

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra organické chemie**



**Vliv kombinované diety atorvastatinu a silymarinu na aktivitu  
jaterního enzymu CYP3A u potkaního modelu metabolického  
syndromu**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor práce: Hana Šťastná  
Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie B1407  
Vedoucí práce: Mgr. Zuzana Rácová, Ph.D.

**Olomouc 2020**

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Zuzany Rácové, Ph.D. a že jsem použila zdroje, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne .....

.....

### **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala mé vedoucí, paní Mgr. Zuzaně Rácové, Ph.D. za všechny rady, trpělivost a odborné vedení mé bakalářské práce. Děkuji panu Ing. Michalu Pravencovi, CSc. z Fyziologického ústavu AV ČR za poskytnutí potkanů kmene SHR-CRP. Díky tomu mohl být experiment proveden a mohla jsem tak získat data do své bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Ústavu farmakologie, LF UPOL za pomoc a vytvoření příjemných pracovních podmínek. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za obrovskou trpělivost a podporu nejen při psaní této práce, ale i po celou dobu mého studia.

**Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: Hana Šťastná

Název práce: Vliv kombinované diety atorvastatinu a silymarinu na aktivitu jaterního enzymu CYP3A u potkaního modelu metabolického syndromu

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Ústav farmakologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Školitel: Mgr. Zuzana Rácová, Ph.D

Rok obhajoby práce: 2020

Abstrakt: Cytochrom P450 3A (CYP3A) se podílí na metabolismu celé řady xenobiotik. S tím souvisí i možnost vzniku interakcí těchto látek na vazebných místech CYP3A a následné ovlivnění jejich metabolismu. Atorvastatin je hypolipidemikum, který může působit jako inhibitor CYP3A4, kterým je také metabolizován. Silymarin, jehož hlavní složkou je silybin, je používán jako doplněk stravy při obtížích s játry a trávicím traktem. Rovněž může působit jako inhibitor CYP3A4.

Cílem práce bylo zjistit, zda diety obohacené o atorvastatin, silymarin nebo jejich kombinaci ovlivňují aktivitu CYP3A u potkanů s metabolickým syndromem. Analýza byla provedena *ex vivo* pomocí specifických substrátů CYP3A, testosteronu a midazolamu, s použitím HPLC s UV nebo MS detekcí. Výsledky ukazují, že po získání mikrosomální frakce nebyla aktivita CYP3A ovlivněna látkami přidanými do diet. Silymarin i atorvastatin zřejmě také neovlivňují expresi proteinu CYP3A.

Klíčová slova: Cytochrom P450, metabolický syndrom, HPLC,  
atorvastatin, silymarin

Počet stran: 48

Jazyk: Český

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Hana Šťastná

Title: Effect of combined diet of atorvastatin and silymarin on the liver CYP3A activity in rat model of metabolic syndrome

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc

Advisor: Mgr. Zuzana Rácová, Ph.D

The year of presentation: 2020

Abstract: Cytochrome P450 3A (CYP3A) is involved in the metabolism of a number of xenobiotics. This is related to the possibility of interaction of these compounds to CYP3A binding sites and subsequent effect on their metabolism. Atorvastatin is a hypolipidemic agent that can act as a CYP3A4 inhibitor by which it is also metabolised. Silymarin, whose main component is silybin, is used as a dietary supplement for liver and digestive problems. It may also act as an inhibitor of CYP3A4.

The aim of the study was to find out whether diets enriched with atorvastatin, silymarin or their combination affect CYP3A activity in rats with metabolic syndrome. Analysis was performed *ex vivo* with specific CYP3A substrates, testosterone and midazolam, using HPLC with UV or MS detection. Results show that the activity of CYP3A in microsomal fraction was not affected by substances added to the diets. Silymarin and atorvastatin also do not appear to affect protein expression of CYP3A.

Key words: Cytochrome P450, metabolic syndrome, HPLC,  
atorvastatin, silymarin

Number of pages: 48

Language: Czech

---

# Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>10</b>
<b>Úvod</b> .....	<b>11</b>
<b>Cíl práce</b> .....	<b>12</b>
<b>Teoretická část</b> .....	<b>13</b>
1    Cytochromy P450 .....	13
1.1    Názvosloví cytochromů P450 .....	13
1.2    Struktura cytochromů P450 .....	13
1.3    Mechanismus působení cytochromů P450 .....	14
1.4    Interakce na úrovni cytochromů P450 .....	15
1.5    Podrodina CYP3A .....	16
2    Metabolický syndrom .....	17
2.1    Model metabolického syndromu .....	18
3    Atorvastatin .....	19
3.1    Vlastnosti .....	19
3.2    Mechanismus účinku .....	20
3.3    Indikace a kontraindikace .....	20
3.4    Nežádoucí účinky .....	21
4    Silymarin .....	21
4.1    Vlastnosti .....	22
4.2    Mechanismus účinku .....	23
4.3    Indikace .....	23
5    Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	24
5.1    UV/Vis detektor .....	25
5.2    Hmotnostní detektor .....	26
<b>Experimentální část</b> .....	<b>27</b>
6    Materiál .....	27
6.1    Biologický materiál .....	27
6.2    Chemikálie .....	27



6.3	Přístrojové vybavení a příslušenství.....	28
7	Metody .....	29
7.1	Stanovení koncentrace CYPs v jaterní mikrosomální frakci.....	29
7.2	Stanovení aktivity CYP3A <i>ex vivo</i> : použitý substrát testosteron .....	30
7.3	Stanovení aktivity CYP3A <i>ex vivo</i> : použitý substrát midazolam.....	32
7.4	Stanovení aktivity CYP3A <i>in vitro</i> .....	34
8	Výsledky .....	36
8.1	Stanovení koncentrace cytochromů P450 .....	36
8.2	Stanovení aktivity CYP3A <i>ex vivo</i> : použitý substrát testosteron .....	36
8.3	Stanovení aktivity CYP3A <i>ex vivo</i> : použitý substrát midazolam.....	38
8.4	Stanovení aktivity CYP <i>in vitro</i> .....	40
	<b>Diskuze.....</b>	<b>42</b>
	<b>Závěr .....</b>	<b>44</b>
	<b>Citovaná literatura .....</b>	<b>45</b>

---

## Seznam zkratek

CYP	cytochrom P450
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotid fosfát
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadeninukleotid fosfát
WHO	Světová zdravotnická organizace
IDF	Mezinárodní diabetologická federace
SHR	spontánně hypertenzní potkan
CRP	C–reaktivní protein
HMG–CoA	3–hydroxy–3–methylglutaryl–koenzym A
PXR	pregnanový X receptor
CAR	konstitutivní andostranový receptor
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou
AISLP	Automatizovaný informační systém léčivých přípravků
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
K <sub>D</sub>	distribuční konstanta
ISO	kyselina isocitronová
IDH	isocitrát dehydrogenasa
DMF	N, N–dimethylamid kyseliny mravenčí

---

# Úvod

V současné moderní společnosti roste trend užívání různých přírodních doplňků stravy, které užíváme buď jako doplněk k terapii předepsané lékařem nebo pro jeho blahodárný účinek samotný.

Každé léčivo musí projít klinickým testováním, které trvá několik let, aby byla prokázána jeho prospěšnost pro pacienta bez vedlejších nebo jen s minimálními vedlejšími účinky. Na druhou stranu, doplňky stravy, které jsou běžně dostupné v obchodech, takovými testy neprocházejí. Tato skutečnost pak může vést k nežádoucím interakcím mezi léčivem a doplňkem stravy, a proto je důležité znát jejich mechanismus působení.

Nejdůležitějšími biotransformačními enzymy jsou cytochromy P450 (CYPs), které zajišťují metabolismus většiny cizorodých látek (xenobiotik) v organismu. Kromě biotransformace xenobiotik zajišťují i biosyntézu a biotransformaci endogenních látek, např. steroidních hormonů nebo žlučových kyselin.

Silymarin, extrakt z ostropestřece mariánského, je známý pro svůj blahodárný účinek na játra, a proto se můžeme často setkávat s tabletkami, kapslemi a léčivými čaji obsahující tento extrakt.

Tato bakalářská práce se věnuje možnosti interakce hypolipidemicky působícího léčiva atorvastatinu a přírodního extraktu silymarinu. Zkoumá také jejich vzájemný vliv na biotransformační enzym CYP3A.

---

## Cíl práce

- Vypracování přehledu problematiky metabolismu látek pomocí enzymu CYP3A u potkanů a u lidí.
- Stanovení aktivity CYP3A *ex vivo* u SHR–CRP potkanů na dietě obsahující atorvastatin, silymarin nebo jejich kombinace.
- Porovnání výsledků mezi jednotlivými skupinami potkanů, lišícími se podávanou stravou, a jejich zhodnocení.

---

# Teoretická část

## 1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYPs) jsou enzymy, které se podílí na celé řadě metabolických a biotransformačních procesech v organismech. Nacházejí se u široké škály nejrůznějších rostlinných a živočišných druhů, u kterých katalyzují reakce jako jsou hydroxylace, dealkylace, oxidace nebo epoxidace dvojných vazeb.<sup>1, 2</sup> Tyto enzymy hrají významnou roli v oxidačním metabolismu xenobiotik, především v I. fázi biotransformace.<sup>3, 4</sup> Substráty těchto enzymů jsou obecně hydrofobní látky, které jsou převedeny na polárnější metabolit.<sup>4</sup>

V největším množství se CYPs vyskytují v játrech, tenkém střevě, kůži, plicích, mozku a nadledvinách. V buňkách je lze najít především v membránách endoplazmatického retikula a membránách mitochondrií. Při eliminaci jsou dominantními místy právě játra a střevní epitel.<sup>3, 4, 5</sup>

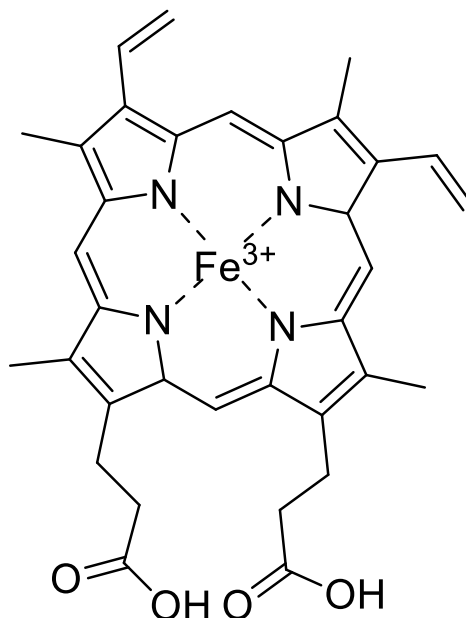
### 1.1 Názvosloví cytochromů P450

S rostoucím počtem nově objevených enzymů vznikla potřeba zavedení nového názvosloví. Jednotlivé enzymy jsou rozdělovány do rodin a podrodin s předponou CYP na základě homologie aminokyselinové sekvence. Do rodin jsou zařazeny enzymy s homologií nad 40 % a tyto enzymy rozlišujeme arabským číslem za předponou. Za tímto číslem následuje velké písmeno označující podrodinu s 55–60 % homologie aminokyselinové struktury (např. CYP3A). Konkrétní enzym jako zástupce dané podrodiny je označen arabskou číslicí za písmenem (CYP3A4).<sup>1, 2, 3, 4</sup>

### 1.2 Struktura cytochromů P450

Jedná se o hemoproteiny typu b, jejichž prostetickou skupinou je protoporfyrin IX s koordinovaným atomem železa, který je centrem celého hemového cyklu. Jako pátý ligand se váže thiolátový anion z cysteinového zbytku.<sup>1, 2</sup> Pokud je prostetická skupina

redukována oxidem uhelnatým, lze pozorovat typické absorpční maximum při 450 nm.<sup>1</sup>  
<sup>6</sup> Tato forma je však velmi labilní a může se snadno přeměnit na inaktivní formu, jejíž absorpční maximum je při 420 nm.<sup>1</sup> Tento typ vazby zároveň umožňuje hemové skupině transportovat elektronovou hustotu a vázat molekulu kyslíku jako šestý ligand a využít ho tak pro reakce.<sup>2, 4</sup>

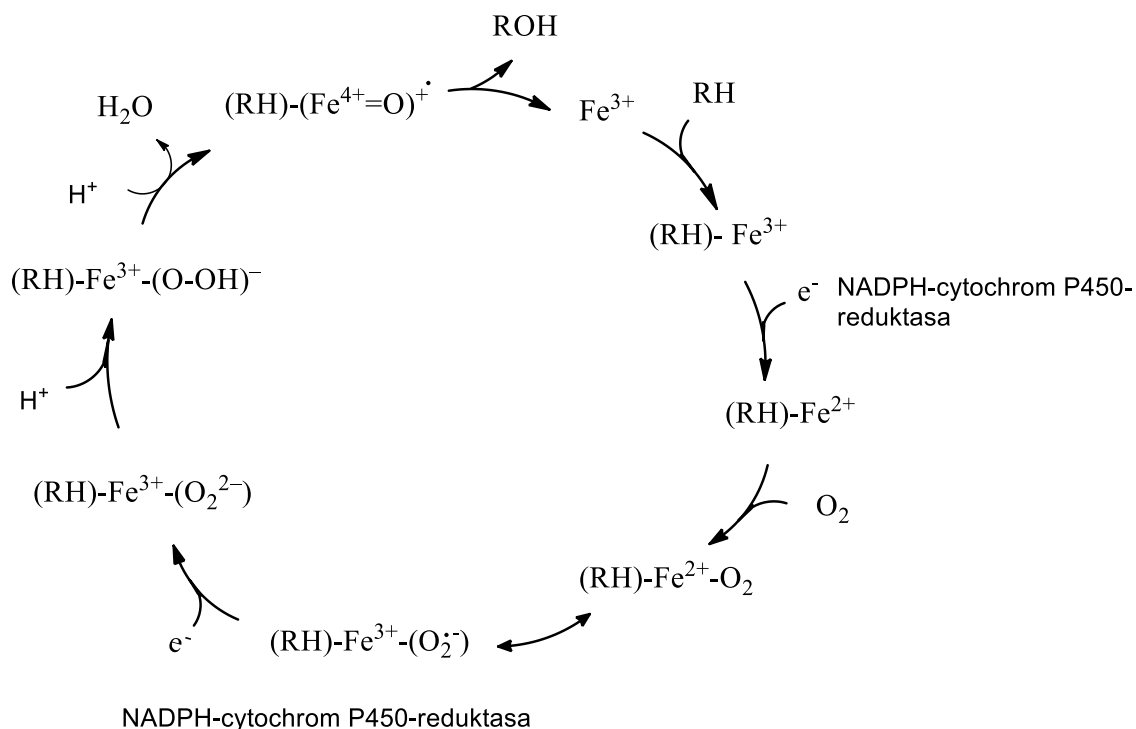


**Obr. 1:** Prostetická skupina cytochromů P450

### 1.3 Mechanismus působení cytochromů P450

V prvním kroku se substrát (RH) váže na cytochrom P450 a vzniká komplex (RH)-Fe<sup>3+</sup> (Obr.2). Dalším krokem je redukce oxidačního stavu hemového železa z Fe<sup>3+</sup> na Fe<sup>2+</sup> působením cytochromu b5, NADPH–cytochrom P450 oxidoreduktasy a donoru elektronů (NADPH nebo NADH). Vzniklý komplex (RH)–Fe<sup>2+</sup> je schopen vázat molekulární kyslík za vzniku meziprojektu (RH)–Fe<sup>2+</sup>–O<sub>2</sub>, který přechází v peroxylový radikál (RH)–Fe<sup>3+</sup>–(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), který může disociovat na Fe<sup>3+</sup> a superoxidový aniontový radikál. Peroxylový radikál obsahuje nepárový elektron na posledním kyslíku, a zároveň tento meziprojekt je negativně nabitý a elektrony z tohoto náboje jsou delokalizované po celé prostetické skupině. Příjmem dalšího elektronu působením cytochromu b5, NADPH–cytochrom P450 oxidoreduktasy a donoru elektronů (NADPH nebo NADH) vzniká negativně nabitý peroxidový komplex (RH)–Fe<sup>3+</sup>–(O<sub>2</sub><sup>2-</sup>), který je formálně dvojnásobně negativně nabitý. Z tohoto důvodu se rychle protonizuje za vzniku hydroperoxidového komplexu. Následnou protonací železa dojde k rozštěpení

vazby O-O a odštěpení molekuly vody. Tím vznikne elektrofilní komplex s železem v oxidačním stavu  $\text{Fe}^{4+}$  obsahující atomární kyslík. V posledním kroku dojde k přesunu atomu kyslíku z komplexu železa na RH a vznikne tak oxidovaný produkt R-OH, který se uvolní. Enzym může vázat další molekulu substrátu.<sup>1, 7, 8, 9</sup>



**Obr. 2:** Schématické znázornění reakčního cyklu cytochromů P450.<sup>1, 8</sup>

## 1.4 Interakce na úrovni cytochromů P450

Jeden konkrétní enzym je schopen metabolizovat více než jeden substrát. To může vést k nežádoucím interakcím mezi jednotlivými substráty a enzymem. Pokud dvě a více látek soutěží o vazebné místo enzymu, může dojít k pomalejšímu metabolismu současně podané látky, případně látek. Pokud je jedna z látek induktorem nebo inhibítozem daného enzymu může nastat zvýšení nebo naopak inhibice jeho aktivity i exprese.<sup>2, 3</sup>

Enzym, který je indukován, je ovlivněn na úrovni genové exprese, což vede ke zvýšené produkci enzymu a tím pádem ke zvýšenému metabolismu dané látky a změně farmakokinetiky. Není to děj okamžitý, protože indukce vyžaduje syntézu nových enzymů, což může trvat řadu dní. Indukci může způsobit samotný substrát, a tím pádem se jedná o autoindukci, nebo současně podaná látka. Pokud je substrátem enzymu léčivo,

v případě indukce tohoto enzymu nemusí být dosaženo účinné terapeutické dávky a může dojít k ohrožení pacienta. Pouze některé z cytochromů P450 jsou indukovatelné, ale nejedná se o všechny (např. lidské CYP2C9 nebo CYP3A4 jsou indukovatelné, naproti tomu CYP2D6 není).<sup>3</sup>

Inhibice je naproti tomu děj téměř okamžitý a pokud se jedná o léčivo, může dojít ke zvýšení nebo překročení terapeutické, resp. bezpečné dávky. Inhibitorem je substrát, který obsadí aktivní místo enzymu, a tím zabraňuje současně podanému substrátu se metabolizovat a v organismu se hromadit. Nejběžnější inhibicí je reverzibilní. Existuje také irreverzibilní inhibice, která vede ke ztrátě enzymatické aktivity. Obnovení aktivity nastane až je syntetizován nový enzym. Látky nemusí být metabolizované pouze jedním enzymem CYP, navíc různé formy CYPs mohou jednu látku přeměnit na různé metabolity. Některé látky mohou být inhibitorem určité formy CYP a současně se metabolizovat jinou formou CYP.<sup>2,3</sup>

## **1.5 Podrodina CYP3A**

### **1.5.1 CYP3A u člověka**

Tato podrodina cytochromů P450 má velmi rozsáhlou substrátovou specifitu a podílí se na metabolismu celé řady xenobiotik. Podrodina CYP3A se účastní biotransformace přibližně 50 % léčiv, které jsou na trhu. To může mít za následek nežádoucí interakce mezi substráty a enzymem. Enzymy této podrodiny jsou snadno indukovatelné a mohou být také inhibovány celou řadou substrátů. Genetický polymorfismus má taktéž vliv na aktivitu CYP3A (a také dalších forem CYPs) a může vést k výrazným rozdílům v metabolismu téže látky u jednotlivých jedinců.<sup>3</sup>

V lidské podrodině enzymu CYP3A existují celkem čtyři formy, kterými jsou CYP3A4, 3A5, 3A7 a 3A43. První dvě formy jsou nejrozšířenější a podílejí se na biotransformaci většiny xenobiotik. CYP3A4 a 3A5 se nachází v játrech, žaludku, tenkém střevě, plicích a v ledvinách. Formy CYP3A7 a 3A43 nemají na metabolismus léčiv velký vliv.<sup>3</sup> CYP3A7 se nachází v játrech plodu a děložním endometriu.<sup>6</sup> CYP3A43 je exprimován v játrech a pouze v omezeném množství.<sup>3</sup> Jeho funkce není dosud plně objasněna.<sup>6</sup>



CYP3A4 má poměrně velké aktivní místo se schopností se přizpůsobit substrátu.

<sup>10</sup> Existují teorie, že tento enzym by mohl mít dvě nebo dokonce tři vazebná místa. Tato tvrzení by vysvětlila, proč má forma CYP3A tak rozsáhlou substrátovou specifitu. <sup>11</sup>

### 1.5.2 Podrodina CYP3A u potkana

Do potkaní podrodiny CYP3A byly zařazeny formy CYP3A1, 3A2, 3A9, 3A18, 3A23 a 3A62. Genetickou analýzou genu kódující formu CYP3A1 bylo zjištěno, že CYP3A23 je totožný s CYP3A1. Formy CYP3A se liší mezi pohlavími. Například formy CYP3A2 a 3A18 jsou typické pro samce, forma CYP3A9 se nachází převážně u samic. Forma CYP3A62 je dominantní formou ve střevní tkáni, zatímco CYP3A1 a 3A2 byly nalezeny pouze v játrech. Další enzymy CYP3A9 a 3A18 byly potvrzeny jak v játrech, tak i v gastrointestinálním traktu. Za typický induktor u lidských CYP3A je považován rifampicin, který však neindukuje potkaní CYP3A1, a proto není potkan vhodným modelem pro studium indukce lidského CYP3A4. Také některá léčiva, která jsou u člověka metabolizována CYP3A4, nemusí být substrátem CYP3A1 u potkana. <sup>3</sup>

## 2 Metabolický syndrom

Jedná se o soubor rizikových faktorů vedoucích k rozvoji aterosklerózy, kardiovaskulárních onemocnění nebo diabetes mellitus 2. typu. <sup>12</sup> Zvýšená pozornost tomuto souboru onemocnění byla věnována díky rostoucímu výskytu a úmrtnosti na kardiovaskulární onemocnění. <sup>13</sup> V roce 2016 na toto onemocnění zemřelo 17,9 mil. lidí, to je 31 % ze všech celosvětových úmrtí. <sup>14</sup> Mezi rizika vzniku tohoto onemocnění je především nevhodná životospráva a genetická predispozice. <sup>13</sup> Kromě inzulínové rezistence jsou dalšími rizikovými faktory obezita, vysoký krevní tlak a dyslipidemie. <sup>12</sup>

Podle Mezinárodní diabetologické federace (IDF) jsou pro diagnostiku metabolického syndromu důležitá tato kritéria:

- Obezita charakterizovaná obvodem pasu (muži > 94 cm, ženy > 80 cm) a dvě a více z následujících znaků:
  - Zvýšená hladina triglyceridů nebo nízká hladina HDL-cholesterolu nebo léčba dyslipidemie
  - Hypertenze

- Hraniční glykemie nalačno nebo porucha tolerance glukózy nebo diabetes mellitus 2. typu

Pacienti se běžně s tímto pojmem nesetkávají, avšak jsou poučeni o těchto rizikových kritériích a doporučuje se jim změna životosprávy s pravidelným měřením tlaku. Ke zdravé životosprávě patří také pravidelná fyzická aktivita, která může pozitivně ovlivnit jak inzulínovou rezistenci, tak i dyslipidemii a hypertenzi. Pokud ovšem u pacienta s touto diagnózou nedojde ke změně životosprávy, musí být nasazena farmakologická léčba.<sup>13</sup>

Farmakologická léčba se snaží řešit především jednotlivé faktory metabolického syndromu. Nejužívanějšími léky jsou antihypertenziva, mezi které patří např. sartany nebo ACE inhibitory, hypolipidemika, např. fibráty nebo statiny. Pro efektivnější léčbu je možné využít kombinovanou terapii, např. kombinaci statinu s fibrátem nebo niacinem.

13

## 2.1 Model metabolického syndromu

Jako model metabolického syndromu lze využít kmen spontánně hypertenzních potkanů (SHR). Typickým znakem tohoto kmene je vysoký krevní tlak, což je jeden z faktorů metabolického syndromu.

Potkani tohoto kmene byli poprvé vyšlechtěni v roce 1963 z potkanů kmene Wistar, zkřížením samce s výrazně zvýšeným krevním tlakem a samice s mírně zvýšeným krevním tlakem. Z jejich potomků byli vybráni ti, kteří trpěli vysokým krevním tlakem (150 mmHg, po dobu více jak jednoho měsíce) a pokračovalo se sourozeneckým křížením pro lepší selekci hypertenze<sup>15</sup>

Existují biomarkery zánětu, které jsou spojovány s rozvojem metabolických poruch, obezity nebo kardiovaskulárních onemocnění. Jedním z nich je C–reaktivní protein (CRP), bílkovina produkovaná v játrech a jejíž koncentrace narůstá v případě zánětu v organismu. Autoři Pravenec a kol. proto transgenně exprimovali CRP u SHR potkanů (SHR–CRP). Tato studie potvrdila, že C–reaktivní protein není jen markerem zánětu, ale také může napomáhat k rozvoji metabolického syndromu a jeho faktorů, jako jsou inzulínová rezistence, dyslipidemie a obezita. Tento kmen potkanů může umožnit studii metabolických poruch a zároveň testování protizánětlivých léčiv a inhibitorů CRP, které by mohli pomoci při terapii nepříznivých faktorů metabolického syndromu.<sup>16</sup>

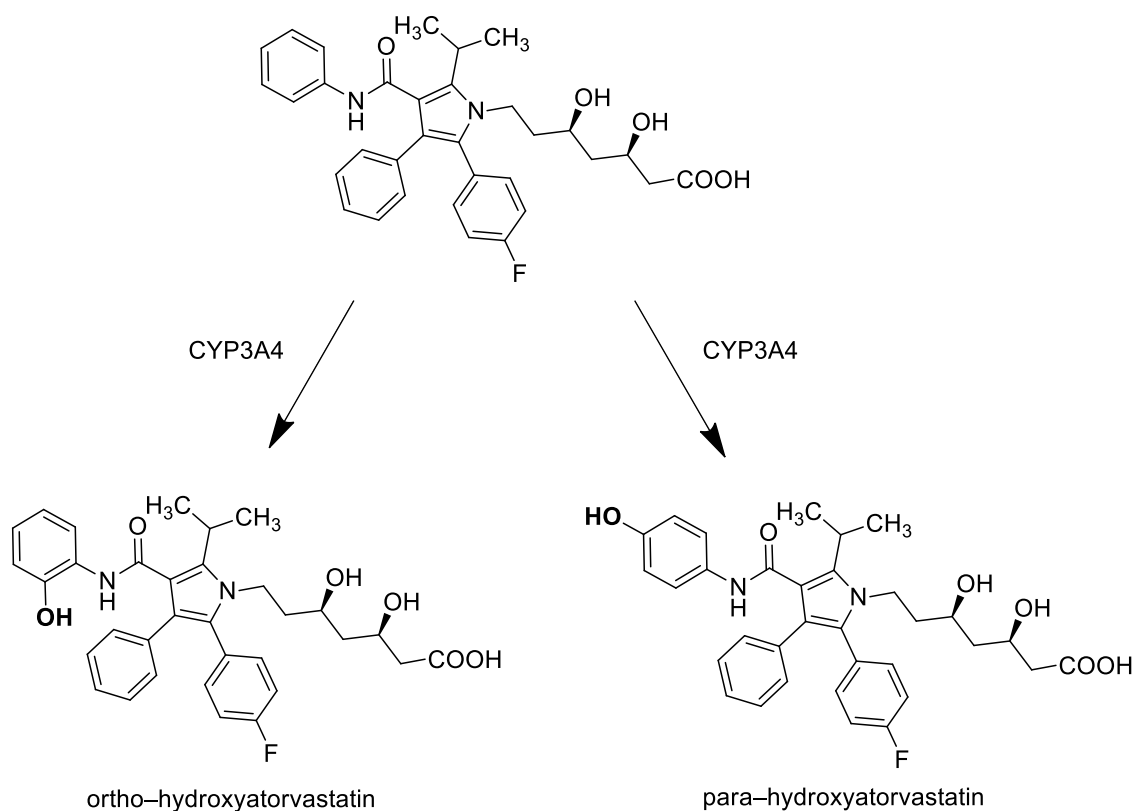
## 3 Atorvastatin

Atorvastatin řadíme mezi statiny, které jsou pro svůj hypolipidemický účinek používány především k léčbě dyslipidemie. Statiny obecně působí jako inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktasy. Tento enzym katalyzuje důležitý regulační krok při biosyntéze cholesterolu.<sup>17, 18</sup>

### 3.1 Vlastnosti

Atorvastatin je užíván perorálně a v preparátu je podáván jako trihydrát vápenaté soli. Je lipofilního charakteru (podobně jako simvastatin nebo lovastatin), což umožňuje snadný vstup do membrán, kde se může kumulovat a hůře prostupovat do buněk. Po perorálním podání se 30 % léčiva vstřebává do krevního oběhu a následně je podroben výraznému metabolismu prvního průchodu játry.<sup>17</sup> Celková biologická dostupnost je tedy pak jen 12 – 14 %. Metabolizován je CYP3A4. Hlavními produkty metabolismu jsou orto- a para- hydroxylované metabolity, které následně podléhají oxidaci. Metabolity vzniklé působením CYP3A4 také působí inhibičně na HMG-CoA reduktasu (mají asi 70 % inhibiční aktivity léčiva). Díky těmto aktivním metabolitům nemusí být atorvastatin převeden na aktivní formu jako jiné statiny (např. lovastatin, simvastatin).<sup>17, 19</sup> Ve II. fázi biotransformace jsou metabolity atorvastatinu glukuronidovány a následně eliminovány, především ve formě žluči.

Dále je známo, že atorvastatin působí (podobně jako jiné statiny) i jako inhibitor CYP3A4. Některé *in vitro* studie naznačují, že atorvastatin, stejně jako simvastatin a fluvastatin mají schopnost aktivovat pregnanový X receptor (PXR) a v menší míře také konstitutivní androstanový receptor (CAR). Oba tyto receptory mají výrazný vliv na indukci metabolismu xenobiotik, především formy CYP3A4. Studie *in vivo*, kterou provedli Hukkanen a kol., však toto tvrzení o atorvastatinu označuje za nepravděpodobné.



**Obr. 3:** Struktura atorvastatinu a jeho hydroxylovaných derivátů

### 3.2 Mechanismus účinku

Atorvastatin kompetitivně inhibuje HMG–CoA reductasu, která katalyzuje redukcí HMG–CoA na mevalonát. Tato reakce je důležitým krokem určujícím rychlost biosyntézy cholesterolu v játrech. Inhibicí HMG–CoA reductasy dojde k zablokování tvorby cholesterolu v jaterních buňkách.<sup>17</sup> Ty reagují zmnožením svých LDL receptorů, které vychytávají cholesterolové LDL částice z krevního řečiště. Právě tyto částice mají největší podíl na vzniku aterosklerotických plátů a jejich usazování na povrchu cévních stěn.<sup>17, 18</sup>

### 3.3 Indikace a kontraindikace

Statiny jsou nejvýznamnějšími hypolipidemiky. Snižují především koncentraci LDL–cholesterolu. Dle Automatizovaného informačního systému léčivých přípravků (AISLP) bylo v roce 2018 v České republice prodáno 3,38 mil. balení atorvastatinu, to je 58 % ze všech prodaných statinů.<sup>21</sup>

Atorvastatin je podáván pacientům trpícím izolovanou hypercholesterolemií nebo kombinovanou hyperlipoproteinemií s převahou hypercholesterolemie a pouze mírně zvýšenou koncentrací triglyceridů. Také je to jediný ze statinů, který je předepisován pacientům pro léčbu homozygotní familiární hypercholesterolemie.

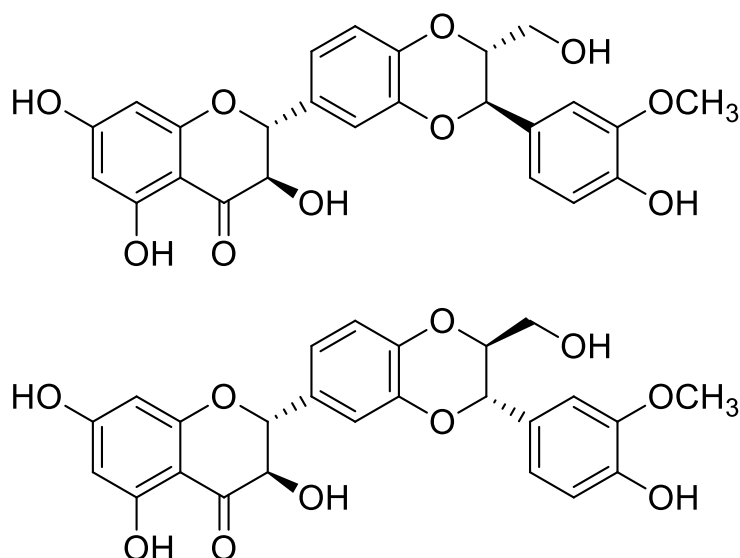
Atorvastatin by neměly užívat těhotné a kojící ženy a děti. Také by jej neměli užívat pacienti trpící onemocněním jater nebo ledvin. Není doporučeno atorvastatin užívat současně s některými léky, především inhibitory CYP3A4 (některá antibiotika, antimykotika nebo antivirotika).<sup>17, 19</sup>

### **3.4 Nežádoucí účinky**

Při užívání atorvastatinu se nežádoucí účinky vyskytují zřídka. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří obtíže s gastrointestinálním traktem (zácpa, nauzea, průjem).<sup>17, 19</sup> Při vyšetření krve byla u pacientů zjištěna zvýšená koncentrace transaminás, která však nevyžadovala přerušení terapie. Výraznější zvýšení bylo popsáno u 0,8 % pacientů a bylo závislé na podávané dávce. Rizikem může být zvýšená hladina kreatinkinasy, která byla popsána u 2,5 % pacientů.<sup>19</sup> Vyšší hodnota kreatinkinasy může vést k rozvoji myopatie a rhabdomyolýzy. Riziko rhabdomyolýzy se zvyšuje při současném užívání s fibráty. Na rozdíl od jiných inhibitorů HMG-CoA reductasy, u atorvastatinu jsou případy rhabdomyolýzy a myopatie hlášeny jen velmi vzácně.<sup>17</sup>

## **4 Silymarin**

Silymarin je extrakt ze semen ostropestřce mariánského, *Silybum marianum*. Jde o směs flavonolignanů. Hlavní složkou je silybin, který se vyskytuje ve formě dvou diastereoizomerů, které se označují jako A a B. Dalšími flavonolignany jsou např. isosilybin, dehydrosilybin nebo silychristin.<sup>22</sup>



**Obr. 4:** Diastereoizomery silybinu. Silybin A (nahore), Silybin B (dole)

#### 4.1 Vlastnosti

Silymarin je známý díky svým prospěšným vlivům na organismus, ale jeho nevýhodou je nízká biologická dostupnost (asi 2 %) ve standardizované formě a jeho rychlé vyloučení omezuje terapeutický efekt. Použitím mikronizovaného silymarinu nebo silymarinu ve formě fytosomů může být biologická dostupnost výrazně zlepšena. Studie ukazují, že v případě mikronizovaného silymarinu se biologická dostupnost zlepšila asi o 85 % v porovnání se standardizovanou formou a při použití fytosomů bylo zlepšení více jak šestinásobné.<sup>23</sup>

Při orálním podání je silybin absorbován z 23 – 47 %.<sup>24</sup> Hlavním produktem při metabolismu silybinu je jeho *O*-demethylovaný derivát, v menší míře jsou to potom mono- a dihydroxy- silybin. Metabolizován je hlavně formou CYP2C8.<sup>25</sup> Následuje II. fáze biotransformace, kde jsou metabolity konjugovány UDP-glukuronosyltransferasou (UGT) na glukuronidované metabolity nebo sulfottransferasami (SULTs) na sulfatované deriváty. Je obecně známo, že silybin je špatně rozpustný ve vodě, což může stát za horší biologickou dostupností. Dalším důvodem může být rozsah a rychlost metabolismu silybinových derivátů ve II. fázi metabolismu.<sup>24</sup>

Silybin také může inhibovat některé metabolické cesty katalyzované cytochromy P450. Studie prokázala, že v největší míře jsou to CYP3A4 a 2C9.<sup>25</sup>

## 4.2 Mechanismus účinku

Silymarin působí především jako hepatoprotektivum, a to díky schopnosti vychytávat radikály a antioxidačnímu působení.<sup>25, 26</sup> Při poškození gastrointestinálního traktu intoxikací pomáhá k rychlejšímu zotavení. Také je schopen stimulovat aktivitu některých antioxidačních enzymů slinivky břišní (glutathion peroxidasa, katalasa, superoxid dismutasa).<sup>22</sup> Jeho antioxidační mechanismus lze vysvětlit dvěma způsoby:<sup>26</sup>

- Schopnost přímo zachytit reaktivní radikály
  - Nepřímé ovlivnění aktivity CYPs, podílející se na tvorbě reaktivních produktů
- Novější studie ukazují, že může mít i protirakovinné, chemopreventivní a hypocholesterolemické účinky.

Hypocholesterolemické účinky jsou způsobeny vlivem silymarinu na stabilitu membrán, to může souviset se změnami hladin cholesterolu, fosfolipidů a membránových lipidů. Tímto může dojít k ovlivnění dalších faktorů, které mohou vést k sekreci nebo absorpci lipoproteinů.<sup>27</sup>

Jeho chemopreventivní a protirakovinné působení spočívá v ovlivnění řady procesů podílející se např. na rozvoji rakoviny. Také může inhibovat karcinogenní účinek některých chemických látek. Rovněž je zde potenciální využití při adjuvantní léčbě jinými chemoterapeutiky, aby působil především jako antioxidant při ochraně tkání před oxidativním stresem, který vzniká při chemoterapii. Mohl by eliminovat hepatotoxicitu chemoterapeutik, avšak neomezovat protinádorovou aktivitu.<sup>22</sup>

## 4.3 Indikace

Tento extrakt je známý už tisíce let, kdy lidé používali silymarin při obtížích s játry nebo gastrointestinálním traktem, a proto je jeho užívání doporučeno při léčbě hepatitidy, onemocnění spojené s konzumací alkoholu nebo při vystavení přírodním či chemickým toxinům.<sup>22</sup>

Silymarin je součástí doplňků stravy, ve formě čajů, semen ostropestřece mariánského nebo ve formě tablet a je rovněž dostupný jako léčivý přípravek Legalon.<sup>28</sup>

## 5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Chromatografie obecně je separační metoda, kterou se oddělí jednotlivé složky obsažené ve vzorku tak, že se nanáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Nepohyblivou fází nazýváme stacionární, pohyblivá se nazývá mobilní. Vzorek je nanesen na stacionární fází a průtokem mobilní fáze je vzorek unášen systémem ke konci stacionární fáze. Každá ze složek vzorku může být zachycena na stacionární fází na základě své afinity danou jejími fyzikálně–chemickými vlastnostmi. Složky s nižší afinitou ke stacionární fází jsou unášeny mobilní fází rychleji a jsou detekovány dříve než složky s vyšší afinitou. Při průchodu vzorku systémem dochází k ustanovení rovnováhy jednotlivých složek ve stacionární a mobilní fází. K popisu této rovnováhy používáme distribuční konstantu  $K_D$ , která je daná podílem koncentrací složky ve stacionární a mobilní fází.<sup>29</sup> Přístroj, na němž separaci provádíme se nazývá chromatograf. Záznam chromatografické separace označujeme jako chromatogram a má podobu píků, které odrážejí signály složek vzorku zachycené detektorem.<sup>30</sup>

Chromatografické metody můžeme rozdělit podle několika aspektů:<sup>29</sup>

- Podle skupenství mobilní fáze
  - Kapalinová chromatografie
  - Plynová chromatografie
- Podle uspořádání stacionární fáze
  - Kolonová chromatografie
  - Papírová chromatografie
  - Tenkovrstvá chromatografie
- Podle povahy děje uplatněného při separaci
  - Rozdělovací chromatografie
  - Adsorpční chromatografie
  - Ionově–výměnná chromatografie
  - Gelová chromatografie
  - Afinitní chromatografie

U vysokoučinné kapalinové chromatografie, ve zkratce HPLC (High Performance Liquid Chromatography), je používána jako mobilní fáze kapalina. Pro účinnou separaci je nutné použít dostatečně malých částic sorbentu stacionární fáze, aby byl prostupující kapalině kladen dostatečný odpor. Metoda HPLC pracuje za vysokých tlaků (až desítky MPa).



Pro čerpání mobilní fáze jsou používána pístová nebo membránová čerpadla. Použitím jednoho čerpadla se dosáhne konstantního průtoku mobilní fáze bez rušivých vlivů, ale je zde omezení pracovního objemu čerpadla. Druhou možností je zapojení více čerpadel do série tak, aby byly omezeny tlakové pulzy při toku mobilní fáze a zároveň nebyl limitován objem mobilní fáze nutné k provedení analýzy.<sup>29,30</sup> Složení mobilní fáze se může v průběhu separace měnit (gradientová eluce) nebo může zůstat stejné (izokratická eluce).<sup>29</sup>

Pro dávkování vzorku se používá buď ventil se smyčkou, do které se dávkuje vzorek manuálně pomocí injekční stříkačky za normálního tlaku, nebo automatickým dávkovačem, tzv. autosamplerem, který je ovládán počítačem.

V metodě HPLC se používají pouze náplňové kolony, které jsou nejčastěji vyrobeny z nerezové oceli. Existuje mnoho různých kolon, lišících se v délce, vnitřním průměru, druhu a velikosti částic náplně. Jako ochranu před nerozpustnými částicemi a nečistotami je mezi dávkovací zařízení a kolonu umístěna předkolona, která předchází poškození samotné kolony a způsobuje pouze malé rozmytí píků.<sup>29,30</sup>

Za kolonou je umístěn detektor, který zaznamenává jednotlivé složky vzorku (analyty) a převádí je na odpovídající elektrický signál. Ideálně by měl detekovat všechny látky, mít lineární odezvu a výsledky by měly být reprodukovatelné. Také by měl být dostatečně citlivý s co nejmenším šumem. Nejčastěji jsou používány detektory spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické nebo refraktometrické. Výhodné je také spojení s hmotnostní spektrometrií nebo NMR.<sup>31</sup>

## 5.1 UV/Vis detektor

Principem UV/Vis detekce je absorpce záření z UV nebo viditelné oblasti spektra (200 - 800nm) roztokem analytu. Zařízení pro měření prošlého zářivého toku se nazývá spektrofotometr. Skládá se ze zdroje záření, monochromátoru, prostoru pro vzorek a detektoru. Zdrojem záření může být wolframová žárovka pro viditelnou oblast, deuteriová lampa pro UV oblast a halogenová žárovka dokáže pokrýt rozsah vlnových délek obou oblastí. Jako monochromátor se zpravidla používá difrakční mřížka. Vzorek může být měřen v kyvetě nebo v průtočné cele, která je ve spojení se separační metodou (např. kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza). Detekce je prováděna fotonásobičem, detektorem s diodovým polem nebo CCD detektorem.<sup>29</sup>

Využití je možné jak pro kvantitativní, tak kvalitativní analýzu. Kvantitativní analýza umožňuje měření koncentrací roztoků metodou kalibrační křivky. Kvalitativní analýza nepodává kompletní informace o vzorku a jeho struktuře, ale UV/Vis spektra mohou posloužit jako doplňující informace k dalším analýzám.<sup>29</sup>

## 5.2 Hmotnostní detektor

Hmotnostní detekce se zpravidla používá ve spojení s jinými separačními metodami (kapalinová nebo plynová chromatografie, kapilární elektroforéza) nebo extrakčními metodami (online extrakce na pevné fázi, SPE). Tato metoda převádí vzorek na ionty, které jsou poté separovány na základě rozdílných hodnot podílu jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). V prvním kroku musí dojít k odpaření vzorku a jeho následné ionizaci. Vzniklé ionty jsou poté urychleny směrem k hmotnostnímu analyzátoru, kde jsou separovány hmotnostním filtrem a následně detekovány. Dopadem na detektor jsou ionty převedeny na proud elektronů. Iontovými detektory jsou např. Faradayova klec, elektronový násobič nebo detektor s konverzní dynodou a fotonásobičem. Pro tuto metodu je důležité udržení vysokého vakua, aby nedocházelo ke kolizím vzniklých iontů v plynné fázi.

Výhodou tohoto detektoru je jeho všestrannost, rychlost i citlivost a umožňuje provedení jak kvantitativní, tak kvalitativní analýzy, včetně určení molekulové hmotnosti.<sup>29</sup>

---

# Experimentální část

## 6 Materiál

### 6.1 Biologický materiál

K experimentu byly použity mikrosomální frakce získané z jaterních tkání potkanů kmene SHR–CRP. Do experimentu bylo zařazeno 27 samců SHR-CRP potkanů, kteří byli chováni za standardních podmínek s volným přístupem k vodě a krmivu. Rozdělení byli do 4 skupin:

- 1.skupina (N = 7) byla krmena standardní laboratorní dietou
- 2.skupina (N = 7) byla krmena standardní laboratorní dietou obsahující mikronizovaný silymarin (1 % v dietě)
- 3.skupina (N = 7) byla krmena standardní laboratorní dietou obohacenou o atorvastatin (5 mg/kg/den)
- 4.skupina (N = 6) byla krmena standardní laboratorní dietou obsahující kombinaci atorvastatinu a silymarinu

Po 4 týdnech byla zvířata dekapitována a tkáně jater byly ihned zmrazeny při  $-70^{\circ}\text{C}$ . Z těchto tkání byly připraveny mikrosomální frakce.

*Všechny procedury byly provedeny v souladu s etickými standardy zákona České republiky č. 359/2012 Sb. o ochraně zvířat a byla schválena etickou komisí MŠMT, Česká republika*

### 6.2 Chemikálie

1'-hydroxymidazolam (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)

6 $\beta$ -hydroxytestosteron (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)

Acetonitril (VWR, Randor, PA, USA)

Atorvastatin, léčivý přípravek Sortis (Pfizer spol s r.o., Praha, Česká republika)

Atorvastatin trihydrát vápenaté soli, (Merck, Darmstadt, Německo)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, Praha, Česká republika)  
Dichlormethan (Penta, Praha, Česká republika)  
Dithioničitan sodný (Merck, Darmstadt, Německo)  
Chlordiazepoxid (Lipomed, Arlesheim, Švýcarsko)  
Chlorid sodný (Lach–Ner, Neratovice, Česká republika)  
Isocitrátdehydrogenasa (IDH; Merck, Darmstadt, Německo)  
Kyselina DL-isocitronová (ISO; Merck, Darmstadt, Německo)  
Kyselina mravenčí (VWR, Randor, PA, USA)  
Kyselina octová (VWR, Randor, PA, USA)  
Methanol (VWR, Randor, PA, USA)  
Midazolam (Chiesi Farmaceutici S.p.A., Parma, Itálie)  
Mikronizovaný silymarin (Favea, Kopřivnice, Česká republika)  
N, N–dimethylamid kyseliny mravenčí (DMF; Lach–Ner, Neratovice, Česká republika)  
Nikotinamidadeninukleotid fosfát (NADP; Merck, Darmstadt, Německo)  
Plynný dusík (Siad Czech spol s.r.o., Praha, Česká republika)  
Plynný oxid uhelnatý (Linde Gas a.s., Mnichov, Německo)  
Silybin (Merck, Darmstadt, Německo)  
Síran hořečnatý (Lach–Ner, Neratovice, Česká republika)  
Standardní laboratorní dieta (Bonagro, Blažovice, Česká republika)  
Testosteron (Merck, Darmstadt, Německo)  
Uhličitan sodný (Lach–Ner, Neratovice, Česká republika)  
Voda pro LC/MS (VWR, Randor, PA, USA)

### **6.3 Přístrojové vybavení a příslušenství**

Analytické váhy, XP 205, (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA)  
Centrifuga Eppendorf Minispin, (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)  
Centrifuga Jouan BR4i, (Thermo Fisher Scientific, Watham, MA, USA)  
Hmotnostní spektrometr LCMS–8045, (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)  
HPLC systém LC–20A Prominence, (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)  
Kolona s reverzní fází C18 Chromolith, monolitická, 100×4,6 mm ID, s předkolonou stejné stacionární fáze, (Merck Darmstadt, Německo)  
Kolona s reverzní fází F5, 50 ×4,6 mm ID, velikost částic 2,6 μm, s předkolonou stejné stacionární fáze, (Phenomenex, Torrance, CA, USA)

Koncentrátor vzorků Termovap, (ECOM spol s.r.o., Chrást'any u Prahy, Česká republika)  
pH metr Five Easy, (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA)  
Software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)  
Software Statistica 12 (TIBCO software, Palo Alto, CA, USA)  
Spektrofotometr UV/Vis Cary 4000, (Varian, Santa Clara, CA, USA)  
Suchá lázeň TS 100, (Biosan, Riga, Litva)  
Vodní lázeň SV1422, (Mettler Toledo, Schwabach, Německo)  
Vortex MS3 basic, (IKA–Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)

## 7 Metody

### 7.1 Stanovení koncentrace cytochromů P450

Koncentrace CYPs v jaterní mikrosomální frakci byla stanovena pomocí UV/Vis spektrofotometrie. Potkaní mikrosomální frakce byla 20x naředěna fosfátovým pufrům (100 mM, pH 7,4) a redukována dithioničitanem sodným. Vzorek byl poté rozdělen do dvou kyvet a umístěn do dvouparskového UV/Vis spektrofotometru, kde byla zaznamenána základní linie („baseline“) v rozsahu 360–500 nm. Kyveta se vzorkem byla poté probublána proudem oxidu uhelnatého po dobu 20 s., aby vznikl komplex CYPs s CO. Koncentrace CYPs byla vypočítána z diferenčního spektra redukovaných CYPs a redukovaných CYPs v komplexu s CO dle rovnice:

$$c_{P450} = \frac{A_{450} - A_{490}}{0,091} \times 20$$

$A_{450}$ ...absorbance při 450 nm

$A_{490}$ ...absorbance při 490 nm

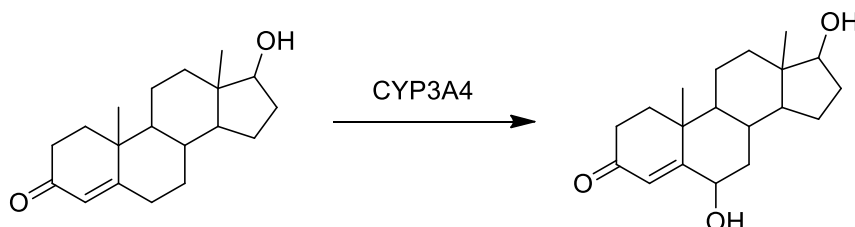
$C_{P450}$ ...koncentrace CYPs

0,091...molární absorpční koeficient CYP [ $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ]

20...ředění

## 7.2 Stanovení aktivity CYP3A *ex vivo*: použitý substrát testosteron

Aktivita CYP3A se může stanovit se substrátem testosteronem, který se tímto enzymem metabolizuje na 6 $\beta$ -hydroxytestosteron (Obr.5.). Principem stanovení aktivity tohoto enzymu je pak měření koncentrace vzniklého metabolitu, v případě této práce pomocí HPLC s UV detekcí.



**Obr. 5:** Hydroxylace testosteronu za účasti CYP3A

Aby reakce fungovala, je zapotřebí dodržet správné složení inkubační směsi a dobu inkubace. Z tohoto důvodu bylo provedeno testovací měření při různých podmínkách (různá inkubační doba a různé množství CYPs ve směsné potkaní mikrosomální frakci). Testováno bylo 25, 50, 100 a 150 pmol CYPs, které byly inkubovány 10, 20, 30 a 40 min. Z testovacího měření bylo zjištěno, že 100 pmol CYPs a 20 min inkubace byly nejvhodnější pro stanovení aktivity CYP3A (s testosteronem jako substrátem) ve směsných mikrosomech získaných z potkanů SHR-CRP. Pokud by se použilo menší množství CYPs a kratší doba inkubace, signály 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu by byly slabší a rozdíly mezi studovanými vzorky by nemusel být výrazný, metoda stanovení by pak nebyla tak citlivá. Naopak při použití většího množství CYPs by se nedosáhlo výraznějších signálů 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu v porovnání se zvoleným množstvím a při delší inkubační době by mohly vznikat další vedlejší produkty, které by mohly ovlivnit stanovení. Na základě testovacího měření byly zvoleny reakční podmínky, které jsou uvedeny v Tab.1

**Tab. 1:** Reakční podmínky pro stanovení aktivity CYP3A v jednom vzorku pomocí testosteronu jako substrátu

Látkové množství CYPs v mikrosomální frakci	100 pmol
Pufr	100mM fosfátový pufr, pH 7,4
NADPH generující systém	0,19 mg NADP <sup>+</sup> , 0,49mg ISO, 50μl 50mM MgSO <sub>4</sub> , 5μl IDH 6U/mg, 100 μl 100mM fosfátový pufr
Inkubace 3 min. při 37 °C	
Substrát	100 μl 500 μM testosteron
Inkubace 20 min. při 37 °C	
STOP roztok	100 μl roztoku obsahující 1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> a 2 M NaCl
Celkový objem reakčního systému	500 μl

Vzorek byl extrahován 2 ml dichlormethanu po dobu 15 s a dále centrifugován při 4 °C, 1620 × g po dobu 5 min. Dále byl odebrán 1 ml spodní organické fáze, která byla odpařena při 40 °C pod proudem dusíku. Odparek byl poté rozpuštěn ve 200 μl mobilní fáze (40 % methanol), napipetován do vialek a analyzován HPLC s UV detekcí.

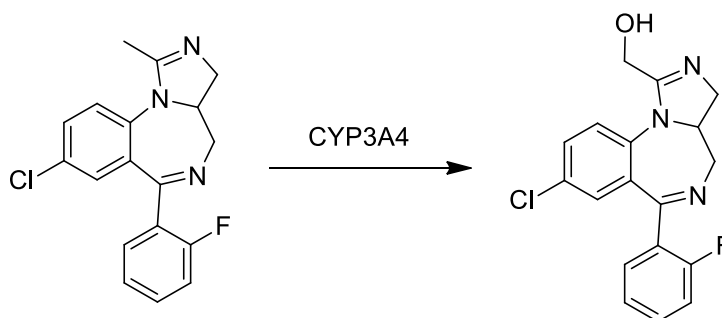
**Tab. 2:** Analytické podmínky pro stanovení 6β-hydroxytestosteronu (metabolitu testosteronu) v jaterní mikrosomální frakci SHR-CRP potkana

Stacionární fáze	Reverzní monolitická fáze C18 100 × 4,6 mm ID
Mobilní fáze	40 % methanol
Rychlost průtoku mobilní fáze	1 ml/min
Eluce	Gradientová 0–11 min 40 % methanol 11–12 min 40–100 % methanol 12–13 min 100 % methanol 13–14 min 100–40 % methanol 14–20 min 40 % methanol
Detekce	UV, 245 nm
Nástřik	25 μl
Teplota kolony	35 °C

Pro stanovení koncentrace metabolitu testosteronu, tedy 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu, byla použita metoda kalibrační křivky, která byla sestrojena jako závislost plochy píku na koncentraci metabolitu. K sestavení kalibrační křivky byly připraveny kalibrační vzorky obsahující 6 $\beta$ -hydroxytestosteron o koncentraci 0,0625; 0,125; 0,25; 1; 4; 7; 10; 13 a 16 nmol/ 500  $\mu$ l reakčního systému. Při přípravě těchto vzorků byl STOP roztok přidáván jako první a místo substrátu byly pipetovány konkrétní koncentrace metabolitu. Kalibrační vzorky byly připraveny stejným způsobem jako testované vzorky. Každá koncentrace byla měřena třikrát.

### 7.3 Stanovení aktivity CYP3A *ex vivo*: použitý substrát midazolam

Aktivitu CYP3A je možné také stanovit jiným substrátem, např. midazolamem. Midazolam se tímto enzymem metabolizuje na 1'-hydroxymidazolam a 4-hydroxymidazolam. Principem stanovení aktivity tohoto enzymu je pak měření koncentrace vzniklého metabolitu, v případě této práce 1'-hydroxymidazolamu (Obr.6) pomocí HPLC s hmotnostní detekcí.



**Obr. 6:** Hydroxylace midazolamu za účasti CYP3A

Aby reakce fungovala, je opět zapotřebí dodržet správné složení inkubační směsi a dobu inkubace. Každý substrát se může vázat do jiného aktivního místa enzymu, proto bylo opět provedeno testovací měření při různých podmínkách. Testováno bylo 5, 10, 15, 20 pmol CYPs, které byly inkubovány 5, 10, 15 a 20 min. Z testovacího měření bylo zjištěno, že 10 pmol CYPs a 15 min inkubace byly nejvhodnější pro stanovení aktivity CYP3A (s midazolamem jako substrátem) ve směsných mikrosomech získaných z potkanů SHR-CRP. Na základě tohoto testovacího měření byly zvoleny reakční podmínky, které jsou uvedeny v Tab. 3.



**Tab. 3:** Reakční podmínky pro stanovení aktivity CYP3A v jednom vzorku pomocí midazolamu jako substrátu

Látkové množství CYPs v mikrosomální frakci	10 pmol
Pufr	100mM fosfátový pufr, pH 7,4
NADPH generující systém	0,0765mg NADP <sup>+</sup> , 0,129mg ISO, 10μl 50mM MgSO <sub>4</sub> , 0,7μl IDH 18U/mg, 9,3 μl pufru
Inkubace 3 min. při 37 °C	
Substrát	9 μl 30,7 μM midazolamu
Inkubace 15 min. při 37 °C	
STOP roztok	500 μl 100 % methanol
Celkový objem reakčního systému	100μl

Po zastavení reakce bylo do vzorku přidáno 20 μl roztoku vnitřního standardu obsahující 5ng chlordiazepoxidu. Vzorek byl vortexován po dobu 10 s, aby došlo k vysrážení všech proteinů, a dále centrifugován při 12105 × g po dobu 10 min. Poté bylo odebráno 150 μl supernatantu do vialek a analyzováno HPLC s hmotnostní detekcí.

**Tab. 4:** Analytické podmínky pro stanovení 1'-hydroxymidazolamu (metabolitu midazolamu) v jaterní mikrosomální frakci SHR-CRP potkana

Stacionární fáze	Reverzní fáze F5, 50 ×4,6 mm ID, 2,6 μm
Mobilní fáze	0,1 % HCOOH ve vodě a 0,1 % HCOOH v acetonitrilu v poměru 70:30
Rychlost průtoku mobilní fáze	0,5 ml/min
Eluce	Izokratická
Detekce	Hmotnostní detekce
MRM pro 1'-hydroxymidazolam	342,10>324,05
MRM pro chlordiazepoxid (i.s.)	300,10>226,90
Nástřík	10 μl
Teplota kolony	40 °C

MRM (Multiple Reaction Monitoring), systém pracuje v režimu trojitého kvadrupólu, kde je detekován prekurzorový i produktový ion; i.s., vnitřní standard.

Pro stanovení koncentrace metabolitu midazolamu, tedy 1'-hydroxymidazolamu, byla použita metoda kalibrační křivky s vnitřním standardem, která byla sestavena jako závislost poměru ploch píků metabolitu a vnitřního standardu na koncentraci metabolitu. K sestavení kalibrační křivky byly připraveny kalibrační vzorky obsahující 1'-hydroxymidazolam o koncentraci 10, 20, 50, 100 a 200 pmol/ 100 µl reakčního systému. STOP roztok byl přidáván jako první a místo substrátu byly pipetovány konkrétní koncentrace metabolitu. Následně bylo přidáno 20 µl roztoku vnitřního standardu obsahující 5 ng chlórdiazepoxidu a další příprava vzorků probíhala stejným způsobem jako u testovaných vzorků. Každá koncentrace byla měřena třikrát.

#### **7.4 Stanovení aktivity CYP3A *in vitro***

Pro porovnání byla také proměřena aktivita CYP3A *in vitro* s použitím jaterní mikrosomální frakce jednoho z SHR–CRP potkanů kontrolní skupiny. Pro toto stanovení byl použit standard atorvastatinu nebo silybinu (hlavní složka silymarinu) jako inhibitor CYP3A a midazolam jako substrát CYP3A. Tyto standardy byly rozpuštěny v 10% DMF. Inkubované vzorky obsahovaly tyto látky o koncentracích 0, 10, 25, 50, 75, 100, 150 a 200 µM a obsah rozpouštědla DMF ve vzorku nepřevýšil 1,2 %. Inkubační reakce probíhala stejným způsobem a za stejných podmínek jako u testovaných vzorků při stanovení aktivity CYP3A *ex vivo* s použitím midazolamu, jak je znázorněno v Tab.5. Stejně tak analytické podmínky byly stejné jako u měření 1'-hydroxymidazolamu (Tab.4).

**Tab. 5:** Reakční podmínky pro stanovení aktivity CYP3A *in vitro* v jednom vzorku s použitím inhibitorů

Potřebné množství CYPs v mikrosomální frakci	10 pmol
Pufr	100mM fosfátový pufr, pH 7,4
Inhibitor (následně přidáván o různých koncentracích)	1,65 mM atorvastatin nebo 1,67 mM silybin
NADPH generující systém	0,0765 mg NADP <sup>+</sup> , 0,129 mg ISO, 10 µl 50 mM MgSO <sub>4</sub> , 0,7 µl IDH 18 U/mg, 9,3 µl pufr
Inkubace 20 min. při 37 °C	
Substrát	9 µl 30,7 µM midazolam
Inkubace 15 min. při 37 °C	
STOP roztok	500 µl 100 % methanol
Celkový objem reakčního systému	100 µl

## 8 Výsledky

### 8.1 Stanovení koncentrace cytochromů P450

V jaterní mikrosomální frakci jednotlivých potkanů byla změřena a vypočítána koncentrace CYPs pomocí Lambert–Beerova zákona. Na základě této koncentrace byl vypočítán přesný objem jaterní mikrosomální frakce potřebný do reakční směsi.

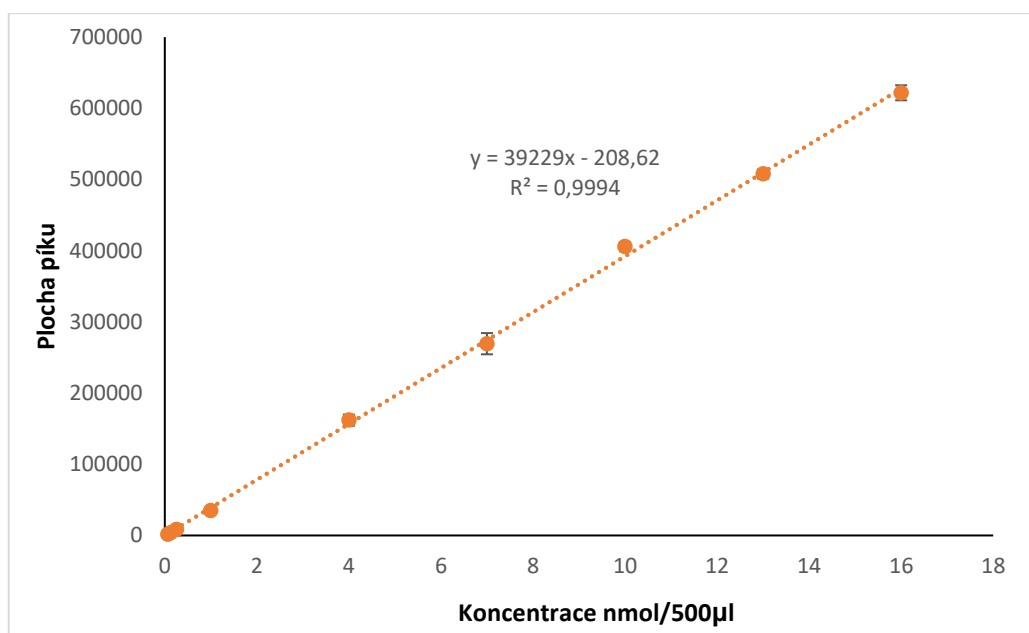
**Tab. 6:** Hodnoty naměřených koncentrací CYPs v jednotlivých vzorcích jaterních mikrosomálních frakcí u potkanů krmených standardní laboratorní dietou, dietou obohacenou o silymarin (1 % v dietě), o atorvastatin (5mg/kg/den) nebo kombinaci obou látek.

Dieta				
Koncentrace CYPs ( $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )	Kontrolní	Silymarin	Atorvastatin	Kombinace
	8,10	12,76	16,58	16,49
	9,04	13,73	14,84	12,99
	11,24	11,47	17,81	17,52
	15,34	14,14	11,66	13,29
	9,77	17,33	19,74	20,71
	9,63	17,64	13,99	15,77
	7,63	22,11	13,44	–

### 8.2 Stanovení aktivity CYP3A *ex vivo*: použitý substrát testosteron

#### 8.2.1 Kalibrace HPLC/UV metody pro stanovení 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu

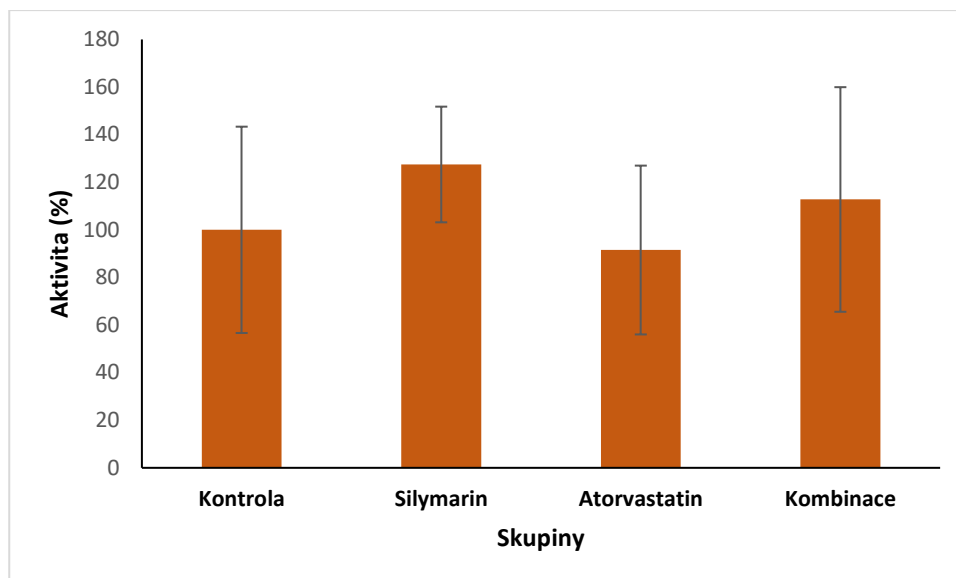
Metoda pro stanovení aktivity CYP3A s použitím substrátu testosteronu byla kalibrována pomocí standardu 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu. Kalibrace byla provedena na těchto kalibračních úrovních: 0,0625; 0,125; 0,25; 1; 4; 7; 10; 13; 16 nmol 500  $\mu\text{l}$  v reakční směsi. Kalibrační křivka je znázorněna na Obr.7., kde každý bod je průměrem tří měřených vzorků.



**Obr. 7:** Kalibrační křivka pro HPLC/UV stanovení 6β–hydroxytestosteronu. Data představují průměr ± SD; N= 3.

### 8.2.2 Stanovení aktivity CYP3A ve vzorcích

Výsledky ukazují, že aktivita CYP3A stanovená pomocí substrátu testosteronu byla mírně zvýšená u potkanů krmených dietou obsahující silymarin (zvýšení o 27,5 %) a kombinaci silymarinu a atorvastatinu (zvýšení o 12,8 %) v porovnání s aktivitou kontrolních potkanů. Aktivita CYP3A u skupiny potkanů krmených dietou s atorvastatinem byla mírně snížena o 8,5 % ve srovnání s aktivitou u potkanů na kontrolní dietě (Obr. 8). Data jednotlivých skupin byla statisticky analyzována neparametrickým Kruskal–Wallisovým testem (pomocí softwaru Statistica 12), který porovnává všechny skupiny mezi sebou. Statistická analýza byla provedena na hladině významnosti 0,05. Touto analýzou bylo zjištěno, že všechny výše zmíněné změny jsou statisticky nevýznamné, což je dáno interindividuální variabilitou mezi potkany. Vzorky byly měřeny za stejných podmínek jako kalibrační křivka.

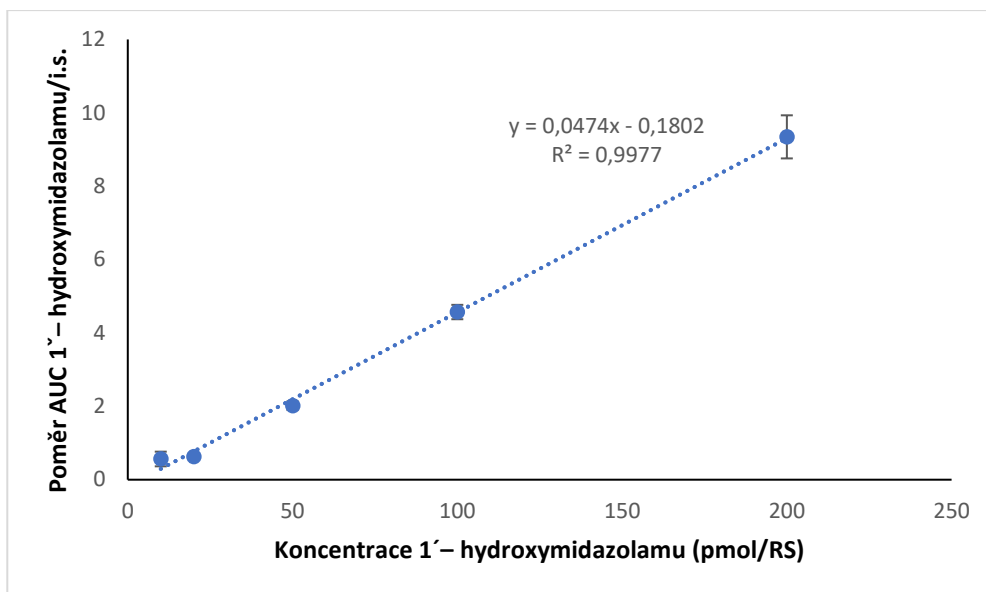


**Obr. 8:** Stanovení aktivity CYP3A u potkanů krmených standardní laboratorní dietou, dietou obohacenou o silymarin (1 % v dietě) nebo o atorvastatin (5mg/kg/den) nebo kombinaci obou látek. Jako substrát při stanovení byl použit testosteron. Data jsou zobrazena jako průměr ± SD; N ≥ 6.

### 8.3 Stanovení aktivity CYP3A *ex vivo*: použitý substrát midazolam

#### 8.3.1 Kalibrace metody LC/MS pro stanovení 1'-hydroxymidazolamu

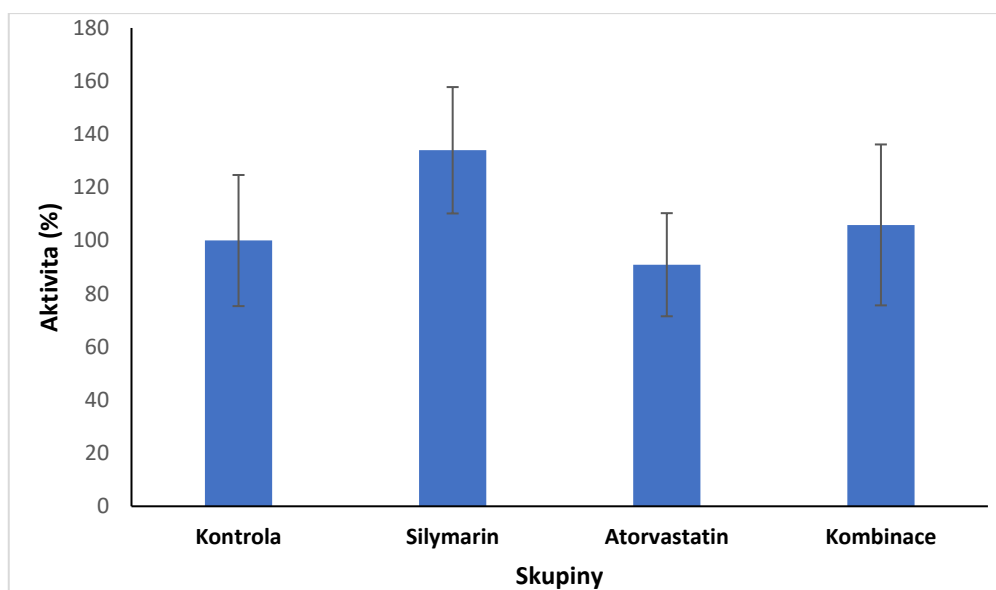
Metoda pro stanovení aktivity CYP3A s použitím substrátu midazolamu byla kalibrována pomocí standardu 1'-hydroxymidazolamu. Kalibrace byla provedena na těchto kalibračních úrovních: 10; 20; 50; 100; 200 pmol v 100 µl reakční směsi. Kalibrační křivka je znázorněna na Obr.9., kde každý bod je průměrem tří měřených vzorků.



**Obr. 9:** Kalibrační křivka pro LC/MS stanovení 1'-hydroxymidazolamu. Data představují průměr  $\pm$  SD; N= 3; i.s., vnitřní standard

### 8.3.2 Stanovení aktivity CYP3A ve vzorcích

Výsledky ukazují, že aktivita CYP3A stanovená pomocí substrátu midazolamu byla zvýšená u potkanů krměných dietou obsahující silymarin (zvýšení o 34 %) a kombinaci atorvastatinu a silymarinu (zvýšení o 5,9 %) v porovnání s kontrolní skupinou potkanů. Naopak u skupiny potkanů krměných dietou obsahující atorvastatin samotný došlo k mírnému snížení aktivity o 9,1 % v porovnání se skupinou potkanů na kontrolní dietě (Obr. 10). Data jednotlivých skupin byla statisticky analyzována neparametrickým Kruskal–Wallisovým testem (pomocí softwaru Statistica 12) na hladině významnosti 0,05. Bylo zjištěno, že všechny tyto změny jsou však statisticky nevýznamné, což je opět dáno interindividuální variabilitou mezi potkany. Vzorky byly měřeny za stejných podmínek jako kalibrační křivka.



**Obr. 10:** Stanovení aktivity CYP3A u potkanů krmených standardní laboratorní dietou, dietou obohacenou o silymarin (1 % v dietě) nebo o atorvastatin (5mg/kg/den) nebo kombinaci obou látek. Jako substrát při stanovení byl použit midazolam. Data jsou zobrazena jako průměr  $\pm$  SD;  $N \geq 6$ .

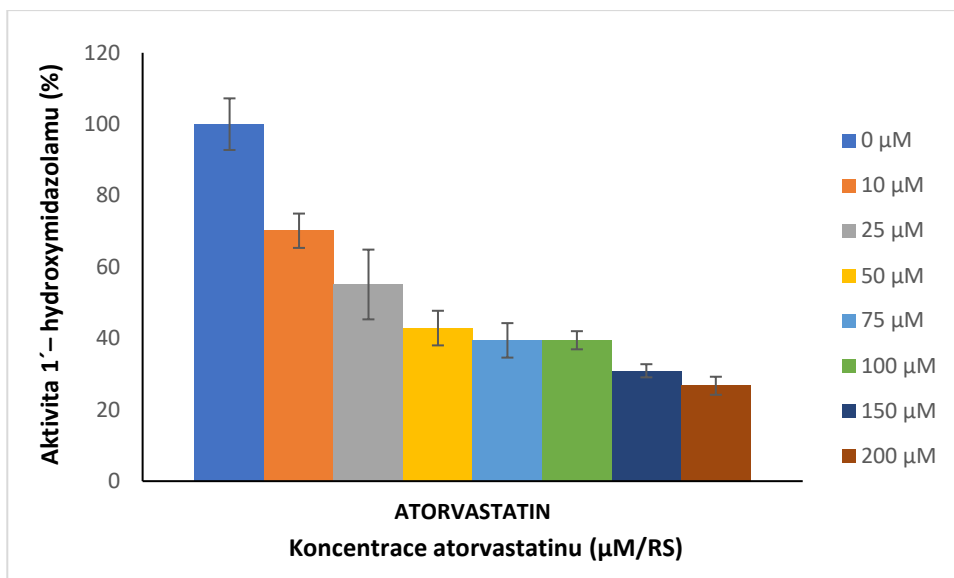
## 8.4 Stanovení aktivity CYP *in vitro*

Aby byla ověřena teorie, že atorvastatin i silybin (jako hlavní účinná látka silymarinu) jsou inhibitory CYP3A,<sup>25, 32</sup> bylo provedeno také stanovení inhibice CYP3A *in vitro* s použitím těchto inhibitorů a jaterní mikrosomální frakce z SHR–CRP potkanů kontrolní skupiny. Pro stanovení byly použity koncentrace inhibitoru 0; 10; 25; 50; 75; 100; 150 a 200  $\mu\text{M}$ . Oba standardy byly rozpuštěny v 10 % DMF, přičemž obsah rozpouštědla DMF ve vzorku byl maximálně 1,2 %. Všechny vzorky byly měřeny ve třech sériích. Pro ověření, zda samotné rozpouštědlo neinhibuje CYP3A, bylo provedeno také kontrolní měření, kde místo inhibitoru bylo použito jen rozpouštědlo DMF. Toto kontrolní stanovení prokázalo, že DMF v použitých koncentracích nemá na aktivitu enzymu CYP3A vliv.

### 8.4.1 Inhibice CYP3A atorvastatinem

Výsledky ukazují, že atorvastatin je inhibitorem CYP3A, jak je zobrazeno na Obr.11. Analýzou dat v programu GraphPad Prism 8 byla stanovena hodnota  $\text{IC}_{50} = 17,35\mu\text{M}$

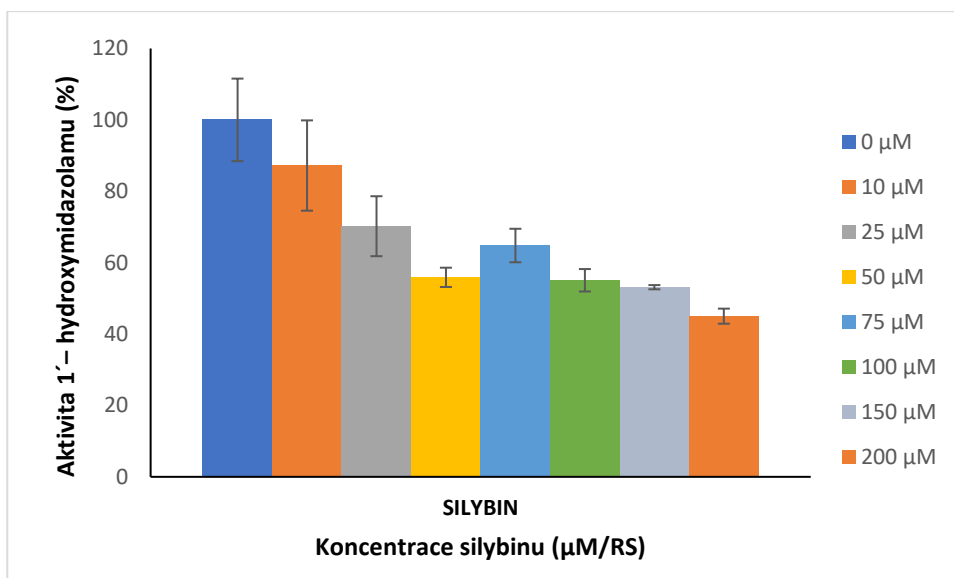




**Obr. 11:** Inhibice aktivity CYP3A *in vitro* atorvastatinem. Aktivita měřena v jaterní mikrosomální frakci SHR–CRP potkana s přidáním substrátu midazolamem. Data jsou zobrazena jako průměr ± SD; N = 3.

#### 8.4.2 Inhibice CYP3A silybinem

Výsledky ukazují, že silybin je inhibítozem CYP3A, jak je zobrazeno na Obr.12. Analýzou dat v programu GraphPad Prism 8 byla stanovena hodnota  $IC_{50} = 29,47\mu M$



**Obr. 12:** Inhibice aktivity CYP3A *in vitro* silybinem. Aktivita měřena v jaterní mikrosomální frakci SHR–CRP potkana s přidáním substrátu midazolamem. Data jsou zobrazena jako průměr ± SD; N = 3.

---

## Diskuze

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo studium aktivity cytochromu P450 3A po konzumaci diety obohacené o atorvastatin, silymarin nebo jejich kombinaci. Atorvastatin je hypolipidemikum, který může působit jako inhibitor CYP3A4, kterým je také metabolizován. Užívají ho především pacienti trpící hypercholesterolemií a hyperlipoproteinemií.<sup>17</sup> Silymarin, jehož hlavní složkou je silybin, může rovněž působit jako inhibitor CYP3A4. Je součástí léčivého přípravku Legalon a doplňků stravy, které lidé užívají při obtížích s játry a trávicím traktem.<sup>22, 25</sup>

Z výsledků by se mohlo zdát, že silymarin (jak samotný, tak i v kombinaci s atorvastatinem) zvyšuje aktivitu CYP3A (při měření pomocí substrátu testosteronu o 27,5 %, resp. o 12,8 %, a při použití substrátu midazolamu o 34 %, resp. o 5,9 %). Ovšem tyto změny nejsou statisticky významné. Jak lze i vidět z grafů, velkou roli sehrávají velké směrodatné odchylky, které jsou dány interindividuální variabilitou potkanů a malým počtem jedinců, na kterých byla studie provedena. Stanovení aktivity CYP3A *ex vivo* neodpovídá realitě, protože při získání mikrosomální frakce není substrát/inhibitor přítomen. Při tomto stanovení ale můžeme zjistit, zda studovaná látka ovlivňuje např. expresi proteinu. V takovém případě by byla stanovena i změna aktivity enzymu. Vzhledem k tomu, že stanovením aktivity CYP3A *ex vivo* nebyly zjištěny změny u potkanů na experimentální dietě v porovnání na kontrolními potkany, dalo by se říci, že experimentální dieta, obsahující silymarin, atorvastatin, nebo jejich kombinace nemá výrazný vliv na expresi CYP3A u SHR–CRP potkanů.

Pro ověření, zda studované látky skutečně mají vliv na aktivitu CYP3A, byla provedena studie *in vitro*. Bylo zjištěno, že silybin (hlavní účinná látka silymarinu) i atorvastatin mají mírný inhibiční vliv na aktivitu CYP3A. Byly vypočítány hodnoty  $IC_{50}$ , které nám udávají koncentraci látky inhibující enzym *in vitro* o 50 %. Pro atorvastatin byla hodnota  $IC_{50} = 17,35\mu M$  a pro silybin  $IC_{50} = 29,47\mu M$ . Z výsledků tedy můžeme usoudit, že atorvastatin i silybin inhibují aktivitu CYP3A. Tato inhibice však může být dána jen obsazením látky do aktivního místa enzymu (jako substrátu), a může tak zabránit navázání další látky. V takovém případě by se jednalo o reverzibilní kompetitivní inhibici. Aby se taková inhibice prokázala, bylo by zapotřebí dalších

měření. Nicméně, tato tvrzení již prokázaly předchozí studie,<sup>25, 32</sup> kde autoři popisují kompetitivní inhibici atorvastatinem a silybinem. Pokud by látky byly podávány současně, mohlo by dojít ke kompetitivní inhibici a ovlivnění metabolismu těchto látek.

Avšak musí být zváženy i další aspekty metabolismu těchto látek. Bylo zjištěno, že při orálním podání 700 mg silymarinu byla maximální plazmatická koncentrace silybinu 0,6  $\mu\text{M}$  a akumulace v plazmě během tří dávek denně byla zanedbatelná.<sup>33</sup> Poločas eliminace silybinu je 6 – 8 hodin.<sup>34</sup> Co se týče atorvastatinu, maximální plazmatická koncentrace při jednorázovém i opakovaném podání 40 mg tohoto léčiva dosahuje 12,7–27,1 ng/ml a poločas eliminace se pohybuje okolo 14 hodin.<sup>17</sup>

Srovnáním hodnot plazmatických koncentrací s naměřenými hodnotami  $\text{IC}_{50}$  *in vitro* je patrné, že obě látky v běžně užívaných množstvích nedosahují koncentrací, které by mohly ohrozit jejich uživatele nebo metabolismus dalších látek, zprostředkovaný CYP3A. Při současném užívání obou látek by nemělo docházet k výraznějšímu ovlivnění metabolismu pomocí CYP3A. Interakce těchto dvou studovaných látek nejsou tedy klinicky významné a toto tvrzení by potvrdily další *in vivo* studie.

---

## Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá metabolismem pomocí cytochromů P450, konkrétně formy 3A a jeho ovlivněním dietou obohacenou o atorvastatin, silymarin nebo jejich kombinaci u experimentálních zvířat s metabolickým syndromem. Aktivita tohoto enzymu byla měřena *ex vivo* v jaterních mikrosomálních frakcích potkanů, kteří byli rozděleni do skupin podle druhu diety. Toto stanovení bylo porovnáno se stanovením aktivity CYP3A *in vitro*. Tato práce ukazuje, že kombinovaná dieta nemá zásadní vliv na aktivitu CYP3A. Interakce atorvastatinu a složek obsažených v silymarinu nejsou pravděpodobně klinicky významné a současné užívání obou látek by mělo být bezpečné.

---

## Citovaná literatura

- (1) Dostálek, M. *Farmakokinetika*, 1. vydání.; Grada: Praha, 2006; p.110-113 .
- (2) Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2001, vol. 58 (issue 5), 737-747.
- (3) Martignoni, M.; Groothuis, G.; de Kanter, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2006, vol. 2 (issue 6), 875-894.
- (4) Stiborová, M.; Hudeček, J.; Hodek, P.; Frei, E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy* 1999, Roč. 93 (č. 4), 229-237.
- (5) Kousalova, L.; Baranova, J.; Anzenbacher, P. Lekove interakce na urovni cytochromu P450 - Cast I. Interakce na urovni CYP3A4. *Clinical Pharmacology and Pharmacy* 2003, 17 (3), 151-157.
- (6) Nebert, D.; Russell, D. Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet* 2002, vol. 360 (issue 9340), 1155-1162.
- (7) Guengerich, F. Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2007, vol. 21 (issue 4), 163-168.
- (8) Hrycay, E.; Bandiera, S., eds. *Monoxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450*, 1 ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2015; p.8-10.
- (9) Meunier, B.; de Visser, S.; Shaik, S. Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chemical Reviews* 2004, vol. 104 (issue 9), 3947-3980.

- (10) Zanger, U.; Schwab, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* 2013, vol. 138 (issue 1), 103-141.
- (11) Ekroos, M.; Sjogren, T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, vol. 103 (issue 37), 13682-13687.
- (12) Duvnjak, L.; Duvnjak, M. The metabolic syndrome—An ongoing story. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society* 2009, 60 Suppl 7, 19-24.
- (13) Rybka, J. *Diabetes mellitus - komplikace a přidružená onemocnění: diagnostické a léčebné postupy*; Grada: Praha, 2007; p.177-180, 200-201.
- (14) World Health Organization: Cardiovascular diseases  
[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (accessed 2020-06-10).
- (15) Okamoto, K.; Aoki, K. Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. *Japanese Circulation Journal* 1963, vol. 27 (issue 3), 282-293.
- (16) Pravenec, M.; Kajiya, T.; Zídek, V.; Landa, V.; Mlejnek, P.; Šimáková, M.; Šilhavý, J.; Malínská, H.; Oliyarnyk, O.; Kazdová, L.; Fan, J.; Wang, J.; Kurtz, T. Effects of Human C-Reactive Protein on Pathogenesis of Features of the Metabolic Syndrome. *Hypertension* 2011, vol. 57 (issue 4), 731-737.
- (17) Češka, R.; Urbánek, K. Atorvastatinum. *Remedia* 2004, 14 (2), 110-120.
- (18) Pitha, J. Atorvastatin: citius, altius, fortius?: citius, altius, fortius?. *Internal Medicine for Practice* 2007, 8 (12), 545-547.
- (19) Souhrn údajů o přípravku: Atorvastatin +pharma  
<http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC155464.pdf&type=spc&as=atorvastatin-pharma-spc> (accessed 2020-04-15).
- (20) Hukkanen, J.; Puurunen, J.; Hyötyläinen, T.; Savolainen, M.; Ruokonen, A.; Morin-Papunen, L.; Orešič, M.; Piltonen, T.; Tapanainen, J. The effect of atorvastatin treatment on serum oxysterol concentrations and cytochrome P450 3A4 activity. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2015, vol. 80 (issue 3),
- (21) AISLP – Automatizovaný informační systém léčivých přípravků  
<https://www.aislp.cz/> (accessed 2020-06-10).

- (22) Kren, V.; Walterova, D. Silybin and silymarin - new effects and applications. *Biomedical Papers* 2005, vol. 149 (issue 1), 29-41.
- (23) Poruba, M.; Matušková, Z.; Kazdová, L.; Oliyarnyk, O.; Malínská, H.; Tozzi di Angelo, I.; Večeřa, R. Positive effects of different drug forms of silybin in the treatment of metabolic syndrome. *Physiological research* 2015, vol. 64 (Suppl 4), 512.
- (24) Xie, .; Zhang, .; Zhang, .; Yuan, . Metabolism, Transport and Drug–Drug Interactions of Silymarin. *Molecules* 2019, vol. 24 (issue 20).
- (25) Jančová, P.; Anzenbacherová, E.; Papoušková, B.; Lemr, K.; Lužná, P.; Veinlichová, A.; Anzenbacher, P.; Šimánek, V. Silybin Is Metabolized by Cytochrome P450 2C8 in Vitro. *Drug Metabolism and Disposition* 2007, vol. 35 (issue 11), 2035-2039.
- (26) Zuber, R.; Modrianský, M.; Dvořák, Z.; Rohovský, P.; Ulrichová, J.; Šimánek, V.; Anzenbacher, P. Effect of Silybin and its congeners on human liver microsomal cytochrome P450 activities. *Phytotherapy Research* 2002, vol. 16 (issue 7), 632-638.
- (27) Skottová, N.; Krecman, V. Silymarin as a potential hypocholesterolemic drug. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 1998, 47, 1-7.
- (28) Souhrn údajů o přípravku: Legalon  
<http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC128320.pdf&type=spc&as=legalon-140-spc> (accessed 2020-06-11).
- (29) Klouda, P. *Moderní analytické metody*, 2., upr. a dopl. vyd.; Pavel Klouda: Ostrava, 2003; p.25-31, 50-52, 77-80.
- (30) Volka, K. *Analytická chemie*, Vyd. 1.; Vysoká škola chemicko-technologická: Praha, 1995
- (31) Štulík, K. *Analytické separační metody*, 1. vyd.; Karolinum: Praha, 2004; p.136-170.
- (32) Mc Donnell, C.; Shorten, G.; Van Pelt, F. Effect of atorvastatin and fluvastatin on the metabolism of midazolam by cytochrome P450 in vitro. *Anaesthesia* 2005, vol. 60 (issue 8), 747-753.
- (33) Beckmann-Knopp, S.; Rietbrock, S.; Weyhenmeyer, R.; Bocker, R.; Beckurts, K.; Lang, W.; Hunz, M.; Fuhr, U. Inhibitory Effects of Silibinin on Cytochrome

P-450 Enzymes in Human Liver Microsomes. *Pharmacology and Toxicology* 2000, vol. 86 (issue 6), 250-256.

- (34) Fraschini, F.; Demartini, G.; Esposti, D. Pharmacology of Silymarin. *Clinical Drug Investigation* 2002, vol. 22 (issue 1), 51-65.