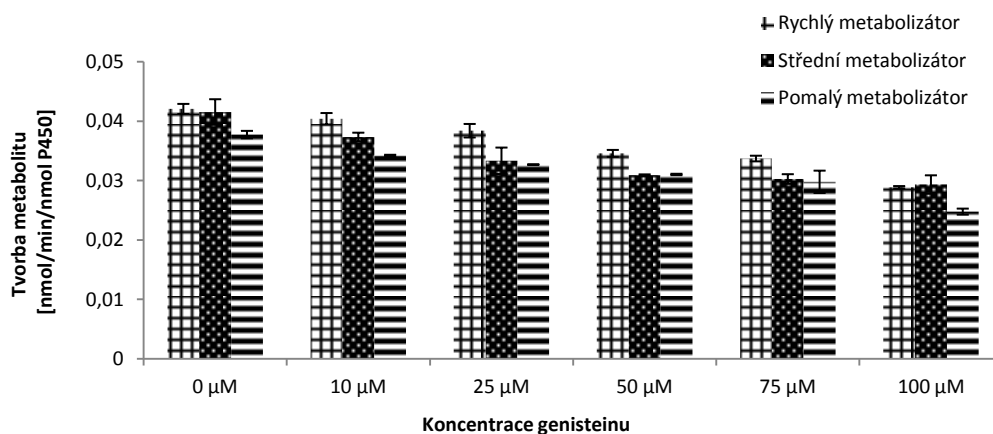
Ovlivnění metabolismu *S*-mefenytoinu, v souvislosti s různým genetickým polymorfismem CYP2C19, bylo zkoumáno s alelickými variantami CYP2C19*1/*1, CYP2C19*1/*2 a CYP2C19*2/*2 (fenotypy EM, IM a PM). Velmi výrazný efekt polymorfismu CYP2C19 byl sledován v případě fenotypu pomalého metabolizátora; u ostatních fenotypů došlo k očekávanému snížení aktivity v důsledku inhibice (Obr. 46).



Obrázek 46. Vliv genetického polymorfismu CYP2C19 na metabolismus *S*-mefenytoinu v přítomnosti genisteinu u fenotypu rychlého, středního a pomalého metabolizátora

5. VÝSLEDKY

Vliv genetického polymorfismu CYP2D6, s využitím specifické reakce tj. 1'-hydroxylace bufuralolu, byl sledován genotypů CYP2D6*2x2/*41, CYP2D6*4/*41 a CYP2D6*4/*4. Na základě provedených studií byly zjištěny jen mírné rozdíly projevující se mezi genotypy CYP2D6 (Obr. 47).



Obrázek 47. Vliv genetického polymorfismu CYP2D6 na metabolismus bufuralolu v přítomnosti genisteinu u fenotypu rychlého, středního a pomalého metabolizátora

6. DISKUZE

Cílem disertační práce bylo studium interakcí látek flavonoidní struktury s cytochromy P450. Proto byl studován potenciální inhibiční vliv látek flavonoidní struktury na enzymovou aktivitu významných forem cytochromu P450 účastnících se na I. fázi biotransformace xenobiotik, dále byly provedeny pilotní pokusy k posouzení vlivu genetického polymorfismu CYP na metabolismus léčiv používaných jako markerové substráty pro stanovení *in vitro* enzymových aktivit CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6 za současného ovlivnění testovanou isoflavonoidní látkou - genisteinem, a na závěr pak pokus o zhodnocení možnosti vzniku nežádoucích lékových interakcí na úrovni metabolismu při podávání flavonoidů (antokyanidinů, antokyaninů, proantokyanidinu a isoflavonoidů) v kombinaci s léčivými přípravky.

Literárních zdrojů zaměřených na přehledné studium interakcí mezi cytochromy P450 a flavonoidními látkami, především antokyany, je poměrně málo, systematické studie této tematiky neexistují. Z pohledu inhibičního vlivu flavonoidních látek na enzymovou aktivitu cytochromů P450 byl dosud nejvíce studován CYP3A4.

Studiem ovlivnění katalytické aktivity CYP3A4 flavonoidními látkami se zabývali Dreiseitel a kol. (2008). Ve své práci autoři testovali možnou inhibici u šesti antokyanidinů (kyanidinu, delfinidinu, malvidinu, pelargonidinu, peonidinu a petunidinu) a deseti antokyanů (kyanidin-3,5-diglukosidu, kyanidin-3-galaktosidu, kyanidin-3-glukosidu, kyanidin-3-rutinosidu, delfinidin-3-glukosidu, malvidin-3,5-diglukosidu, malvidin-3-galaktosidu, malvidin-3-glukosidu, peonidin-3-glukosidu, pelargonidin-3,5-diglukosidu). Testované látky inhibovaly aktivitu CYP3A4 v závislosti na použité koncentraci v reakční směsi, která se pohybovala v rozmezí 2-800 μM . Nejvýraznější inhibice byla pozorována s antokyanidiny, kdy byly stanoveny hodnoty IC_{50} pro pelargonidin 12,2 μM , malvidin 14,0 μM , peonidin 16,1 μM , kyanidin 20,8 μM , petunidin 23,4 μM a delfinidin 46,5 μM . Na základě výsledků získaných z experimentů provedených v rámci předložené dizertační práce testované antokyanidiny interagovaly s CYP3A4 poněkud odlišně. Největší inhibiční efekt byl pozorován s delfinidinem s hodnotou inhibiční koncentrace IC_{50} 32 μM , na rozdíl od výsledků publikovaných Dreiseitelem a kol. (2008), kdy nejvýraznější inhibice antokyanidiny byla zaznamenána s pelargonidinem. Ostatní antokyanidiny ovlivňovaly v předkládané práci enzymovou aktivitu CYP3A4 v klesajícím pořadí petunidin (IC_{50} 32 μM), peonidin (IC_{50} 36 μM), pelargonidin (IC_{50} 55 μM), malvidin (IC_{50} 90 μM) a kyanidin (IC_{50} 129 μM) (Obr. 15).

6. DISKUZE

Významná inhibice CYP3A4, kdy došlo ke snížení aktivity pod 50% z původní enzymové aktivity, byla pozorována již při 40 μM koncentracích u tří testovaných antokyanidinů. Nejvyšší koncentrací antokyanidinů pak byla pozorována signifikantní inhibice v případě delfinidinu, který široce ovlivňoval enzymovou aktivitu CYP3A4 s poklesem až na 8 % z původní hodnoty. Petunidinem byla aktivita snížena při 100 μM koncentraci na 18 %, peonidin způsobil pokles na 22 % a pelargonidin na 28 % ve srovnání s kontrolními hodnotami. Na základě výše uvedených výsledků, lze usoudit na poměrně specifickou interakci testovaných antokyanidinů s CYP3A4.

Pozorované rozdíly mezi výsledky publikovanými Dreiseitelem a kol. (2008) a námi získanými výsledky se řádově příliš nelišili a lze je vysvětlit rozdílnými experimentálními podmínkami, kdy autoři ve svých inhibičních experimentech s antokyany použili ke stanovení enzymové aktivity screeningovou luminiscenční metodu.

V této práci jsme se dále zabývali ovlivněním aktivity CYP2C9 antokyanidiny. Antokyanidiny významně inhibovaly *in vitro* enzymovou aktivitu CYP2C9. Inhibice pelargonidinem měla za následek signifikantní snížení katalytické aktivity CYP2C9 na 22 % při 100 μM koncentraci pelargonidinu v reakční směsi. Peonidin inhiboval enzymovou aktivitu CYP2C9 přibližně na 28 %, petunidin způsobil pokles na 48 % vzhledem k původním 100 % enzymovým aktivitám v kontrolních vzorcích (Obr. 16). Ve všech případech se hodnota IC_{50} pohybovala výrazně pod 100 μM hranicí. Stanovené hodnoty inhibičních koncentrací IC_{50} byly 21 μM pro pelargonidin, 26 μM pro petunidin a peonidin inhiboval enzymovou aktivitu CYP2C9 s IC_{50} 61 μM .

Poměrně velký inhibiční efekt se projevil rovněž na snížení enzymové aktivity CYP1A2 delfinidinem, kdy byl zaznamenán pokles specifické aktivity na 30 % s hodnotou IC_{50} 59 μM (Obr. 17). Výsledky prezentované v předkládané práci nepoukazují na výrazný inhibiční vliv antokyanových aglykonů ve vztahu k aktivitám CYP2A6 a CYP2B6 (Obr. 18 a 19).

6. DISKUZE

Významné ovlivnění enzymové aktivity *in vitro* bylo pozorováno také s dalšími testovanými látkami, tedy antokyaniny (glykosidy). Signifikantní ovlivnění bylo opět zjištěno především u forem CYP3A4 a CYP2C9. K výrazné inhibici však docházelo pouze vyššími koncentracemi testovaných látek, konkrétně při 80 μM koncentraci a vyšší, tedy 100 μM .

Antokyaniny testované v předkládané disertační práci značně interagovaly s enzymovou aktivitou CYP3A4 v pěti případech, kdy byl zaznamenán pokles enzymové aktivity pod 60 % z původní hodnoty v kontrolních vzorcích (Obr. 20).

V přítomnosti 100 μM koncentrace došlo testovaným antokyaninem kyanidin-3-rhamnosidem (CYA-6) k nejvýraznějšímu poklesu enzymové aktivity CYP3A4, a to přibližně na 28 %. Hodnota inhibiční konstanty byla pro inhibici CYP3A4 kyanidin-3-rhamnosidem IC_{50} 53 μM . Významná inhibice byla dále pozorována s delfinidin-3-rutinosidem (IC_{50} 69 μM), delfinidin-3-sambubiosidem (IC_{50} 77 μM) delfinidin-3-rhamnosidem (IC_{50} 82 μM) a delfinidin-3,5-diglukosidem IC_{50} 88 μM).

Potenciální inhibiční efekt různých antokyaninů na enzymovou aktivitu CYP3A4 byl rovněž pozorován Dreiseitelem a kol. (2008). Nejvýraznější ovlivnění aktivity CYP3A4 bylo autory prokázáno delfinidin-3-glukosidem s hodnotou inhibiční konstanty IC_{50} 74,1 μM . Ostatní testované antokyaniny ovlivňovaly enzymovou aktivitu CYP3A4 v pořadí následovně, peonidin-3-glukosid s IC_{50} 79,2 μM , malvidin-3-glukosid (IC_{50} 80,0 μM), kyanidin-3-galaktosid (IC_{50} 80,2 μM), malvidin-3-galaktosid (IC_{50} 84,3 μM), kyanidin-3-rutinosid (IC_{50} 96,1 μM), kyanidin-3-galaktosid (IC_{50} 105,3 μM), kyanidin-3,5-diglukosid (IC_{50} 167,5 μM), malvidin-3,5-diglukosid (IC_{50} 225,6 μM) a pelargonidin-3,5-diglukosid (IC_{50} 249,0 μM).

Možnému ovlivnění *in vitro* enzymové aktivity CYP3A4 flavonoidními látkami se věnovali i Kimura a kol. (2010), kteří provedli inhibiční studie s 60 zástupci polyfenolů. Ze skupiny antokyaninů testovali ovlivnění markerové aktivity CYP3A4 kyanidin-3-glukosidem a kyanidin-3-galaktosidem, kdy byla v experimentech použita 100 μM koncentrace testovaných látek. Data získaná Kimurou a kol. (2010) ukazují na mírnou inhibici testovanými antokyaniny. Stanovená hodnota inhibice dosahovala v případě kyanidin-3-glukosidu snížení enzymové aktivity na 78 %, zatímco v rámci výsledků našich inhibičních studií byl zaznamenán výraznější pokles aktivity CYP3A4 (na 60 %) za stejných podmínek, tedy při 100 μM koncentraci kyanidin-3-glukosidu (CYA-1) s použitím testosteronu jako markerového substrátu.

6. DISKUZE

Ve srovnání s kyanidin-3-glukosidem interagovala druhá testovaná látka, kyanidin-3-galaktosid, s enzymovou aktivitou CYP3A4 za shodného snížení na 75 %.

Studiem potenciálních interakcí antokyaninů s CYP3A se zabývali i autoři Ngo a kol. (2009), kteří zkoumali vliv antokyaninových glykosidů obsažených v brusinkovém džusu na enzymatickou aktivitu CYP3A. Rozsah inhibice enzymatické aktivity antokyaniny, tedy kyanidin-3-glukosidem, kyanidin-3-arabinosidem, kyanidin-3-galaktosidem, peonidin-3-glukosidem, peonidin-3-galaktosidem a peonidin-3-arabinosidem, rostl se zvyšující se koncentrací testovaného brusinkového džusu, kdy pozorovaná inhibice enzymové aktivity při 0,5 % koncentraci vzorku klesla až na 34 %.

Testované brusinkové antokyaniny byly v našich experimentech představovány majoritně se vyskytujícími zástupci ve *Vaccinium macrocarpon*, tedy kyanidin-3-glukosidem (CYA-1), kyanidin-3-arabinosidem (CYA-5), kyanidin-3-galaktosidem (CYA-7) a peonidin-3-glukosidem (PEO-1). Na základě výsledků získaných v rámci našich experimentů s významnými zástupci brusinkových antokyaninů jsme pozorovali snížení enzymové aktivity CYP3A4 v rozmezí přibližně o 30 – 40 %. Nejvýraznější inhibice byla zaznamenána s kyanidin-3-arabinosidem (CYA-5), kdy byla při 100 μ M koncentraci aktivita snížena na 60 % původní hodnoty. Kyanidin-3-glukosidem pak byla *in vitro* enzymová aktivita CYP3A4 ovlivněna s poklesem na 65 %, kyanidin-3-galaktosidem (CYA-7) na 70 % a peonidin-3-glukosidem (PEO-1) na 73 %, vztaženo ke kontrolám.

Porovnáním dat v předkládaných inhbičních experimentech sledujících vliv antokyaninů na CYP3A4 s výsledky získanými v podobné studii zabývající se možným ovlivněním sledované formy CYP různými zástupci antokyaninů (antokyanových glykosidů) bylo zjištěno, že monoglykosidy antokyaninů inhibovaly enzymovou aktivitu CYP3A4 ve větším rozsahu, než tomu bylo v případě diglykosidů.

Studiem interakcí antokyaninů s další významnou formou cytochromu P450, CYP2C9, se zabývali Ushijima a kol. (2009a). Autoři ve svých experimentech použili brusinkový džus obsahující antokyaninové glykosidy kyanidinu a peonidinu. Konkrétně se jednalo o monoglykosidy kyanidinu a peonidinu s navázanou glukosou, galaktosou a arabinosou. Na základě získaných výsledků byla prokázána výrazná inhibice *in vitro* enzymové aktivity CYP2C9 užitím diklofenaku jako markerového substrátu pro danou formu CYP.

6. DISKUZE

Hodnota inhibiční koncentrace IC_{50} byla stanovena jako procentuelní podíl do reakční směsi přidané směsi antokyaninů a odpovídá hodnotě 1,44 %, s tím, že při 1 % koncentraci byla sledovaná inhibice snížena na 80 % vůči kontrolní hodnotě a 3 % koncentrací bylo pozorováno výrazně ovlivnění enzymové aktivity CYP2C9 s poklesem až na 25 % (Ushijima a kol., 2009a).

Získaná data se substrátem diklofenakem korespondují s výsledky získanými na základě inhibičních studií s brusinkovou šťávou a jiným substrátem pro CYP2C9, phenytoinem. V přítomnosti 0,3 % koncentrace byla enzymová aktivita inhibována na 60 %, zatímco výraznější inhibice se projevila při koncentraci 1 %, kdy enzymová aktivita CYP2C9 poklesla až na 40 % z původní kontrolní enzymové aktivity (Ushijima a kol. 2009b).

Z výsledků získaných v našich studiích bylo zjištěno, že také aktivita CYP2C9 byla, stejně jako v případě inhibičních studií s CYP3A4, nejvíce inhibována kyanidin-3-rhamnosidem (CYA-6). Sledovaná enzymová aktivita byla přítomností testovaného antokyaninu snížena přibližně na 43 % vůči kontrole, při 100 μ M koncentraci CYA-6 (Obr. 21). Pro tuto specifickou inhibici markerové aktivity CYP2C9 kyanidin-3-rhamnosidem byla stanovena hodnota IC_{50} 68 μ M.

V porovnání s výsledky dosud publikovaných prací zaměřených na ovlivnění enzymové aktivity CYP2C9 směsí brusinkových antokyaninů dosahovaly hodnoty inhibice CYP2C9 jednotlivými antokyaniny získané na základě provedených inhibičních experimentů v předkládané práci nižších úrovní maximálního poklesu enzymové aktivity CYP2C9, přibližně 20 %, tedy snížení enzymové aktivity na 80 %.

V této práci dosahovaly pozorované inhibice enzymové aktivity CYP2C9 80 % pro kyanidin-3-arabinosid (CYA-5) a kyanidin-3-galaktosid (CYA-7), a dále pokles na 90 % pro inhibici kyanidin-3-glukosidem (CYA-1) a peonidin-3-glukosidem (PEO-1). Za stejných koncentrací, tj. 100 μ M, byly získány hodnoty inhibičního vlivu kyanidin-3-glukosidu a kyanidin-3-galaktosidu na enzymovou aktivitu CYP2C9 také Kimurou a kol. (2010). Jejich publikované výsledky ukazují na velmi mírnou inhibici v případě obou testovaných látek, kdy se pokles enzymové aktivity pohyboval pouze v rozmezí 5 – 8 %.

Významný inhibiční efekt testovanými antokyaniny byl zaznamenán také u CYP2B6 s kyanidin-3-rutinosidem (CYA-2), který způsobil při nejvyšší koncentraci testované látky (100 μ M) pokles na 50 % s IC_{50} 77 μ M (Obr. 22).

6. DISKUZE

Ve srovnání s enzymovými aktivitami CYP3A4, CYP2C9 a CYP2B6 interagovaly testované antokyaniny v našich inhibičních experimentech s CYP2A6 pouze mírně. V tomto případě byla sledovaná inhibice patrná pouze při vyšších koncentracích testovaných látek a pozorovaná aktivita navíc neklesla pod 70 % původních kontrolních hodnot (Obr. 23).

Na základě provedených inhibičních studií s látkami typu antokyaninů lze usoudit, že ve srovnání s antokyanidiny (aglykony) je pozorovaný inhibiční vliv antokyanových glykosidů na markerovou aktivitu cytochromů P450 značně mírnější, neboť nebyl pozorován výraznější pokles enzymové aktivity než pod 20 %, a to u žádné z testovaných forem cytochromu P450.

Rovněž stanovené hodnoty inhibičních koncentrace IC_{50} se v experimentech s antokyanovými aglykony (tj. antokyanidiny) pohybovaly u látek se signifikantním inhibičním potenciálem kolem 20 – 30 μM . Toto tvrzení se shoduje s publikovanými výsledky pro CYP3A4, kdy v případě inhibice aktivity CYP3A4 antokyanidiny byla stanovena průměrná hodnota IC_{50} 22,2 μM (Dreiseitel a kol., 2008).

Z uvedeného vyplývá, že inhibiční účinek antokyanidinů, a stejně tak jejich glykosidů - antokyaninů, na aktivitu sledovaných biotransformačních enzymů je značně závislý na koncentraci a také druhu antokyanu. Vzhledem k nízké biologické dostupnosti těchto látek, a flavonoidů obecně, jsou po podání zjišťovány v organismu nízké koncentrace, a tudíž nemusí být dosaženo hodnot sledovaných *in vitro*.

Antokyanidiny v experimentech publikovaných v této práci ovlivňovaly aktivity enzymů (CYP3A4, CYP2C9) intenzivněji než jejich glykosidy. Tato skutečnost je vysvětlitelná tím, že glykosidy, tj. konjugáty se sacharidovým zbytkem, jsou více polární a mají tedy nižší afinitu k cytochromu P450.

V další fázi experimentů zkoumajících vliv flavonoidních látek na enzymovou aktivitu CYP3A4, CYP2C9 a CYP1A2 *in vitro* byl v inhibičních studiích, jako možný inhibitor CYP, sledován zástupce ze skupiny proantokyanidinů - prokyanidin A2. V případě enzymové aktivity CYP1A2 byla v námi provedených inhibičních studiích pozorována velmi slabá inhibice prokyanidinem A2 (asi 5 %). Výraznější inhibiční vliv byl prokázán s dalšími testovanými formami CYP. Ačkoli však míra inhibice markerové aktivity u enzymů CYP3A4 a CYP2C9 rostla se zvyšující se koncentrací prokyanidinu A2, sledovaná inhibice enzymové aktivity příslušných enzymů neklesla pod 75 % ve srovnání s kontrolními vzorky (Obr. 24).

6. DISKUZE

Kimura a kol. (2010), kteří sledovali inhibiční vliv prokyanidinu A2 na aktivitu CYP3A4 a CYP2C9 naopak uvádějí, že na základě jimi získaných výsledků prokyanidin A2 výrazně inhiboval enzymovou aktivitu CYP3A4 s pozorovaným snížením až na 23 % ze srovnávací 100 % aktivity (IC_{50} 30,4 μ M) při 100 μ M koncentraci testované látky. U enzymové aktivity CYP2C9 byla autory pozorována mírnější inhibice, asi 50 % s IC_{50} 44,1 μ M. Rozdíl mezi výsledky Kimury a kol. (2010) a námi získanými daty lze vysvětlit jinými experimentálními podmínkami.

Na základě inhibičních experimentů s isoflavonoidy provedených v dalších krocích naší studie bylo zjištěno, že v přítomnosti testovaných látek jsou signifikantně ovlivněny aktivity forem CYP3A4 a CYP2C9. Slabší inhibiční vliv isoflavonoidů se projevil u CYP2E1, CYP1A2, CYP2D6 a CYP2B6. V případě CYP2A6 nebyla zaznamenána žádná změna v enzymové aktivitě způsobená vlivem testovaných látek.

Výsledky studií zaměřených na vznik interakcí isoflavonoidních látek s CYP2C9 ukázaly, že nejvýraznější inhibiční efekt isoflavonoidů se projevil u dvou významných zástupců skupiny – genisteinu a daidzeinu. Již při 50 μ M koncentraci genisteinu v reakční směsi byla enzymová aktivita CYP2C9 snížena na 45 %. V přítomnosti nejvyšší testované koncentrace (100 μ M) byl pozorován pokles až na 18 % ze 100 % srovnávací hodnoty. Inhibice daidzeinem byla mírnější, avšak enzymová aktivita CYP2C9 byla i v tomto případě významně snížena (na 36 %) (Obr. 25).

Sledovaný rozsah inhibice svědčí o relativně specifické interakci genisteinu a daidzeinu s CYP2C9. Dle průběhu Dixonových i Lineweaverových-Burkových výnosů oba testované isoflavonoidy inhibovaly aktivitu CYP2C9 plně nekompetitivním mechanismem s příslušnými hodnotami inhibičních konstant K_i 36 μ M pro genistein a 61 μ M v případě daidzeinu (Obr. 34-37).

Stanovená míra inhibičního ovlivnění CYP2C9 genisteinem a daidzeinem koresponduje s výsledky práce Kimury a kol. (2010), kteří rovněž pozorovali inhibici enzymové aktivity CYP2C9 těmito látkami při stejných koncentracích testovaných isoflavonoidů, tj. 100 μ M. Genisteinem došlo ke snížení aktivity na 25 %. U inhibičního účinku daidzeinu na sledovanou aktivitu CYP2C9 byl zaznamenán pokles na 55 %.

6. DISKUZE

Signifikantní inhibice CYP3A4 byla v rámci studií předkládané práce sledována se třemi zástupci isoflavonoidů (Obr. 26-27). Equolem byla enzymová aktivita CYP3A4 snížena přibližně na 25 % s K_i 38 μM . Z průběhu Dixonova a Lineweaverova-Burkova výnosu vyplývá, že se testovaná látka chovala vůči CYP3A4 jako plně nekompetitivní inhibitor (Obr. 38-39).

Také s genisteinem bylo pozorováno výrazné snížení aktivity (na 35 %) (Obr. 26). Na základě Dixonova i Lineweaverova-Burkova výnosu interagoval genistein s CYP3A4 plně nekompetitivním mechanismem s inhibiční konstantou K_i 23 μM (Obr. 40-41).

Značný inhibiční vliv vůči aktivitě CYP3A4 byl zaznamenán i s biochaninem A, kdy došlo k poklesu na 40 % (K_i 58 μM) (Obr. 26). Rovněž pro inhibici CYP3A4 biochaninem A vyplývá z průběhu Dixonova i Lineweaverova-Burkova výnosu, že se sledovaný inhibitor vůči CYP3A4 chová jako plně nekompetitivní inhibitor (Obr. 42-43).

Inhibice enzymové aktivity CYP3A4 genisteinem byla sledována i Kimurou a kol. (2010), kteří uvádějí, že testovaná látka je silným inhibitorem dané formy CYP s pozorovaným snížením aktivity až na 12 % při 100 μM koncentraci genisteinu. Ve své práci autoři poukazují také na značný inhibiční vliv daidzeinu vůči CYP3A4 s poklesem na 40 % sledovaný rovněž u 100 μM koncentrace testované látky.

Tsujimoto a kol. (2009) uvádějí, že daidzein a genistein inhibují enzymovou aktivitu CYP3A4. V přítomnosti 100 μM koncentrace genisteinu a daidzeinu pozorovali pokles aktivity na 65 %, respektive na 63 %. Získaná data do jisté míry potvrzují námi získané výsledky, kdy v přítomnosti 100 μM koncentrace daidzeinu došlo ke snížení enzymové aktivity CYP3A4 přibližně na 60 %.

Také výsledky inhibičních studií publikované Evansem (2000) a Fosterem a kol. (2003) potvrzují inhibici enzymové aktivity CYP3A4 sójovými isoflavonoidy daidzeinem a genisteinem.

Z výsledků získaných v námi provedených experimentech vyplývá, že i enzymová aktivita CYP2E1 je isoflavonoidy inhibována s rostoucí koncentrací testovaných látek (Obr. 28). Nejvýrazněji byla enzymová aktivita CYP2E1 ovlivněna genisteinem (pokles na 45 %) a equolem (na 60 %), což je v souladu s tvrzeními uváděnými Helsbym a kol. (1998).

6. DISKUZE

Helsby a kol. (1998) ve své práci dále uvádějí, že s genisteinem a equolem pozorovali inhibici rovněž u formy CYP1A2. Ke stejnému závěru jsme dospěli i na základě dat získaných v rámci provedených inhibičních studií, kdy jsme navíc pozorovali významné ovlivnění enzymové aktivity CYP1A2 dalšími isoflavonoidy - biochaninem A, puerarinem a formononetinem (Obr. 29). Stanovené hodnoty inhibice aktivity dosahovaly přítomností 100 μM koncentrace genisteinu a biochaninu A přibližně na 60 %, s puerarinem, formononetinem a equolem byl zaznamenán pokles na 70 %. Shimada a kol. (2010) popisují také inhibici genisteinem, navíc i daidzeinem a genistinem, ovšem s mírnějším snížením enzymové aktivity CYP1A2 - v rozsahu 10 – 20 %, avšak při 5 μM koncentracích testovaných látek. Na základě výsledků získaných v našich experimentech jsme u uvedených isoflavonoidů, za odpovídajících koncentrací sledovaných látek, pozorovali ještě slabší inhibiční efekt, a to snížení aktivity CYP1A2 přibližně o 5 – 10 %.

Genistein se jako významný inhibitor enzymové aktivity *in vitro* projevil také u forem CYP2C19, CYP2D6 a CYP2B6. Sledované ovlivnění CYP2C19 dosahovalo poklesu aktivity na 40 % (Obr. 30), v případě CYP2D6 na 60 % (Obr. 31) a u formy CYP2B6 byla inhibice ještě mírnější, se snížením na 75 % (Obr. 32), vždy u 100 μM koncentrace testované látky.

V inhibičních studiích provedených v rámci předkládané práce jsme se sledovanými flavonoidními látkami pozorovali signifikantní inhibici enzymové aktivity při koncentracích testovaných látek 40 μM , resp. 50 μM a vyšších. Z uvedeného tedy plyne, že k dosažení výrazného inhibičního vlivu na enzymovou aktivitu dané formy CYP, který byl u některých testovaných látek pozorován, by se rovnovážné plazmatické hladiny daného flavonoidu v organismu musely pohybovat řádově alespoň v obdobném rozsahu koncentrací, jako při kterých byla popsána inhibice v experimentech provedených *in vitro*. Znalost rozsahu koncentrací flavonoidních látek v krvi a tělesných tkáních je tedy velmi důležitým faktorem při interpretaci výsledků experimentů získaných jak v podmínkách *in vitro*, tak i *in vivo* při pokusech se zvířecími modely. Potenciální riziko vzniku nežádoucích interakcí vyplývajících ze současného podávání nutraceutik s obsahem flavonoidních látek spolu se substráty enzymů, které byly výrazně inhibovány, především CYP3A4 a CYP2C9, nelze však v praxi zcela vyloučit. Vzhledem ke skutečnosti, že flavonoidní látky podléhají v organismu velice rozsáhlým a různorodým přeměnám je třeba další studie věnovat také detailnějšímu studiu možných účinků jejich metabolitů.

6. DISKUZE

Dalším tématem experimentální práce byly pilotní pokusy prováděné s cílem zjistit, zda efekt flavonoidu, u kterého bylo v předchozí části zjištěno, že interaguje s cytochromy P450, bude modulován (např. zesílen) v mikrosomech, získaných z jater pomalých, rychlých nebo intermediárních metabolizátorů. K tomu byl vybrán genistein, jeden z nejběžnějších isoflavonoidů, např. ze soji. U genisteinu byla zjištěna interakce s CYP3A4, CYP2C9, CYP2D6, CYP2C19, CYP2E1 a CYP1A2. Ke studiu vlivu farmakogenomiky na interakce genisteinu s léčivými jsme vybrali mikrosomální frakce obsahující čtyři farmakogeneticky charakterizované formy CYP, a to CYP2C9, CYP2D6, CYP2C19 a CYP3A5. Poslední byla vybrána pro definovanou a známou strukturní i funkční podobnost s CYP3A4, u které ale farmakogenetické souvislosti nejsou stále ještě vysvětleny a nalezeny (Guengerich, 2005). Forma CYP2C19 byla zvolena proto, že přísluší do početné a důležité rodiny CYP2C a její genetický polymorfismus ovlivňuje metabolismus moderních antitrombotik thienopyridinové struktury jako je např. clopidogrel.

Cílem bylo zjistit, zda by konzumace potravy nebo nutraceutik (doplňků stravy) obsahující vysoké dávky flavonoidů mohla u geneticky predisponovaných jedinců ovlivnit i metabolismus léčiv. Byl tedy zkoumán inhibiční efekt genisteinu, společně s vlivem genetického polymorfismu cytochromů P450 na metabolismus současně podávaných léčiv, které jsou charakteristickými substráty zmíněných biotransformačních enzymů.

Na základě dat získaných v rámci farmakogenomických studií jsme pozorovali výrazný vliv genetického polymorfismu CYP2C19 na metabolismus antikonvulziva *S*-mefenytinu, konkrétně u alelické varianty CYP2C19*2/*2, odpovídající pomalému metabolizátorovi. U této alely je popsáno významné snížení aktivity, zbytek schopnosti vzorku metabolizovat markerový substrát se projevil nízkou aktivitou (přibližně 8 % zbytkové aktivity), která dále klesla až na necelých 5 % u nejvyšší hladiny genisteinu. Se zvyšující koncentrací genisteinu v reakční směsi byl navíc pozorován u všech genotypů pokles v tvorbě metabolitu, 4'-hydroxymefenytinu, až na 35 % při 100 μM koncentraci genisteinu (Obr. 46).

6. DISKUZE

Xie a kol. (1999) uvádějí, že snížení metabolismu *S*-mefenytinu, respektive 4'-hydroxylace *S*-mefenytinu, patří mezi nejlépe prostudované genetické polymorfismy ovlivňující metabolismus léčiv u člověka. Nicméně účast CYP2C19 byla popsána také v metabolismu omeprazolu, diazepamu či propranololu a minoritní metabolickou drahou dochází za účasti CYP2C19 rovněž k biotransformaci některých antidepresiv.

Genotyp CYP2C19 vykazuje u pomalých metabolizátorů značné interindividuální rozdíly, kdy u bělochů, tzv. kavkazské populaci, se defektní hydroxylace mefenytinu projevuje asi u 2 - 5 % populace. Pro srovnání, například u Asiatů je incidence pomalých metabolizátorů mnohem vyšší, asi 15 - 25 % (Ibeanu a kol., 1998).

V genu pro CYP2C19 bylo identifikováno šest mutantních alel, z nichž nejčastěji se vyskytujícími jsou defektní alely CYP2C19*2 a CYP2C19*3 (deMorais a kol., 1994a; de Morais a kol., 1994b). U jedinců se sníženou aktivitou CYP2C19 jsou pozorovány vyšší plazmatické koncentrace léčiva s nedostatečnou terapeutickou odpovědí (Kita a kol., 2001; Rosemary a Adithan, 2007).

Kromě vlivu na farmakokinetiku léčiv, která jsou metabolizována prostřednictvím CYP2C19, mohou mít změny v genotypu u pomalých metabolizátorů CYP2C19 za následek řadu nežádoucích účinků, jako např. u pacientů léčených clopidogrelem mohou být pozorovány výrazně nižší hladiny aktivního metabolitu, což může vést k vyššímu výskytu kardiovaskulárních příhod (Simon a kol., 2009).

V další fázi experimentů zaměřených na vliv genetického polymorfismu CYP na metabolismus léčiv byl ve studiích zkoumán vliv genotypu CYP2C9. Gen pro tento cytochrom P450 existuje v několika funkčně odlišných variantách.

V bělošské populaci jsou významně zastoupeny alelické varianty CYP2C9*2 a CYP2C9*2*3. Varianty CYP2C9*2 a CYP2C9*3 se liší od standardního typu proteinu CYP2C9*1 v bodové mutaci. Nemutovaná forma CYP2C9*1 je spojovaná s normální enzymatickou aktivitou, zatímco mutovaná varianta CYP2C9*2 má sníženou aktivitu a varianta CYP2C9*3 vykazuje ještě nižší metabolickou aktivitu (Rettie a kol., 1994; Haining a kol., 1996).

6. DISKUZE

Mezi léčiva, která jsou biotransformována prostřednictvím CYP2C9, patří nesteroidní antiflogistika, *S*-warfarin, phenytoin, losartan a tolbutamid. Velký význam mají změny v genetickém polymorfismu CYP2C9 u pomalých metabolizátorů této formy enzymu, zejména pak při léčbě CYP2C9 substráty s úzkým terapeutickým oknem, jako je například *S*-warfarin (Pirkmohamed a Park, 2003).

V rámci předkládané práce byl zkoumán vliv genetického polymorfismu CYP2C9 na metabolismus diklofenaku, jako typického markerového substrátu pro daný enzym. Na základě získaných dat bylo ovlivnění metabolismu diklofenaku způsobené genetickým polymorfismem sledováno u genotypu pomalého metabolizátora. Výrazný efekt jsme zaznamenali především při nižších koncentracích genisteinu (10 μ M), kdy byl zjištěn pokles o 44 % (Obr. 45). Se zvyšující se koncentrací již nebyl pozorován výrazný vliv testované látky na utváření 4'-hydroxydiklofenaku, což je vzhledem k omezené biodostupnosti isoflavonoidů podstatným faktorem, neboť vyšších plazmatických koncentrací nebývá pravděpodobně po příjmu těchto látek v organismu dosaženo.

Další studie věnované vlivu genetického polymorfismu cytochromů P450, jejichž výsledky jsou prezentovány v rámci předkládané práce, byly provedeny pro CYP2D6. Vzhledem ke skutečnosti, že CYP2D6 jako jediný zástupce enzymů metabolizující léčiva není inducibilní, je interindividuální variabilita v enzymové aktivitě CYP2D6 vysvětlována právě genetickým polymorfismem. Polymorfismus CYP2D6 má velký význam v biotransformaci mnoha klinicky důležitých léčiv, jako jsou tricyklická antidepresiva, β -blokátory, neuroleptika, antiarytmika, analgetika, jakož i chemoterapeutika. Obecně se uvádí, že CYP2D6 je odpovědný za metabolizaci 25 % léčiv, kdy genetický polymorfismus tohoto enzymu významně ovlivňuje metabolismus asi 50 % z těchto léčivých přípravků (Eichelbaum a kol., 2003; Zanger a kol., 2004; Ingelman-Sundberg, 2005).

V genu CYP2D6 bylo identifikováno 63 různých alelických variant, jejichž důsledkem je stav od úplné deficience aktivity, přes snížení až po zvýšení enzymatické aktivity tohoto enzymu. Na tomto základě polymorfismus CYP2D6 podmiňuje rozdělení populace na pomalé metabolizátory (s defektními alelami), rychlé metabolizátory (se standardní „wild type“ alelou) a ultrarychlé metabolizátory s amplifikovanými geny pro funkční enzym CYP2D6 (Ingelman-Sundberg a kol., 2007).

6. DISKUZE

Za standardní alely jsou považovány CYP2D6*1 a CYP2D6*2. Nejdůležitějšími defektními alelami vedoucími k tvorbě inaktivního enzymu jsou CYP2D6*3, CYP2D6*4 a CYP2D6*5, zatímco CYP2D6*10, CYP2D6*17 a CYP2D6*41 představují nejčastěji se vyskytující geny vedoucí k tvorbě enzymu se sníženou aktivitou (Bogni a kol., 2005). Variabilita ve výskytu alelických variant CYP2D6 mezi populacemi podléhá výrazným mezigetnickým rozdílům.

Dle Ingelmana-Sunberga (2005) je v evropských zemích typický výskyt mutantních alel charakterizujících pomalé metabolizátory, především pak alelické kategorie CYP2D6*4. Vysoký výskyt alelických variant tohoto enzymu vykazujících středně rychlý metabolismus je popisován u africké populace. Frekvence výskytu duplikovaných a multiduplikovaných genů CYP2D6 vedoucí k ultrarychlému metabolismu je nejvyšší v Etiopii a Saudské Arábii (Aklillu a kol., 1994; McLellan, 1997).

V souvislosti s vlivem genetického polymorfismu CYP2D6 na biotransformaci léčiv za současného efektu isoflavonoidní látky - genisteinu, byly v rámci našich studií experimenty provedeny s modelovým substrátem pro CYP2D6, bufuralolem. Data byla získána pro alelické kategorie CYP*2x2/*41, CYP*4/*41 a CYP*4/*4.

Námi dosažené výsledky ukazují, že rozdíly mezi uvedenými genotypy CYP2D6, za specifické 1'-hydroxylace bufuralolu, se projevují jen mírně, poklesem o přibližně 10 % u pomalého metabolizátora. Především při vyšších testovaných koncentracích genisteinu jsme pozorovali velmi nízké rozdíly mezi jednotlivými alelickými variantami (Obr. 47). Z uvedeného lze usoudit, že inhibice enzymové aktivity CYP2D6 genisteinem je jen nevýznamně ovlivněna genetickým polymorfismem.

Vliv genotypu byl v rámci námi provedených experimentů studován také u CYP3A5 se specifickým substrátem – midazolamem, léčivem náležícím do skupiny benzodiazepinů. O CYP3A5 je známo, že je vysoce polymorfním enzymem.

Frekvence výskytu jednotlivých alelických variant CYP3A5 vykazuje značnou mezigetnickou a také interindividuální variabilitu. Kuehl a kol. (2001) uvádí výskyt CYP3A5 u jedné třetiny bělochů, četnost v africké populaci je 50 %. V genu pro CYP3A5 byly identifikovány tři mutantní alely – CYP3A5*3, CYP3A5*, CYP3A5*7. CYP3A5*3 patří mezi nejčastěji se vyskytující defektní alelickou variantu, která je spojena se snížením aktivity tohoto enzymu.

6. DISKUZE

Četnost výskytu CYP3A5*3 je 90 % u bělochů, 75 % u Asiatů a 20 % frekvence výskytu je popisována v africké populaci (Quaranata a kol., 2006; Roy a kol., 2005). Naproti tomu alely CYP3A5*6 a CYP3A5*7 se vyskytují u Afričanů a v populacích bělochů a Asiatů nejsou detekovány. Lee a kol. (2003) uvádí, že frekvence výskytu defektních alel v africké populaci je u varianty CYP3A5*6 17 %, u CYP3A5*7 pak 8 %. Rovněž nejčastější výskyt alel pro gen CYP3A5*1 je popisován u Afričanů.

Bylo publikováno několik studií zabývajících se vlivem genetického polymorfismu CYP3A5 na metabolismus midazolamu, a to především u alelické varianty CYP3A5*3. Wendel a kol. (1994) na základě provedených *in vitro* experimentů uvádějí, že pozorovali výraznější zapojení CYP3A5 v metabolizaci midazolamu na 1'-hydroxymidazolam, než v případě formy CYP3A4. Kuehl a kol. (2001) se zabývali studiem biotransformace midazolamu CYP3A5 u různých alelických variant a dospěli k závěru, že hydroxylace midazolamu v játrech dosahuje dvojnásobně vyšších hodnot v případě genotypu CYP3A5*1/*3, v porovnání s alelickou variantou CYP3A5*3/*3. Na druhou stranu výsledky publikované některými autory odkazují na skutečnost, že vliv genotypu CYP3A5 na metabolismus midazolamu není ovlivněn počtem alel v genu CYP3A5*3 (Shih a Huang, 2002; Yu a kol., 2004), což svědčí o nekonzistentním vlivu genetického polymorfismu CYP3A5 v biotransformaci midazolamu.

V rámci experimentů prezentovaných v této práci jsme efekt genetického polymorfismu CYP3A5 na metabolismus midazolamu pozorovali především v oblasti nízkých koncentrací genisteinu u alelické varianty CYP3A5*3/*3 (Obr. 44). Vzhledem k široké substrátové specifitě CYP3A5 je třeba zvážit relativní příspěvek této formy na metabolismu midazolamu. Značná substrátová specifita CYP3A5, překrývající se s CYP3A4, může vést k metabolické clearance CYP3A substrátů u lidí nesoucí alelickou variantou CYP3A5*1 (Floyd a kol., 2003).

Skutečnost, že se vliv genotypu CYP projevuje u forem CYP2C9 a CYP3A4 relativně nejvíce u nižších koncentrací flavonoidu lze považovat za závažnou, protože tato situace pravděpodobně nejvíce odpovídá hladinám zjištěným v krevní plasmě u člověka (0-10 μM) (Spencer a Crozier, 2012).

7. ZÁVĚR

V rámci předkládané disertační práce byl sledován potenciální inhibiční vliv látek flavonoidní struktury (antokyanů, proantokyanidinu a isoflavonoidů) na významné biotransformační enzymy I. fáze metabolismu xenobiotik (CYP) s cílem zhodnotit možné riziko vzniku nežádoucích lékových interakcí testovaných látek se současně podávanými léčivými přípravky, z nichž některé byly použity jako substráty pro studované biotransformační enzymy. Ze získaných dat vyplývají následující závěry:

→ Flavonoidní látky lze do jisté míry označit jako inhibitory *in vitro* enzymové aktivity cytochromů P450. Interakce těchto látek s cytochromy P450 se dá charakterizovat jako méně specifická.

→ Antokyanidiny mají relativně významný inhibiční efekt na aktivity CYP3A4 a CYP2C9. Nejvýraznější inhibice CYP3A4 byla pozorována s delphinidinem (IC_{50} 31 μ M). V případě ovlivnění enzymové aktivity CYP2C9 se značná inhibice prokázala u petunidinu (IC_{50} 21 μ M).

→ Antokyaniny významně interagují s enzymovou aktivitou CYP3A4 a CYP2C9, s nejvýraznějším efektem kyanidin-3-rhamnosidu na *in vitro* enzymové aktivity CYP3A4 (IC_{50} 53 μ M) a CYP2C9 (IC_{50} 68 μ M). Jejich interakce s těmito enzymy je však méně silná než u aglykonů (antokyanidinů), pravděpodobně v důsledku vyšší polaritativy sacharidového zbytku.

→ Isoflavonoidy vykazují inhibici především vůči CYP2C9 a CYP3A4. Genistein lze charakterizovat jako látku s potenciálem k inhibici CYP2C9, CYP3A4, CYP2E1, CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6. Inhibiční účinek genisteinu se projevil nejvýrazněji na aktivitách CYP3A4 a CYP2C9 s K_i 23 μ M a 36 μ M. Ostatní látky se projevily jako méně specifické inhibitory (equol, biochanin A, daidzein).

Isoflavonoidy inhibovaly enzymové aktivity CYP3A4 i CYP2C9 nekompetitivním mechanismem.

7. ZÁVĚR

→ Na základě výsledků s geneticky charakterizovanými mikrosomy bylo zjištěno, že nejvýraznější ovlivnění biotransformace *S*-mefenytoinu v závislosti na genotypu CYP2C19 se projevilo v případě pomalého metabolizátora, kdy navíc přítomností genisteinu došlo ke snížení ve formaci metabolitu o 35 %.

Genetický polymorfismus CYP2C9 ovlivňuje metabolismus diklofenaku u genotypu pomalého metabolizátora, kdy byl při 10 μ M koncentraci genisteinu zaznamenán pokles o 44 %.

Vliv genotypu CYP3A5 na metabolické přeměny midazolamu byl pozorován v oblasti nižších koncentrací genisteinu u všech testovaných alelických variant.

Rozdíly mezi genotypy CYP2D6 se na metabolismu bufuralolu projevují pouze mírně.

→ Inhibiční účinek flavonoidních látek na aktivitu sledovaných biotransformačních enzymů je značně závislý na koncentraci. Vzhledem k nízké biologické dostupnosti flavonoidů jsou po podání zjišťovány v organismu nízké koncentrace, a tudíž nemusí být dosaženo hodnot sledovaných *in vitro*. Potenciální riziko vzniku nežádoucích interakcí vyplývajících ze současného podávání nutraceutik spolu s výrazně inhibovanými substráty enzymů, je značně nízké, ovšem v praxi jej nelze zcela vyloučit.

8. LITERATURA

Aklillu E., Persson I., Bertilsson L., Johansson ., Rodrigues F., Ingelman Sundberg M. (1996). Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an Ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *J Pharmacol Exp Ther*; 278: 441–446.

Allred C.D., Ju Y.H., Allred K.F., Chang J., Helferich W.G. (2001). Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. *Carcinogenesis*; 22: 1667–1673.

Andersen, Q.M., Markham, K. R. (2006). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci*; 58: 737-747.

Anzenbacher P, Zanger UM. (Editors) (2012). *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. 1st edn. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

Arai Y., Uehara M., Sato Y., Kimira M., Eboshida A., Adlercreutz H., Watanabe S. (2000). Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake. *Journal of Epidemiology*, 10, pp. 127-135.

Arts I.C.W., Hollman P.C.H. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*; 81: 317–325.

Barentsen R. (2004). Red clover isoflavones and menopausal health. *J Br Menopause Soc*; 10 Suppl 1:4-7.

Barnes S., Sfakianos J., Coward L., Kirk M. (1996). Soy isoflavonoids and cancer prevention. Underlying biochemical and pharmacological issues. *Adv Exp Med Biol*; 401: 87-100.

8. LITERATURA

Beecher G.A. (2003). Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurance and Intake. *J Nutr*; 133: 3248-3254.

Benedetti M.S., Bani M (1998). Design of in vitro studies to predict in vivo inhibitory drug-drug interactions. *Pharmacological Research*; 38(2): 81-88.

Bertz R.J., Granneman G.R. (1997) Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet*; 32: 210-258.

Bogni A., Monshouwer M., Moscone A., Hidestrand M., Ingelman-Sundberg M., Hartung T. (2005). Substrate specific metabolism by polymorphic cytochrome P450 2D6 alleles. *Toxicol In Vitro*; 19: 621–629.

Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*; 56: 317-33

Cao G., Muccitelli H.U., Sánchez-Moreno C., Prior R.L. (2001). Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am J Clin Nutr*; 73(5): 920-926.

Cassidy A. (2003). Potential risks and benefits of phytoestrogen-rich diets. *Int J Vitam Nutr Res*; 73(2): 120-126.

Cassidy A., Brown J.E., Hawdon A., Faughnan M.S., King L.J., Millward J., Zimmer-Nechemias L., Wolfe B., Setchell K.D. (2006). Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *J Nutr*; 136(1): 45-51.

Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernández M., Páez-Hernández M.E., Rodríguez J.A., Galán-Vidal C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*; 113: 859–871.

8. LITERATURA

Cederbaum A.I. (2006). CYP2E1—biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury. *Mt Sinai J Med*; 73: 657–672.

Clair R.S., Anthony M. (2005). Soy, isoflavones and atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol*; (170): 301-323.

Clarkson T.B. (2002). Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Nutr*; 132(3): 566-569.

Cooke D., Steward W.P., Gescher A.J., Marczyklo T. (2005). Anthocyanins from fruits and vegetables—does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *Eur J Cancer*; 41(13):1931-1940.

Coppo E, Marchese A. (2014). Antibacterial activity of polyphenols. *Curr Pharm Biotechnol*; 15(4): 380-390.

Cos P., De Bruyne T., Hermans N., Apers S., Berghe D.V., Vlietinck A.J. (2004). Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Curr Med Chem*; 11(10): 1345-1359.

Crespi C.L., Chang T.K.H., Waxman D.J. (1998a). Determination of CYP2C9-catalyzed diclofenac 4'-hydroxylation by high-performance liquid chromatography. V: Phillips I.R., Shepard E.A., editors. *Cytochrome P450 protocols*. Totowa NJ: Humana: 129-133.

Crespi C.L., Chang T.K.H., Waxman D.J. (1998b). CYP2D6-dependent bufuralol 1'-hydroxylation assayed by reversed-phase ion-pair high performance liquid chromatography with fluorescence detection. V: Phillips I.R., Shepard E.A., editors. *Cytochrome P450 protocols*. Totowa, NJ: Humana: 141-146.

Demmig-Adams B., McCauley L. (2005). Breast cancer, estrogen, soy genistein, and other dietary factors: Towards an understanding of their mechanistic interactions. *J Nutr Food Science*; 35 (1): 35-42.

8. LITERATURA

De Morais S.M., Wilkinson G.R., Blaisdell J., Meyer U.A., Nakamura K., Goldstein J.A. (1994a). Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol Pharmacol*; 46: 594–598.

De Morais S.M., Wilkinson G.R., Blaisdell J., Nakamura K., Meyer U.A., Goldstein J.A. (1994b). The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem*; 269: 15419–15422.

De Pascual-Teresa S., Moreno D.A., García-Viguera C. (2010). Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *Int J Mol Sci*; 11: 1679–1703.

Dreiseitel A., Schreier P., Oehme A., Locher S., Hajak G., Sand P.G. (2008). Anthocyanins and their metabolites are weak inhibitors of cytochrome P450 3A4. *Mol Nutr Food Res*; 52(12): 1428-1433.

Durst R.W., Wrolstad R.E. (2001). Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. *Curr Protocols Food Anal Chem*.

Eichelbaum M., Ingelman-Sundberg, M., Evans, W. E. (2006). Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med*; 57: 119–137.

Evans W.E., Relling M.V. (1999) Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*; 286: 487-491.

Ferreira D., Slade D. (2002). Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. *Nat Prod Rep*; 19(5): 517-541.

Floyd M.D., Gervasini G., Masica A.L., Mayo G., George A.L. Jr., Bhat K., Kim R.B., Wilkinson G.R. (2003). Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women. *Pharmacogenetics*; 13: 595–606.

8. LITERATURA

Foster B.C., Vandenhoeck S., Hana J., Krantis A., Akhtar M.H., Bryan M., Budzinski J.W., Ramputh A., Arnason J.T. (2003). In vitro inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. *Phytomedicine*; 10(4): 334-342.

Goldstein, J.A, deMorais S.M. (1994). Biochemistry and Molecular-Biology of the Human Cyp2c Subfamily. *Pharmacogenetics*; 4(6): 285-299.

Guengerich F.P., Martin M.V., Beaune P.H., Kremers P., Wolff T., Waxman D.J. (1986). Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P450 forms involved in nifedipine oxidation. *J Biol Chem*; 261: 5051-5060.

Guengerich F.P. (1997). Role of cytochrome P450 in drug-drug interactions. *Adv Pharmacol*; 43: 7–35.

Guengerich F.P., Johnson W.W. (1997). Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase: rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems. *Biochemistry*; 36: 14741–14750.

Guengerich F.P. (2003). Cytochromes P450, drugs and diseases. *Mol. Inter*; 3(4): 194-204.

Guengerich F.P. (2005). Human cytochrome P450 enzymes: Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry, Ortiz de Montellano P.R. (Ed.), Plenum, New York, 473-535.

Guengerich F.P., Wu Z., Bartleson C.J. (2005). Function of human cytochrome P450s: characterisation of the orphans. *Biochem Biophys Res Commun*; 338: 465–469.

Guengerich F.P. (2007). Mechanisms of cytochrome p450 substrate oxidation: MiniReview. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*; 21(4): 163-168.

Guengerich F.P. (2013). Kinetic deuterium isotope effects in cytochrome P450 oxidation reactions. *J Labelled Comp Radiopharm*; 56(9-10): 428-431.

8. LITERATURA

Haining R.L., Hunter A.P., Veronese M.E., Trager W.F., Rettie A.E. (1996). Allelic variants of human cytochrome P450 2C9: baculovirus-mediated expression, purification, structural characterization, substrate stereoselectivity, and prochiral selectivity of the wild-type and I359L mutant forms. *Arch Biochem Biophys*; 333:447–58.

Hanhineva K., Torronen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkanen H., Poutanen K. (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci*; 11(4): 1365-1402.

Hawksworth G., Drasar B. S., Hill M. J. (1971). Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycosidic bonds. *J Med Microbiol*; 4: 451-459.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*; 10: 572-584.

Heinonen I.M., Meyer A.S., Frankel E.N. (1998). Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J. Agric Food Chem*; 46: 4107–4112.

Heinonen S.M., Wahala, K., Adlercreutz H. (2002). Metabolism of isoflavones in human subjects. *Phytochemistry Reviews*; 1: 175–182.

Heinonen S.M. (2006). Identification of isoflavonoid metabolites in humus. Dissertation thesis. Institute for Preventive Medicine, Nutrition, and Cancer Folkhälsan Research Center and Division of Clinical Chemistry, University of Helsinki.

Helsby, N.A., Chipman, J.K., Gescher, A., Kerr, D. (1998). Inhibition of mouse and human CYP 1A- and 2E1-dependent substrate metabolism by the isoflavonoids genistein and equol. *Food Chem. Toxicol*; 36, 375–382.

Hollman P.C., Katan M.B. (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother*; 51: 305-310.

8. LITERATURA

Hollman P.C.H. (2004). Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharmaceut Biol*; 42, 74-83.

Howell A.B. (2002). Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Crit Rev Food Sci Nutr*; 42 (3 Suppl): 273-278.

Howell A.B., Reed J.D., Krueger C.G., Winterbottom R., Cunningham D.G., Leahy M. (2005). A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry*; 66 (18): 2281-91.

Hrycay E.G., Bandiera S.M. (2008) *Cytochrome P450 Enzymes. V: Preclinical development handbook. ADME and biopharmaceutical properties*, Gad SC (ed) Wiley, New York.

Chang T.K.H., Waxman D.J. (1998) Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 with 7-ethoxyresorufin as a substrate. V: Phillips IR, Shephard EA, editors. *Cytochrome P450 Protocols*. Totowa, NJ: Humana: 103-122

Chong M.F.F., Macdonald R., Lovegrove J.A. (2010). Fruit polyphenols and CVD risk: A review of human intervention studies. *Br J Nutr*; 104: 28–39.

Ibeanu G.C., Goldstein J.A., Meyer U., Benhamou S., Bouchardy C., Dayer P., Ghanayem B.I., Blaisdell J. (1998). Identification of new human CYP2C19 alleles (CYP2C19*6 and CYP2C19*2B) in a Caucasian poor metabolizer of mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther*; 286(3): 1490-1495.

Ingelman-Sundberg M., Oscarson M., McLellan R.A. (1999). Polymorphic human cytochrome P450 enzyme: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharm Sci*; 20: 342-349.

Ingelman-Sundberg, M. (2005). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J*; 5: 6–13.

8. LITERATURA

Ingelman-Sundberg M., Sim S.C., Gomez A., Rodriguez-Antona C. (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*; 116(3): 496-526.

Jia X., Chen J., Lin H., Hu M. (2004). Disposition of flavonoids via enteric recycling: enzymetransporter coupling affects metabolism of biochanin A and formononetin and excretion of their phase II conjugates. *J Pharmacol Exp Ther*; 310: 1103-1113.

Kay C.D. (2001). Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutr Res Rev*; 19(1): 137-146.

Kay C.D., Kroon P.A., Cassidy A. (2009). The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products. *Mol Nutr Food Res*; 53 Suppl 1, 92-101.

Kimura Y., Ito H., Ohnishi R., Hatano T. (2010). Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *Food Chem Toxicol*; 48(1): 429-435.

Kita T., Tanigawara Y., Aoyama N., Hohda T., Saijoh Y., Komada F., Sakaeda T., Okumura K., Sakai T., Kasuga M. (2001). CYP2C19 genotype related effect of omeprazole on intragastric pH and antimicrobial stability. *Pharm Res*; 18: 615–621.

Klingenberg M. (1958). Pigments of Rat Liver Microsomes. *Arch Biochem Biophys*; 75(2): 376-386.

Korzekwa K.R., et al. (1998). Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: Evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites. *Biochemistry*; 37(12): 4137-4147.

Kotyk A., Horák J. (1977). *Enzymová kinetika*. 1. vydání, Praha, Academia.

Krebs E.E, Ensrud K.E., MacDonald R., Wilt T.J. (2004). Phytoestrogens for treatment of menopausal symptoms: a systematic review. *Obstet Gynecol*; 104(4): 824-36.

8. LITERATURA

Kreijkamp-Kaspers S., Kok L., Grobbee D.E., de Haan E.H., Aleman A., Lampe J.W., van der Schouw Y.T. (2004). Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *JAMA*; 292(1): 65-74.

Kronbach T., Mathys D., Umeno M., Gonzales, F.J., Meyer U.A. (1989). Oxidation of Midazolam and Triazolam by human Liver Cytochrome P4503A4. *Mol Pharm*; 36: 89-96.

Kuehl P., Zhang J., Lin Y., Lamba J., Assem M., Schuetz J., Watkins P.B., Daly A., Wrighton S.A., Hall S.D. (2001). Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet*; 27: 383–391.

Lee M.J., Wang Z.Y., Li H., Chen L., Sun Y., Gobbo S., Balentine D.A., Yang C.S. (1995). Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 4(4), 393-399.

Lee S. J., Usmani K. A., Chanas B., Ghanayem B., Xi T., Hodgson E. (2003). Genetic findings and functional studies of human CYP3A5 single nucleotide polymorphisms in different ethnic groups. *Pharmacogenetics*; 13: 461–472.

Lee J.Y., Kim H.S., Song Y.S. (2012). Genistein as a Potential Anticancer Agent against Ovarian Cancer. *J Tradit Complement Med*; 2(2): 96-104.

Lerman R.H., Minich D.M., Darland G., Lamb J.J., Chang J.L., Hsi A., Bland J.S., Tripp M.L. (2010). Subjects with elevated LDL cholesterol and metabolic syndrome benefit from supplementation with soy protein, phytosterols, hops rho iso-alpha acids, and Acacia nilotica proanthocyanidins. *J Clin Lipidol*; 4(1): 59-68.

Li A.P., Kaminski D.L., Rasmussen A. (1995). Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology*; 104(1-3):1-8.

8. LITERATURA

Lin J.H, Lu A.Y.H. (1998). Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications. *Clin Pharmacokinet*; 35: (5), 361-390.

Lucas D., Menez J.F., Berthou F. (1996). Chlorzoxazone: an in vitro and in vivo substrate probe for liver CYP2E1. *Methods Enzymol*; 272: 115-123.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004). Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *Am J Clin Nutr*; 79: 727-747.

Manach C., Williamson G., Morand .C, Scalbert A., Rémésy C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr (Suppl)*; 81, 230–242.

Masimirembwa C., et al. (1995). Phenotyping and genotyping of *S*-mephenytoin hydroxylase (cytochrome P450 2C19) in a Shona population of Zimbabwe. *Clin Pharmacol Ther*; 57(6): 656-661.

Matuschek M.C., Hendriks W.H., McGhie T.K., Reynolds G.W. (2006). The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice. *J Nutr Biochem*; 17(1): 31-36.

McGhie T.K., Walton M.C. (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol Nutr Food Res*; 51(6): 702-713.

McLellan R.A., Oscarson M., Seidegard J., Evans D.A., Ingelman Sundberg M. (1997). Frequent occurrence of CYP2D6 gene duplication in Saudi Arabians. *Pharmacogenetics*; 7: 187–191.

Mekhfi H., El Haouari M., Bnouham M., Aziz M., Ziyat A., Legssyer A. (2006). Effects of extracts and tannins from *Arbutus unedo* leaves on rat platelet aggregation. *Phytother Res*; 20(2): 135-139.

8. LITERATURA

Michalets E.L. (1998) Update: clinically significant cytochromes P-450 drug interactions. *Pharmacotherapy*; 18: 84 – 112.

Middleton E.J. (1998). Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol*; 439: 175–182.

Meyer U.A. (2000). Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet*; 356 (9242): 1667-1671.

Miners J.O., Birkett D.J. (1998). Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol*; 45: 525-538.

Morse M.A., Lu J. (1998). High-performance liquid chromatographic method for measurement of cytochrome P450-mediated metabolism of 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*; 708: 290–293.

Nakajima, M., et al. (2001). Relationship between interindividual differences in nicotine metabolism and CYP2A6 genetic polymorphism in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*; 69(1):72-78.

Ngo N., Yan Z., Graf T.N., Carrizosa D.R., Kashuba A.D., Dees E.C., Oberlies N.H., Paine M.F. (2009). Identification of a cranberry juice product that inhibits enteric CYP3A-mediated first-pass metabolism in humans. *Drug Metab Dispos*; 37(3): 514-522.

Nguyen L.P., Bradfield C.A. (2008). The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol*; 21(1):102-116.

Olthof M.R., Hollman P.C.H., Vree T.B., Katan M.B. (2000). Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-40-glucoside do not differ in humans. *J Nutr*; 130: 1200–1203.

Ortiz de Montellano P.R. (2005). *Cytochrome P450: structure, mechanism and biochemistry*. 2nd Ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

8. LITERATURA

Ottaviani J. I., Actis-Goretta L., Villordo J. J., Fraga C. G. (2006). Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Biochemie*; 88 (3-4): 359-365.

Pandey K.B., Rizvi S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*; 2: 270–278.

Parkinson A. (2001). Chapter 6. Biotransformation of xenobiotics, in Casarett and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons* (Klaassen CD ed), McGraw-Hill, New York, 133-224.

Passamonti S., Vrhovsek U., Vanzo A., Mattivi F. (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Lett*; 544(1-3): 210-213.

Pelkonen O., Turpeinen M., Hakkola J., Honkakoski P., Hukkanen J., Raunio H. (2008) Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol*; 82: 667-715.

Pirmohamed M., Park B.K. (2003). Cytochrome P450 enzyme polymorphisms and adverse drug reactions. *Toxicology*; 192: 23–32.

Quaranta S., Chevalier D., Allorge D., Lo-Guidice J.M., Migot-Nabias F., Kenani A., Imbenotte M., Broly F., Lacarelle B., Lhermitte M. (2006). Ethnic differences in the distribution of CYP3A5 gene polymorphisms. *Xenobiotica*; 36(12): 1191–1200.

Rando R.R. (1984). Mechanism-Based Enzyme Inactivators. *Pharmacol Rev*; 36(2): 111-142.

Renaud S., de Lorgeril M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*; 339: 1523–1526.

8. LITERATURA

Reynaud J., Guilet D., Terreux R., Lussignol M., Walchshofer N. (2005): Isoflavonoids in nonleguminous families: an update. *Nat. Prod. Rep.*; 22: 504–515.

Rettie A.E., Wienkers L.C., Gonzalez F.J., Trager W.F., Korzekwa K.R. (1994). Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics*; 4: 39–42.

Rosemary J., Adithan C. (2007). The pharmacogenetics of CYP2C9 and CYP2C19: ethnic variation and clinical significance. *Curr Clin Pharmacol*; 2:93–109.

Roy J.N., Lajoie J., Zijenah L.S., Barama A., Poirier C., Ward B.J., Roger M. (2005). CYP3A5 genetic polymorphisms in different ethnic populations. *Drug Metab Dispos*, 33 (7): 884–887.

Ruiz-Larrea MB¹, Mohan AR, Paganga G, Miller NJ, Bolwell GP, Rice-Evans CA. (1997). Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic Res*; 26(1): 63-70.

Sai Y., et al. (1999). An inhibitory monoclonal antibody to human cytochrome P450 2A6 defines its role in the metabolism of coumarin, 7-ethoxycoumarin and 4-nitroanisole in human liver. *Pharmacogenetics*; 9(2): 229-237.

Sarkar F.H., Li Y. (2003). Soy isoflavones and cancer prevention. *Cancer Invest*; 21(5): 744-757.

Sathyamoorthy N., Wang T.T.Y. (1997). Differential effects of dietary phytoestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF7 cells. *Eur J Cancer*, 33, pp. 2384-2389.

Scalbert A., Williamson G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.*; 130(8S Suppl): 2073-2085.

Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*; 45(4): 287-306.

8. LITERATURA

Setchell K.D., Brown N.M., Desai P., Zimmer-Nechemias L., Wolfe B.E., Brashear W.T., Kirschner A.S., Cassidy A., Heubi J.E. (2001). Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr*; 131 (4 Suppl): 1362-1375.

Shih P.S., Huang J.D. (2002). Pharmacokinetics of midazolam and 1'-hydroxymidazolam in Chinese with different CYP3A5 genotypes. *Drug Metab Dispos*; 30: 1491–1496.

Shijlen E.G., Ric de Vos C.H., van Tunen A.J., Bovy A.G. (2004). Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*; 65: 2631-2648.

Shimada T., et al. (1994). 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*; 270(1): 414-423.

Shimada H, Eto M., Ohtaguro M., Ohtsubo M., Mizukami Y., Ide T., Imamura Y. (2010). Differential mechanisms for the inhibition of human cytochrome P450 1A2 by apigenin and genistein. *J Biochem Mol Toxicol*; 24(4): 230-234.

Sho, M., et al. (1994). Activation of Cyp3a4 - Evidence for the Simultaneous Binding of 2 Substrates in a Cytochrome-P450 Active-Site. *Biochemistry*; 33(21): 6450-6455.

Simon T., Verstuyft C., Mary-Krause M., Quteineh L., Drouet E., Méneveau N., Steg P.G., Ferrieres J., Danchin N., Becquemont L. (2009). Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med*; 360: 363–375.

Spencer J.P.E., Crozier A. (2012). *Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function*. CRC Press; 1 edition. 471 pages.

Talavéra S., Felgines C., Texier O., Besson C., Lamaison J.L., Rémésy C. (2003). Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *J Nutr*; 133(12): 4178-4182.

8. LITERATURA

Talavéra S., Felgines C., Texier O., Besson C., Manach C., et al. (2004) Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *J Nutr*; 134: 2275–2279.

Tsujimoto M., Horie M., Honda H., Takara K., Nishiguchi K. (2009). The structure-activity correlation on the inhibitory effects of flavonoids on cytochrome P450 3A activity. *Biol Pharm Bull*; 32(4): 671-676.

Tucker G.T., Houston J.B., Huang S.M. (2001). Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential - towards a consensus. *Br J Clin Pharmacol*; 52(1):107-117.

Tukey R.H., Strassburg C.P. (2000). Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 40: 581-616.

Turpeinen M., Zanger U.M. (2012). Cytochrome P450 2B6: function, genetics, and clinical relevance. *Drug Metabol Drug Interact*; 27(4):185-197.

Ushijima K., Tsuruoka S., Tsuda H., Hasegawa G., Obi Y., Kaneda T., Takahashi M., Maekawa T., Sasaki T., Koshimizu T.A., Fujimura A. (2009a). Cranberry juice suppressed the diclofenac metabolism by human liver microsomes, but not in healthy human subjects. *Br J Clin Pharmacol*; 68(2):194-200.

Ushijima K, Koshimizu T, Fujimura A. (2009b). The Inhibitory Effect of Cranberry Juice on Phenytoin Metabolism by Human Liver Microsomes. *Jpn J Clin Pharmacol Ther*; 40: 59–64.

Vincent-Viry M., Fournier B., Galteau M.M. (2000). The effects of drinking and smoking on the CYP2D6 metabolic capacity. *Drug Metab Dispos*; 28(6):617-619.

Wallace T.C. (2011). Anthocyanins in cardiovascular disease. *Adv Nutr Int Rev J*; 2: 1–7.

Wallace T.C., Giusti M.M. (2014). *Anthocyanins in Health and Disease*. 1st. edition. New York: CRC Press. 355 s.

8. LITERATURA

Wandel C., Böcker R., Böhrer H., Browne A., Rügheimer E., Martin E. (1994). Midazolam is metabolized by at least three different cytochrome P450 enzymes. *Br J Anaesthesia*, 73, 658–661.

Wang Y., Stevens V.L., Shah R., Peterson J.J., Dwyer J.T., Gapstur S.M., McCullough M.L. (2014). Dietary flavonoid and proanthocyanidin intakes and prostate cancer risk in a prospective cohort of US men. *Am J Epidemiol*; 179(8): 974-986.

Waxman D.J., Chang T.K.H. (1998) Spectrofluorometric analysis of CYP2A6-catalyzed coumarin 7-hydroxylation. V: Phillips IR, Shepard EA, editors. *Cytochrome P450 protocols*. Totowa, NJ: Humana: 111-116.

Wu X., Prior R.L. (2005). Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. *J Agric Food Chem*; 53(8): 3101-3113.

Xie H.G., Stein C.M., Kim R.B., Wilkinson G.R., Flockhart D.A., Wood A.J. (1999). Allelic, genotypic and phenotypic distributions of S-mephenytoin 4'-hydroxylase (CYP2C19) in healthy Caucasian populations of European descent throughout the world. *Pharmacogenetics*; 9(5): 539-549.

Yu K.S., Cho J.Y., Jang I.J. (2004). Effect of the CYP3A5 genotype on the pharmacokinetics of intravenous midazolam during inhibited and induced metabolic states. *Clin Pharm Ther*, 76, 104–112.

Zanger U. M., Raimundo S., Eichelbaum, M. (2004). Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369, 23–37.

Zuber R., Anzenbacherova E., Anzenbacher P. (2002). Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med*; 6(2): 189-198.

9. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Seznam prací vztahujících se k disertaci:

Původní vědecké publikace uvěřejněné v časopisech s IF

Kopecna Zapletalova M., Vanduchova A., Spicakova A., Anzenbacherova E., Anzenbacher P. *Interaction of anthocyanins with human liver microsomal cytochromes P450*. Biomedical Papers of the Faculty of Medicine and Dentistry of Palacký University Olomouc Czech Republic. Volume 157, Supplement 1, September 2013, Pages: S56-S59, (IF = 1,661).

Srovnalova A.[#], Svecarova M.[#], Kopecna 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 Jan 22; 62(3): 789-97, (IF = 3,107). [#] společné prvoautorství

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*. Toxicology Letters. Volume 221, Issue 1, 31 July 2013, Pages 1–8, (IF = 3,355).

Publikovaná abstrakta

Zapletalová M., Fojtíková M., Matušková Z., Špičáková A., Anzenbacher P., Anzenbacherová E. *Stanovení antokyjanidinů v nutraceuticích*. XXIII. biochemický sjezd České společnosti pro biochemii a molekulární biologii a Slovenské společnosti pro biochémiu a molekulárnu biológiu, Brno, 26.8. – 29.8.2012.

9. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Kopecna Zapletalova Michaela, Vanduchova Alena, Spicakova Alena, Anzenbacherova Eva, Anzenbacher Pavel. *Interaction of anthocyanins with human liver microsomal cytochrome P450*. Vojenské zdravotnické listy (Military Medical Science Letters), ISSN 0372-7025, University of Defence, Faculty of Military Health Sciences, Editorial offices: Faculty of Military Health Sciences, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové; Volume 82, suplementum 1, 2013, page: 16.

Kopečná Zapletalová Michaela, Vanduchová Alena, Špičáková Alena, Anzenbacherová Eva a Anzenbacher Pavel. *Inhibition of P450 activities by anthocyanidins and anthocyanins*. Biomedical Papers, ISSN 1213-8118, Palacký University Press, Olomouc, Křížkovského 8, 771 47 Olomouc; Volume 157, supplement 1, 2013, page: 29.

Michaela Kopecna Zapletalova, Alena Vanduchova, Kristyna Krasulova, Eva Anzenbacherova and Pavel Anzenbacher. *Influence of Anthocyanins on Activity of Cytochromes P450 in Human Liver Microsomes*. 20th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Stuttgart, Germany, 18.5. – 22.5.2014.

Michaela Kopecna Zapletalova, Alena Vanduchova, Kristyna Krasulova, Eva Anzenbacherova and Pavel Anzenbacher. *Influence of Isoflavonoids on Activity of Cytochromes P450 in Human Liver Microsomes*. Interdisciplinary Toxicology, ISSN 1337-6853, Volume 7 (suppl. 1), 2014, page: 46.

Ostatní publikace:

Nekvindova J., Contreras J.A., Juvan P., Fon Tacer K., Anzenbacher P., Zidek Z., Kopecna Zapletalova M., Rozman D., Anzenbacherova E. *Acyclic nucleoside phosphonates: a study on cytochrome P450 gene expression*. Xenobiotica. 2014 Aug; 44(8): 708-15, (IF=2,101).

10. SOUHRN

Flavonoidní látky jsou pro své protektivní účinky na lidský organismus aktivními složkami celé řady nutraceutik, která jsou v současnosti široce popularizována různými prostředky. Vzhledem k možnému vzniku nežádoucích interakcí doplňků stravy (nutraceutik) se současně podávanými léčivými přípravky je třeba věnovat pozornost posouzení potenciálního rizika vzniku interakcí na úrovni metabolismu zprostředkovaného cytochromy P450 (CYP).

Předkládaná disertační práce je zaměřena na studium ovlivnění enzymových aktivit hlavních enzymů I. fáze biotransformace cizorodých látek, tedy cytochromů P450 (CYP) vybranými zástupci flavonoidů (antokyanů, proantokyanidinu a isoflavonoidů).

První část práce je věnována sledování vlivu flavonoidních látek na enzymovou aktivitu různých forem lidského jaterního mikrosomálního CYP. Významný pokles aktivity formy CYP3A4 (6 β -hydroxylace testosteronu) antokyanidiny byl způsoben delphinidinem (IC₅₀ 31 μ M), petunidinem (IC₅₀ 32 μ M) a peonidinem (IC₅₀ 36 μ M). V přítomnosti pelargonidinu a petunidinu byla *in vitro* významně ovlivněna aktivita formy CYP2C9 (4'-hydroxylace diklofenaku), s IC₅₀ 21 μ M pro pelargonidin, a IC₅₀ 26 μ M pro petunidin. U antokyaninů (glykosidů antokyanidinů) byla významná inhibice pozorována, stejně jako v případě aglykonů – antokyanidinů, u forem CYP3A4 a CYP2C9. V obou případech byl nejvýraznější efekt na enzymovou aktivitu *in vitro* pozorován s kyanidin-3-rhamnosidem (IC₅₀ 53 μ M a 68 μ M). S prokyanidinem A2 byla zaznamenána pouze mírná inhibice enzymových aktivit CYP3A4 a CYP2C9. Signifikantní inhibiční efekt se naopak projevil u isoflavonoidů, konkrétně u genisteinu, který v různém rozsahu inhiboval CYP2C9, CYP3A4, CYP2E1, CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6. Nejvýraznější inhibiční účinek genisteinu se projevil na aktivitách CYP2C9 a CYP3A4 (K_i 36 μ M a 23 μ M) s plně nekompetitivním mechanismem inhibice. Významná inhibice CYP2C9 byla pozorována i s daidzeinem, který se vůči CYP2C9 chová jako plně nekompetitivní inhibitor s K_i 61 μ M. Vzhledem ke značnému inhibičnímu potenciálu genisteinu vůči CYP, byl v další části předkládané práce studován vliv genisteinu a genetického polymorfismu na metabolismus léčiv používaných jako markerové substráty pro stanovení *in vitro* enzymové aktivity mikrosomálních CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6. Výrazný vliv genotypu CYP byl u formy CYP2C19 ve vzorku, odpovídajícímu genotypu pomalých metabolizátorů.

10. SOUHRN

Získaná data ukazují, že nutraceutika na bázi flavonoidů mohou za vysokých koncentrací a u geneticky predisponovaných jedinců ovlivnit metabolismus léčiv, zejména prostřednictvím forem CYP2C9 a CYP3A4.

Klíčová slova: cytochrom P450, flavonoidy, antokyany, proantokyanidin, isoflavonoidy, genistein, genetický polymorfismus.

10. SUMMARY

Flavonoids are, for their protective impact on human organism, active compounds in a wide variety of currently used dietary supplements. Due to their potential interactions with current medications, attention should be paid to assessing the potential risk of interactions at the level of metabolism mediated by cytochromes P450 (CYPs).

Presented thesis is focused on study of effects of flavonoids (anthocyanidins, anthocyanins, proanthocyanidin, and isoflavonoids) on enzymatic activities of main phase I drug metabolising enzymes, cytochromes P450 (CYP).

The first part is aimed to the effects of flavonoids on enzyme activity of different forms of human liver microsomal CYP. The most prominent inhibition effect of anthocyanidins on CYP3A4 enzymatic activity (testosterone 6 β -hydroxylation) was found with delphinidin (IC₅₀ 31 μ M), petunidin (IC₅₀ 32 μ M) and peonidin (IC₅₀ 36 μ M). In the presence of pelargonidin and petunidin the *in vitro* enzymatic activity of CYP2C9 (diclofenac 4'-hydroxylation) was also significantly influenced with IC₅₀ values 21 μ M and 26 μ M, respectively. With anthocyanins, as in was the case of their aglycones (anthocyanidins), significant inhibition was observed with the same forms, thus CYP3A4 and CYP2C9. The most pronounced effect on the *in vitro* activity of CYP3A4 and CYP2C9 was observed to the both CYP forms with cyanidin-3-rhamnoside (IC₅₀ 53 μ M and 68 μ M, respectively). Our data show that procyanidin A2 is only weak inhibitor of CYP3A4 and CYP2C9 forms. On the other hand, a significant inhibitory effect on CYP activity was found with isoflavonoids, specifically with genistein, which, to varying extent inhibited activities of the CYP2C9, CYP3A4, CYP2E1, CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6. The most pronounced inhibition was observed with CYP2C9 and CYP3A4 (K_i 36 μ M a 23 μ M, respectively) with noncompetitive mechanism of inhibition of these CYP forms by genistein. Significant inhibition was found also with another isoflavonoid tested, namely, the daidzein, which inhibited enzymatic activity of the CYP2C9 enzyme as a noncompetitive inhibitor with K_i of 61 μ M.

Due to the significant inhibition potential of genistein against some CYP forms, in the next part of this thesis the impact of genistein and CYP polymorphism on drug metabolism was studied. Inhibition of CYP activities in genotyped human liver microsomes (using marker substrates) *in vitro* by genistein was followed for four CYP forms (CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6). The most important effect of genotype was observed for CYP2C19 specific *S*-mephenytoin 4'-hydroxylation.

10. SUMMARY

Data obtained have shown that nutraceuticals based on flavonoids are potentially able (at high concentrations and in genetically predisposed individuals) to influence the drug metabolism, namely, by the CYP2C9 and CYP3A4 forms.

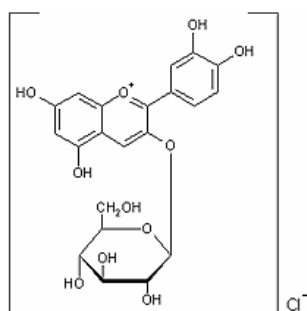
Keywords: cytochrome P450, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidin, isoflavonoids, genistein, polymorphism.

11. PŘÍLOHY

Příloha č. 1 Přehled chemických struktur testovaných glykosidů antokyanů

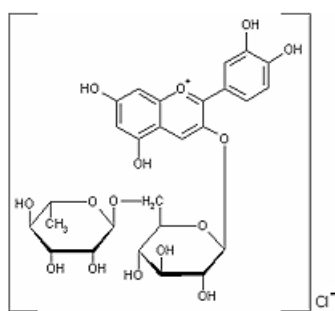
kyanidin-3-*O*-glukosid

(CYA-1)



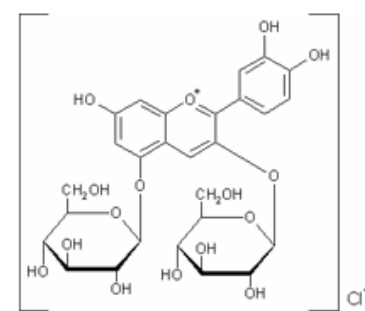
kyanidin-3-*O*-rutinosid

(CYA-2)



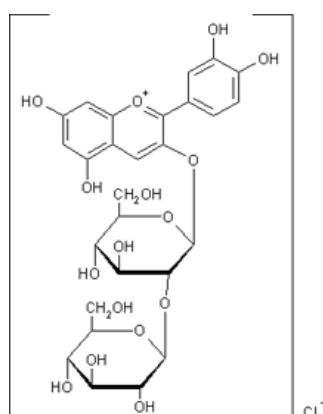
kyanidin-3,5-di-*O*-glukosid

(CYA-3)



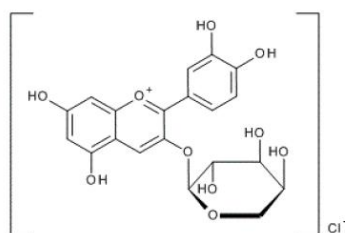
kyanidin-3-*O*-sophorosid

(CYA-4)



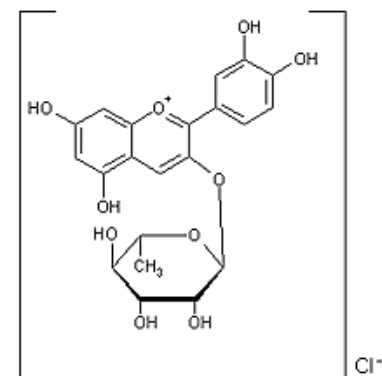
kyanidin-3-*O*-arabinosid

(CYA-5)



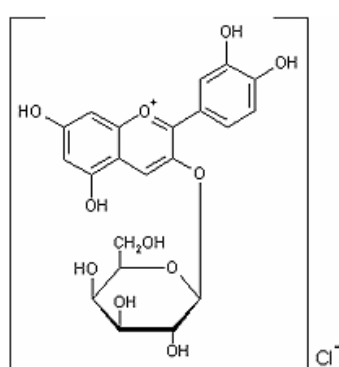
kyanidin-3-*O*-rhamnosid

(CYA-6)



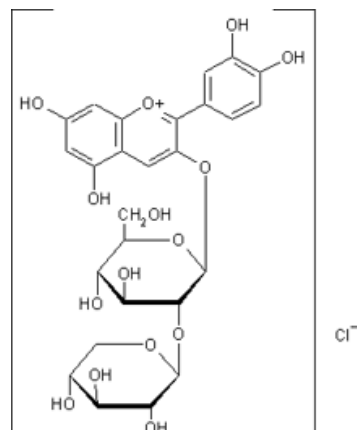
kyanidin-3-*O*-galaktosid

(CYA-7)



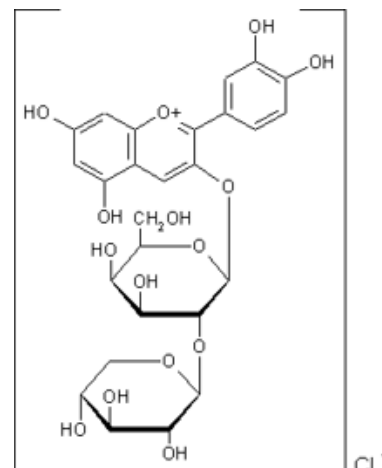
kyanidin-3-*O*-sambubiosid

(CYA-8)



kyanidin-3-*O*-lathyrosid

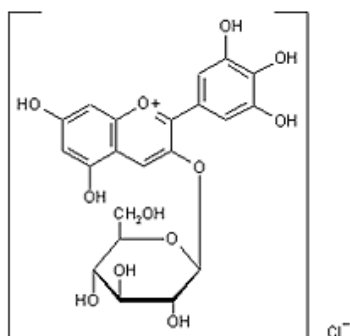
(CYA-9)



11. PŘÍLOHY

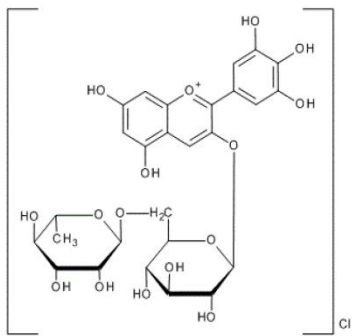
delfinidin-3-*O*-glukosid

(DEL-1)



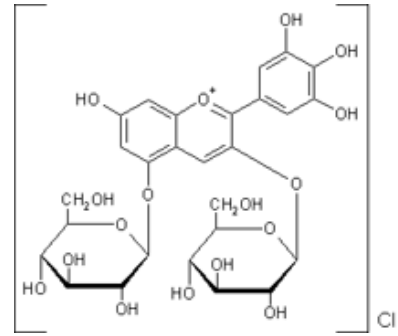
delfinidin-3-*O*-rutinosid

(DEL-2)



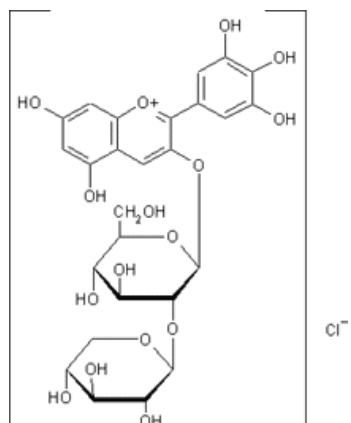
delfinidin-3,5-di-*O*-glukosid

(DEL-3)



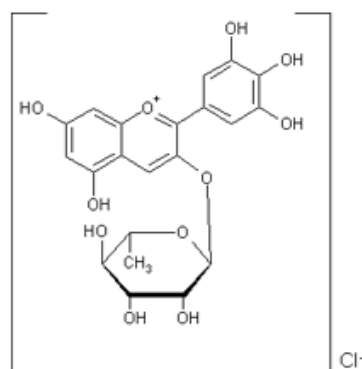
delfinidin-3-*O*-sambubiosid

(DEL-4)



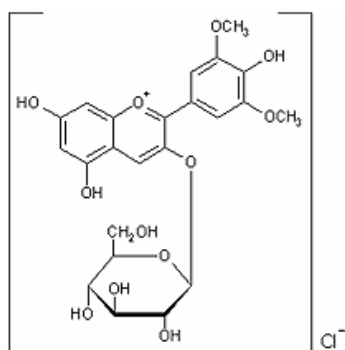
delfinidin-3-*O*-rhamnosid

(DEL-5)



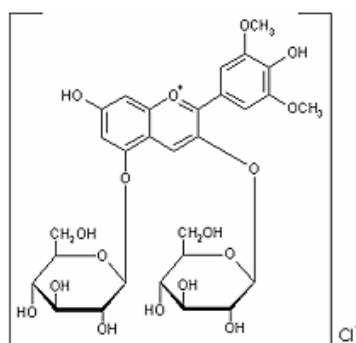
malvidin-3-*O*-glukosid

(MAL-1)



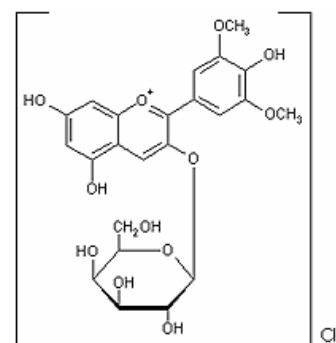
malvidin-3,5-di-*O*-glukosid

(MAL-2)



malvidin-3-*O*-galaktosid

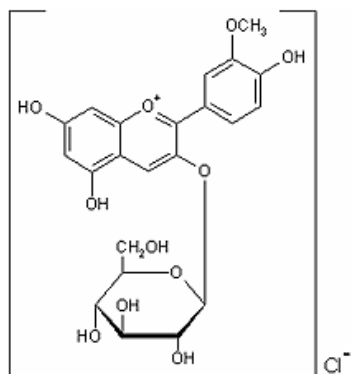
(MAL-3)



11. PŘÍLOHY

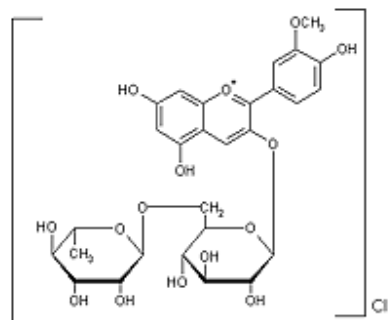
peonidin-3-*O*-glukosid

(PEO-1)



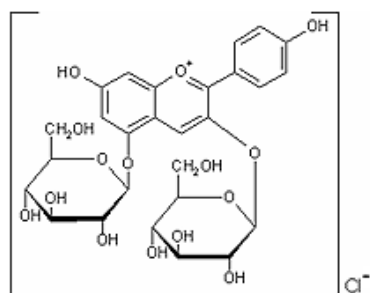
peonidin-3-*O*-rutinosid

(PEO-2)



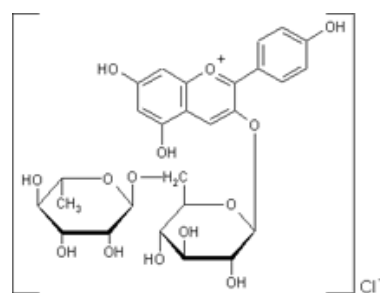
pelargonidin-3,5-di-*O*-glukosid

(PEL-1)



pelargonidin-3-*O*-rutinosid

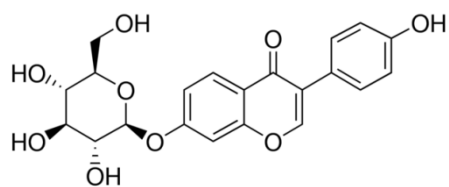
(PEL-2)



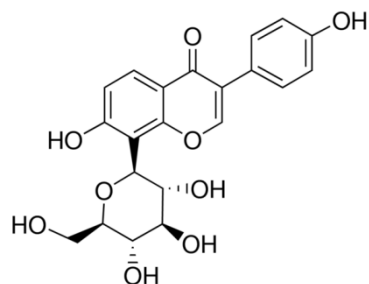
11. PŘÍLOHY

Příloha č. 2 Přehled chemických struktur testovaných glykosidů isoflavonoidů

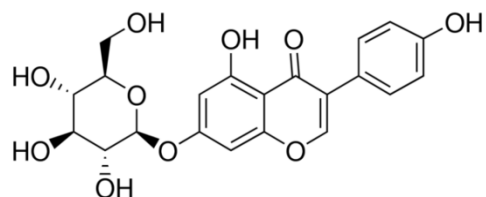
daidzin



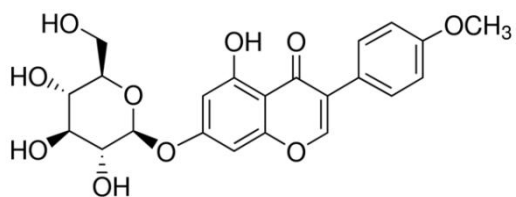
puerarin



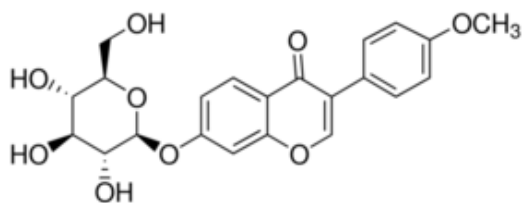
genistin



sissotrin



ononin



glycitin

