

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
Katedra organické chemie

**Vliv účinných látek obsažených v doplňcích stravy na jaterní  
cytochromy P450**

*Diplomová práce*

Autor:	Bc. Adéla Moudrá
Studijní program:	N1407
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, 27. 04. 2017

.....

Podpis

### **Poděkování**

Velice ráda bych poděkovala vedoucí své diplomové práce, Doc. RNDr. Evě Anzenbacherové, CSc. za odborné vedení, poskytnuté rady a zkušenosti, ochotu a pomoc při práci. Také bych ráda poděkovala prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc. za možnost zpracovávat tuto diplomovou práci na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty UP. Mé poděkování také patří Mgr. Veronice Tománkové a Mgr. Lence Jourové za přátelský přístup a pomoc při experimentální práci a všem členům ULCHB za vstřícnost.

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: Adéla Moudrá

Název práce: Vliv účinných látek obsažených v doplňcích stravy na jaterní cytochromy P450

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Ústav lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty UP

Školitel: Doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.

Rok obhajoby práce: 2017

Abstrakt:

Doplňky stravy a různé bylinné přípravky jsou stejně jako léčiva pro organismus cizorodými látkami a jsou metabolizovány obdobnými metabolickými cestami za účasti stejných enzymů. Mohou tak vznikat nežádoucí lékové interakce na úrovni metabolismu, které by mohly negativním způsobem ovlivňovat léčbu a zdraví pacienta. Za nejvýznamnější enzymy I. fáze metabolismu xenobiotik jsou považovány cytochromy P450 (CYP) vyskytující se především v játrech.

Zlatobýl obecný se již staletí používá v tradičních medicínách k terapii močových cest a zánětlivých onemocnění a je stále více využíván jako součást různých doplňků stravy a čajů. Stejně tak je oblíbená brusnice borůvka přidávaná často k doplňkům stravy na podporu léčby diabetu a při průjmech.

V této práci se věnuji vlivu vybraných účinných látek z doplňků stravy na jaterní cytochromy P450 s využitím specifických substrátů pro jednotlivé formy CYP, které mají zásadní vliv na metabolismus většiny běžně užívaných léčiv. Vzorek brusnice borůvky inhiboval enzymy CYP v mírném až středním rozsahu (CYP2C9/2C18 až 61 % původní aktivity). Ze získaných výsledků lze usuzovat, že užívání zlatobýlu obecného nebo brusnice borůvky signifikantně neovlivňuje metabolismus současně podávaných léčiv za účasti studovaných CYP.

Klíčová slova: CYP, zlatobýl obecný, brusnice borůvka, HPLC, anthokyany, leiokarposid.

Počet stran: 65

Jazyk: Čeština

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Adéla Moudrá  
Title: Effect of active substances present in food supplements on hepatic cytochromes P450  
Type of thesis: Master thesis  
Department: Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of medicine and dentistry  
Advisor: Doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.  
The year of presentation: 2017  
Abstract:

Dietary supplements and the others herbal medicines are xenobiotics for organism as well as the drugs and they are metabolized by, in similar metabolizing ways with the same enzymes. It can be formed by undesirable drug interactions which can negatively influence the therapy and health of patients. Cytochromes P450 (CYP) are considered as one of the most significant enzymes in the first phase of the metabolism of xenobiotics and they are found especially in the liver.

*Solidago virgaurea* has been used in traditional medicine for centuries for the treatment of the urinary tract and inflammatory diseases and it is being used as an ingredient in dietary supplements and teas more and more. Bilberry is popular for using in dietary supplements as well, especially in support of the treatment of diabetes and for treatment of diarrhea.

In this thesis I focus on the effect of active substances of dietary supplements on the liver CYPs with the use of specific substrates of each types of CYPs which have a crucial effect on the metabolism of most commonly used drugs. A sample of bilberry inhibited CYP enzymes in low to medium range (CYP2C9/2C18 up to 61 % of original activity). From the obtained results we can assume, that the use of *solidago virgaurea* or bilberry do not have an influence on the metabolism of the concurrent use of drugs with presence of studied CYP enzymes.

Keywords: CYPs, *solidago virgaurea*, bilberry, HPLC, anthocyanins, leiocarposide.

Number of pages: 65

Language: Czech

### **Seznam použitých zkratek**

**ACN** – acetonitril  
**Ara** – arabinosid  
**BCA** – bicinchoninová kyselina  
**CYP** – cytochromy P450  
**Del** - delphinidin  
**EDTA** – ethylendiamintetraoctová kyselina  
**FMO** – flavinmonooxygenázy  
**Gala** - galaktosid  
**Glu** - glukosid  
**HPLC** – vysokoúčinná kapalinová chromatografie  
**IDH** – isocitrátdehydrogenáza  
**ISO** – isocitrát  
**Ky** - kyanidin  
**Malv** - malvidin  
**MAO** – monoaminoxigenázy  
**MeOH** – methanol  
**MF** – mobilní fáze  
**MS** – mikrosomy  
**NADPH** – nikotinamid adenin dinukleotid fosfát  
**NAT** – N-acetyltransferázy  
**P-E homogenizátor** – homogenizátor podle Pottera a Elvehjema  
**PAU** – polycyklické aromatické uhlovodíky  
**Peo** - peonidin  
**Pet** - petundin  
**PMSF** – fenylmethylsulfonylfluorid  
**ST** – sulfotransferáza  
**TCCD** – 2,3,7,8,-tetrachloro-dibenzodioxin

**Tris** –

tris(hydroxymethyl)aminomethan

**UC zkumavka** – ultracentrifugační zkumavka

**UDP** – uridindifosfát

**UGT** – UDP-glukoronosyltransferázy

**ULCHB** – Ústav lékařské chemie a biochemie

**UV-VIS** – ultrafialovo-viditelná oblast spektra

## Obsah

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	10
2.1	Doplňky stravy.....	10
2.1.1	Zlatobýl obecný .....	10
2.1.1.1	Obsahové látky .....	10
2.1.1.2	Účinky a použití .....	11
2.1.2	Brusnice borůvka .....	13
2.1.2.1	Obsahové látky .....	14
2.1.2.2	Účinky a použití .....	14
2.2	Metabolické přeměny xenobiotik .....	15
2.2.1	Cytochromy P450 (CYP).....	17
2.2.1.1	Historický vývoj .....	17
2.2.1.2	Nomenklatura CYP .....	18
2.2.1.3	Struktura CYP .....	19
2.2.1.4	Mechanismus enzymatické reakce za účasti CYP.....	19
2.2.1.5	Důležité formy lidských cytochromů P450.....	20
2.2.1.5.1	CYP1A2 .....	20
2.2.1.5.2	CYP2A6.....	21
2.2.1.5.3	CYP2C9 .....	22
2.2.1.5.4	CYP2D6.....	22
2.2.1.5.5	CYP3A4.....	23
2.2.2	Lékové interakce.....	23
3	CÍLE PRÁCE.....	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	26
4.1	Materiál.....	26
4.1.1	Mikrosomy.....	26
4.1.2	Primární kultury lidských hepatocytů.....	26
4.1.3	Použité přírodní látky, doplňky stravy.....	26
4.1.4	Chemikálie .....	27
4.2	Přístrojové vybavení .....	27
4.3	Metody .....	29
4.3.1	Izolace mikrosomální frakce z lidských jater .....	29
4.3.2	Stanovení celkové koncentrace proteinu v mikrosomální frakci.....	30
4.3.3	Stanovení celkové koncentrace CYP v mikrosomální frakci jater .....	30
4.3.4	Příprava vzorků přírodních látek pro měření jejich vlivu na jaterní CYP	30
4.3.4.1	Příprava roztoku extraktu, odvaru a výluhu zlatobýlu obecného .....	30
4.3.4.2	Příprava roztoku z plodů brusnice borůvky.....	31
4.3.5	HPLC stanovení koncentrace leiokarposidu v extraktu, odvaru a výluhu ze zlatobýlu obecného .....	31
4.3.6	Spektrofotometrické stanovení celkových anthokyanů v roztoku plodů brusnice borůvky.....	32
4.3.7	Stanovení anthokyanů v plodech brusnice borůvky s využitím HPLC ....	32
4.3.8	Stanovení vlivu vybraných přírodních látek na aktivitu jaterních mikrosomálních CYP.....	34
4.3.8.1	Vliv účinných látek v extraktu ze zlatobýlu obecného na aktivity CYP .....	34

4.3.8.1.1	Stanovení aktivity CYP1A2.....	35
4.3.8.1.2	Stanovení aktivity CYP2A6.....	35
4.3.8.1.3	Stanovení aktivity CYP2C9.....	38
4.3.8.1.4	Stanovení aktivity CYP2D6.....	38
4.3.8.1.5	Stanovení aktivity CYP3A4.....	39
4.3.8.2	Vliv účinných látek v plodech brusnice borůvky na aktivity CYP ...	39
5	VÝSLEDKY .....	41
5.1	Charakterizace mikrosomální frakce lidského jaterního homogenátu.....	41
5.2	Charakterizace roztoku extraktu zlatobýlu obecného.....	41
5.3	Charakterizace roztoku z plodů brusnice borůvky .....	43
5.3.1	Stanovení celkového obsahu monomerních anthokyanů spektrofotometricky .....	43
5.3.2	Stanovení anthokyanů v roztoku z plodů brusnice borůvky pomocí HPLC .....	43
5.4	Stanovení vlivu vybraných doplňků stravy na jaterní cytochromy P450 pomocí markerových substrátů .....	48
5.4.1	Stanovení vlivu extraktu ze zlatobýlu obecného na jaterní cytochromy P450 v mikrosomální frakci a v primárních kulturách lidských hepatocytů .....	48
5.4.2	Stanovení vlivu roztoku plodů brusnice borůvky na aktivitu jaterních cytochromů P450 .....	52
6	DISKUZE .....	55
7	ZÁVĚR .....	59
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	61



# 1 ÚVOD

Doplňky stravy a různé bylinné přípravky se stávají stále více oblíbeným způsobem, jak se člověk snaží prospět svému organismu a zdraví. Prodej těchto přípravků ovšem není nijak regulován, a má k nim tedy přístup každý. Problémem je, že účinné látky z doplňků stravy i z bylin jsou pro náš organismus xenobiotiky stejně jako např. léčiva, a jsou tedy metabolizovány obdobnými metabolickými cestami za účasti stejných enzymů. Současná konzumace léčiva s některými přírodními produkty pak může vyvolat nežádoucí lékové interakce na úrovni metabolismu a zkomplikovat tak léčbu daného pacienta vyvoláním nepříjemných nežádoucích účinků, nebo dokonce naprostým selháním dané terapie.

První rostlinou, kterou jsem se zabývala v diplomové práci, je extrakt ze zlatobýlu obecného s hlavní účinnou látkou leiokarposidem. Zlatobýl obecný je vytrvalá bylina, která se v lidovém lékařství využívá zejména k léčbě močových cest a zánětlivých onemocnění. Jeho příznivé účinky na lidský organismus byly hojně studovány. V současné době je prodáván ve formě bylinných čajů a je přidáván do doplňků stravy pro zdraví močových cest.

Dalším studovaným přírodním produktem byly plody brusnice borůvky, které obsahují velké množství anthokyanů. Plody jsou hojně konzumovány v nejrůznějších úpravách a už od pradávna využívány k léčbě průjmů a při diabetu jako podpůrné antidiabetikum. Kromě plodů je v lidovém lékařství využíváno i listů brusnice borůvky.

Vzhledem k výše uvedeným okolnostem se v rámci své diplomové práce věnuji vlivu těchto vybraných účinných látek na jaterní cytochromy P450, které jsou považovány za nejvýznamnější biotransformační enzymy I. fáze metabolismu xenobiotik. Ke studiu vlivu na tyto enzymy bylo využito modelových léčiv, specificky přeměňovaných určitým cytochromem P450 na specifický produkt.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 DOPLŇKY STRAVY

Podle zákona České republiky (Zákon o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů 110/1997 Sb. (1)) se doplňkem stravy rozumí potravinu, jejímž účelem je doplňovat běžnou stravu, a která je koncentrovaným zdrojem vitaminů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, obsažených v potravině samostatně nebo v kombinaci, určená k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích. Z biochemického pohledu jsou většinou doplňky stravy, stejně jako např. léčiva, pro organismus látky cizorodé (tzv. xenobiotika) a měly by být z těla vyloučeny (2,3).

Z obecného pohledu můžeme xenobiotika rozdělit na přírodní látky, které mají původ v jiných živých organismech (přírodní barviva, alkaloidy, polyfenoly, atd.) a látky uměle vyrobené (průmyslové kontaminanty, pesticidy, aditiva v potravinách, farmaka) (3).

#### 2.1.1 Zlatobýl obecný

Zlatobýl obecný, jinak také celík zlatobýl, lat. *Solidago virgaurea L.*, je rostlina patřící do čeledi hvězdnicovité (*Asteraceae*) (obr. 1). Vyskytuje se na celé severní polokouli, zejména v mírném pásmu, jak v nížinách, tak i ve výše položených místech. Zlatobýl obecný roste především na suchých světlých stráních, pasekách a v lesích. V České republice je rozšířený především v nadmořských výškách od 300-800 m. (4,5)

Zlatobýl obecný je vytrvalá bylina s lodyhou až metr vysokou a krátkým silným kořenem. Kvete žlutými květy, které jsou uspořádány do úborů a dále do latovitých květenství. Plody této rostliny jsou pýřité nažky. (4,5)

##### 2.1.1.1 Obsahové látky

Zlatobýl obecný obsahuje celou řadu zajímavých biologicky aktivních látek, které mohou ovlivňovat lidské zdraví. Mezi jeho účinné látky můžeme zařadit flavonoidy, které tvoří asi 1-1,5 % celkového množství sušiny v závislosti na části rostliny. Flavonoidy jsou chemicky širokou skupinou látek, které vykazují především



Obr. 1 – *Solidago virgaurea* (8).

antioxidační účinky, nicméně *in vitro* také protiinfekční, antialergické, antivirotické a protinádorové účinky (6). Nejdůležitějšími flavonoidy zlatobýlu obecného jsou quercetin, kaempferol, isorhamnetin, astragalín a některé jejich glykosidy (4,7,8).

Další důležitou součástí zlatobýlu obecného jsou saponiny, povrchově aktivní látky, zejména glykosylované triterpeny. Ve zlatobýlu obecném byly po hydrolýze identifikovány oleanolová kyselina a polygalová kyselina (7,8).

Významnou roli hrají fenolické glykosidy, především leiokarposid a virgaureosid A, kterým jsou přisuzovány diuretické, antiflogistické i analgetické účinky (viz kap. 2.1.1.2) (7,8). Farmakologická aktivita zlatobýlu obecného je zapříčiněná právě přítomností flavonoidů, leiokarposidu a saponinů (9).

Bylo publikováno, že kromě výše uvedených látek obsahuje zlatobýl obecný také esenciální oleje (zejména  $\alpha$ - a  $\beta$ -pinen, myrcen a germacren), fenolové kyseliny a jejich glykosidy, polysacharidy a další sloučeniny (10).

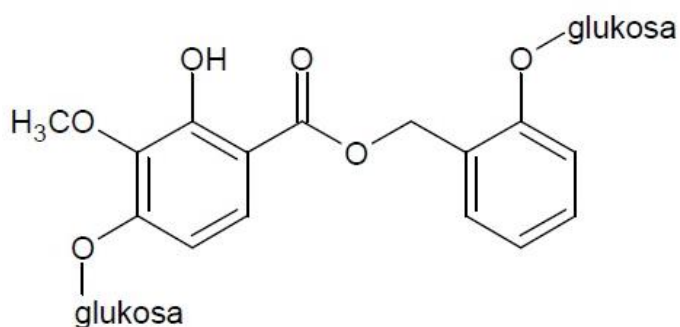
### 2.1.1.2 Účinky a použití

V tradiční medicíně se používá zejména nať zlatobýlu obecného (lat. *Solidaginis virgaureae herba*), a to k léčbě močových cest, močového měchýře a při zánětech

ledvin a k léčbě ledvinových kamenů. Zlatobýl obecný je vhodný i k zevnímu použití při zánětech sliznic, při dně, revmatismu, ekzémech a dalších kožních onemocněních. Dále se ve směsích používá při nachlazení a revmatických potížích. (4,8) V současné době je přidáván i do některých doplňků stravy, jako je například Urinal Akut® firmy Walmark nebo Urixin® firmy Advance nutraceutics.

Na základě hojného využívání zlatobýlu obecného k léčebným účelům v tradiční medicíně bylo provedeno v nedávné době mnoho *in vitro* a některé *in vivo* experimenty k prokázání jeho blahodárných účinků. V devadesátých letech dvacátého století byly prokázány diuretické, antibakteriální, antimykotické, analgetické a protizánětlivé účinky zlatobýlu obecného *in vitro* (11). Antibakteriální účinky vůči některým bakteriím prokázaly v roce 2002 Thiem a Gošlínska na kulturách *in vitro* (11). V roce 2008 publikovali Demir a kol. studii o antioxidačních účincích methanolického a vodného roztoku extraktu zlatobýlu obecného a tyto účinky potvrdili (12). Také odhadli, že největší podíl na antioxidační kapacitě extraktu zlatobýlu obecného by mohly mít fenolické glykosidy. V některých pracích se mluví i o antirakovinových účincích (7).

Za značnou část pozitivních účinků zlatobýlu obecného na lidský organismus je zodpovědný fenolický glykosid leiokarpoxid, systematickým názvem 2'-hydroxybenzyl-3-methoxybenzoát-2',4-diglukosid (obr. 2). Bylo provedeno několik studií na ověření účinků leiokarpoxidu, a byly prokázány diuretické, antiflogistické a analgetické účinky na myším a potkaním modelu. Jak již bylo zmíněno dříve, Demir a kol. se domnívají, že fenolické sloučeniny (mezi které patří i leiokarpoxid) jsou z velké části zodpovědné i za antioxidační účinky extraktu zlatobýlu obecného. (7,8,12)



Obr. 2 – Struktura leiokarpoxidu (podle (8)).

### 2.1.2 Brusnice borůvka

Brusnice borůvka, nebo také borůvka černá, latinským názvem *Vaccinium myrtillus*, je velmi rozšířená bylina patřící do čeledi *Ericaceae* neboli vřesovcovité (obr. 3). Brusnice borůvka je rozšířená především v centrální a severní Evropě, ale také v severní Asii a Americe. Roste zejména ve světlých jehličnatých lesích v různých nadmořských výškách, na rašeliništích a vřesovištích.

Brusnice borůvka dorůstá výšky až 50 cm, má položený oddénkový kořen a plazivé kmínky. Listy jsou opadavé, střídavé a mají okrouhle vejčitou čepel. Brusnice borůvka kvete v květnu a v červnu jednotlivými malými květy, které vyrůstají z úžlabí listů. Plodem jsou mnohosemenné modročerné bobule se sladce nakyslou chutí zrající v období mezi červencem a zářím. (13–16)

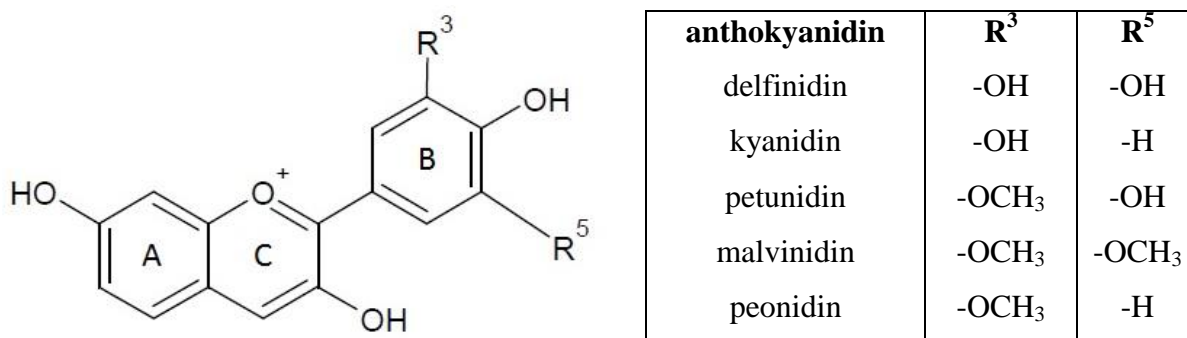


Obr. 3 - Brusnice borůvka (13).

### 2.1.2.1 Obsahové látky

Brusnice borůvka obsahuje množství látek s pozitivním účinkem na lidský organismus. Jejich množství se liší podle části rostliny. Hlavní obsahovou složkou brusnice borůvky jsou třísloviny neboli taniny. Listy obsahují až 7 % tříslovin v sušině, plody dokonce až 11 %. Třísloviny jsou látky se svíravou chutí tlumící průjem. (8,13–15) Dalšími složkami brusnice borůvky jsou organické kyseliny (např. kyselina oleanová nebo ursulová) a flavonoidy (8,13–15). Mezi skupinu flavonoidů zařazujeme i anthokyaniny, polyfenolová barviva, zodpovědná za červené, růžové, modré nebo fialové zbarvení rostliny v závislosti na pH.

Základní strukturou anthokyanů je aglykon anthokyanidin, na nějž je navázána molekula nebo více molekul sacharidů, často glukóza, galaktóza a arabinóza v poloze 3 nebo 5 kruhu B. Nejčastěji se vyskytujícími anthokyaniny v brusnici borůvce jsou různé glykosidy delphinidinu, kyanidinu, petunidinu, malvinidinu a peonidinu (16,17) (obr. 4). Jejich množství se liší druh od druhu a v rámci jednoho druhu obsah také není vždy stejný - závisí na spoustě faktorů jako jsou teplota, obsah solí v půdě apod.



Obr. 4 - Obecná struktura vybraných anthokyanidinů (podle (21)).

### 2.1.2.2 Účinky a použití.

Poprvé byla brusnice borůvka zmíněna v souvislosti s léčivými účinky již ve 12. stol. abatyší Hildegardou von Bingen (15). V lidovém léčitelství se využívá list a plod. Z listů brusnice borůvky se vaří čaje a nálevy na kloktání; plod se konzumuje v mnoha úpravách – čerstvý, sušený, v podobě marmelád a džemů.

Anthokyany obsažené v brusnici borůvce vykazují mnoho pozitivních účinků na živý organismus. Byly publikovány antioxidační účinky *in vitro* i *in vivo* na myším modelu (18–20), antidiabetické (16,19), protizánětlivé (16,21), antiobesitní účinky (22) na myších modelech. Některé studie mluví také o protirakovinových účincích (18,19,23,24).

Brusnice borůvka je užívána zejména jako prostředek proti průjmům, podpůrné antidiabetikum nebo jako slabě dezinfekční prostředek při zánětech dutiny ústní. Někdy je doporučena i proti lámavosti cévních kapilár a při onemocněních sítnice. Může blahodárně působit i při střevních enteritidách (8,13–15). Brusnice borůvka je přidávána i do některých doplňků stravy, jako jsou například čaje firmy Leros Diabetan® k doplňkové léčbě pro nemocné cukrovkou nebo Tormentan®, léčivý čaj při průjmech.

## 2.2 METABOLICKÉ PŘEMĚNY XENOBIOTIK

Cizorodé látky neboli xenobiotika jsou látky, které se v organismu přirozeně nevyskytují. Do organismu se dostávají mnoha cestami. Nejběžnější je perorální cesta přes trávicí trakt. Dále mohou být xenobiotika aplikována např. inhalačně, vstřebávat se přes pokožku nebo přes sliznice (3).

Biotransformace xenobiotik probíhá souborem různých biochemických reakcí. Cílem těchto reakcí je vytvořit polárnější metabolit, který je lépe eliminovatelný, a zbavit tak organismus potenciálně škodlivé látky. Metabolismus xenobiotik probíhá zejména v játrech, případně ledvinách. Důležité jsou ale i další orgány, např. buňky gastrointestinálního traktu, srdce, mozek, plíce atd. Metabolismus xenobiotik můžeme rozdělit do dvou fází. (25–27)

Ve fázi I dochází k připojení nebo odkrytí polární funkční skupiny (-OH, -SH, -NH<sub>2</sub> apod.) v molekule xenobiotika. Typickým reakčním mechanismem je oxidace, která je často zprostředkovávána enzymy, které se nazývají cytochromy P450 (CYP). Během první fáze metabolismu xenobiotik může probíhat i redukce nebo hydrolýza původní molekuly. (25–28) V tabulce 1 jsou shrnuty reakce zprostředkované CYP i ostatní typy reakcí s příklady xenobiotik, které těmto reakcím podléhají.

Tab. 1 – Příklady reakcí I. fáze metabolismu s příklady substrátů (podle (25)).

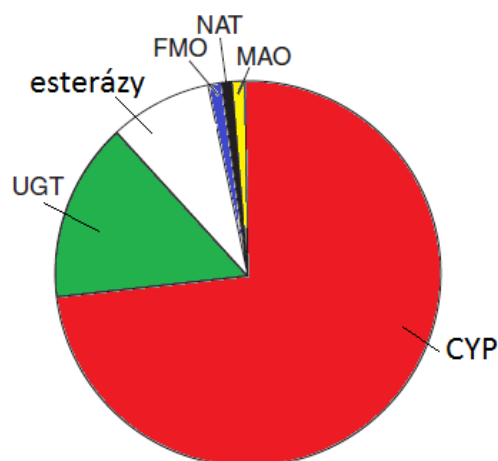
reakce	příklad substrátu
za účasti CYP	
hydroxylace	amfetaminy, barbituráty
N-dealkylace	kofein, morfin
N-oxidace	nikotin
bez účasti CYP	
oxidace aminů	adrenalin
redukce	naloxon
hydrolýza esterů	acylpyrin

Fáze II, tzv. konjugační, je charakterizována připojením polárnější endogenní molekuly ke xenobiotiku. Často je připojovanou molekulou kyselina glukuronová, kyselina octová nebo glutathion. Tyto reakce jsou zprostředkované enzymy lokalizovanými zejména v játrech organismu a vedou ke vzniku sloučeniny lépe rozpustné ve vodě, a tedy snadněji vylučitelné močí, případně žlučí. (25–27,29) Mezi nejvýznamnější enzymy II. fáze metabolismu xenobiotik patří UDP-glukuronosyl transferasa (UGT), sulfotransferasa (ST) a N-acetyltransferasa (NAT) (27).

Biotransformace xenobiotik je ovšem mnohem komplexnější problém a nemusí probíhat podle uvedeného schématu. První a druhá fáze nemusí nutně následovat za sebou. Jsou známy případy, kdy sloučenina podléhá pouze reakcím z jedné fáze, prokain je například pouze hydrolyzován (25), nebo druhá fáze předchází první, např. paracetamol je přednostně konjugován s glukuronovou kyselinou, v některých případech se sírovou kyselinou. Také neplatí vždy, že konjugací sloučeniny vzniká polárnější produkt. Methylace katecholů poskytuje produkt, který má nižší rozpustnost ve vodě. (26,28,30)

Navíc, konjugací metabolismus xenobiotika nekončí. Biotransformovanou sloučeninu je potřebné transportovat z buňky ven do extracelulárního prostoru. Tento transport je často uskutečňován přenašečovými systémy a někdy je označován jako fáze III. (25,29)





Obr. 5 – Podíl enzymových systémů při metabolizaci léčiv. CYP – cytochromy P450; UGT – UDP-glukoronosyltransferasy; FMO – flavinmonooxygenasy; NAT – N-acetyltransferasy a MAO – monoaminooxygenasy. (podle (31)).

## 2.2.1 Cytochromy P450 (CYP)

Cytochromy P450 jsou nejvýznamnějšími enzymy I. fáze metabolismu xenobiotik, ale účastní se i metabolismu endogenních sloučenin (např. steroidů nebo mastných kyselin) (29). Uvádí se, že CYP katalyzují až  $\frac{3}{4}$  všech biotransformačních reakcí xenobiotik (25,31) (obr. 5). Patří do rodiny monooxygenas a katalyzují především oxidační reakce (27,29,32–36).

### 2.2.1.1 Historický vývoj

Cytochromy P450 jsou evolučně velice staré hemoproteiny (dokonce starší než hemoglobin), které můžeme najít téměř ve všech organismech od bakterií až po člověka. Podobnost bakteriálních a lidských genů těchto enzymů má původ v superrodině genů starých přes 3 miliardy let (37,38). Za tuto dobu prodělaly cytochromy P450 značný vývoj nejen ve struktuře, ale i v diferenciaci funkcí. (32,37,38)

Předpokládá se, že původní CYP sloužily organismům k hydroxylaci organických sloučenin, které mohly být následně využity jako zdroj energie. Dodnes existují organismy, které mají CYP s touto funkcí. S postupujícím časem prodělaly

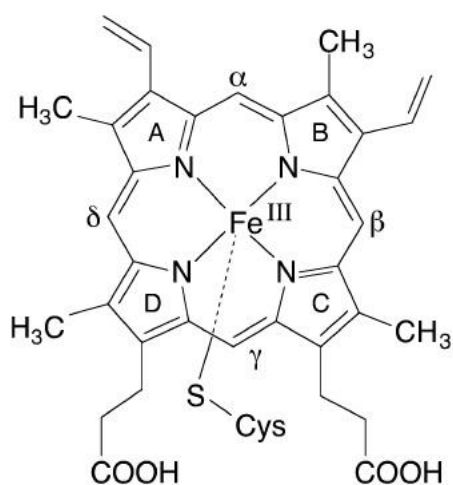
cytochromy P450 značný vývoj a jejich funkce se rozšířily na biosyntézu a především biotransformaci xenobiotik. (32)

Cytochromy P450 dostaly své pojmenování v šedesátých letech dvacátého století, kdy bylo objeveno, že tyto systémy v redukovaném stavu a s navázaným oxidem uhelnatým vykazovaly absorpční maximum při vlnové délce 450 nm a lišily se tím od ostatních hemoproteinů. V názvu těchto enzymů P označuje pigment a 450 právě tuto vlnovou délku absorpčního maxima. Až v pozdějších letech byly pigmenty spojeny s oxidačními reakcemi při metabolismu různých sloučenin. (31,37–39)

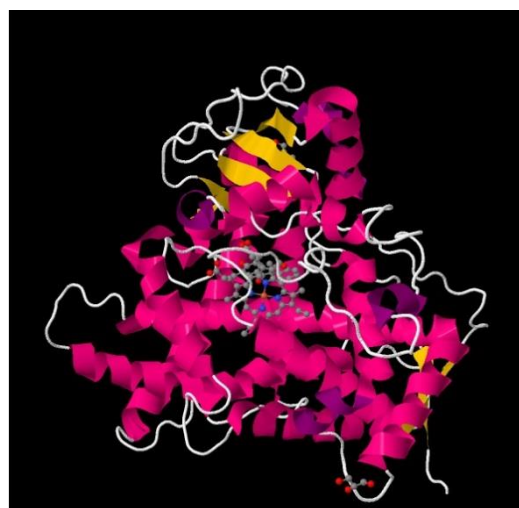
### 2.2.1.2 Nomenklatura CYP

Dnes používaná klasifikace pro CYP byla prezentována v polovině 90. let 20. století. Vychází z podobnosti sekvence aminokyselin v polypeptidovém řetězci enzymu a rozděluje cytochromy P450 do rodin a podrodin.

Rodina CYP je značena arabskou číslicí a sdružuje cytochromy P450 s homologií aminokyselinové sekvence nad 40 %. Dále se zařazuje velké písmeno abecedy značící podrodinu s podobností aminokyselinové sekvence nad 55 %. Poslední součástí značení CYP je opět arabská číslice určující konkrétní enzym. Například CYP3A4 patří do rodiny 3, podrodiny A a v této podrodině je označen číslem 4. (31,32,36–38,40,41)



Obr. 6 – Protoporfyryl IX s thiolátovou vazbou (34).



Obr. 7 – Krystalová struktura lidského mikrosomálního CYP 2C19 (42).

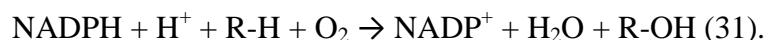
### 2.2.1.3 Struktura CYP

CYP se zařazují mezi hemoproteiny typu b. Obsahují porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) s nekovalentně vázaným atomem železa, v klidovém stavu s oxidačním číslem III. Porfyrinový skelet je vázán k proteinové části jak hydrofobními silami, tak prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu (obr. 6). Tato hem-thiolátová vazba je důvodem, proč mají CYP v redukovaném stavu tak specifické absorpční maximum (35). (31,32,34,35)

Terciální struktura proteinové části je často tvořena 12  $\alpha$ -helixy a 4  $\beta$ -skládanými listy, některé CYP obsahují ještě další helixy (31). Centrální, poměrně konzervovaná část, tvoří smyčka složená ze 4  $\alpha$ -helixů, tři jsou paralelní a jeden antiparalelní, která v sobě uchovává porfyrinové jádro, dále další dva  $\alpha$ -helixy a dva  $\beta$ -skládané listy (34–36). Na obr. 7 je počítačový model struktury lidského CYP2C19 (42).

### 2.2.1.4 Mechanismus enzymatické reakce za účasti CYP

Souhrnně můžeme reakci katalyzovanou cytochromy P450 zapsat takto:



Z této rovnice vyplývá, že do reakce vstupuje substrát (R-H), NADPH jako zdroj elektronů, které jsou pomocí enzymu NADPH:P450 reduktasy přeneseny na CYP a molekula kyslíku. Výsledkem je hydroxylovaný produkt, molekula vody a  $\text{NADP}^+$  (26,27,31).

Průběh reakce je ovšem mnohem složitější (obr. 8). V prvním kroku dochází k navázání substrátu na oxidovanou formu CYP. Následuje jednoelektronová redukce železitého iontu na železnatý iont za účasti NADPH:P450 reduktasy. Poté se na volné šesté koordinační místo železa váže kyslík a následuje druhá redukce za vzniku komplexu s aktivovaným kyslíkem. Poté je komplex protonován, dochází k hydrolýze vazby kyslík-kyslík, uvolňuje se voda. Tyto kroky ještě nebyly do detailu prostudovány, nicméně dochází k hydroxylaci substrátu a uvolnění produktu z komplexu. (31,35,36)



aromatické aminy a N-heterocykly (32,37,45). Příklady substrátů, ale také induktorů a inhibitorů CYP1A2 jsou shrnuty v tab. 2.

Tab. 2 – Přehled substrátů, induktorů a inhibitorů CYP1A2 (27,31,32,38,43–46), TCCD – 2,3,7,8,-tetrachloro-dibenzodioxin, PAU – polycyklické aromatické uhlovodíky.

<b>CYP1A2</b>			
SUBSTRÁT	REAKCE	INDUKTORY	INHIBITORY
phenacetin	O-deethylace	TCCD	furafyllin
kofein	N <sup>3</sup> , N <sup>1</sup> -demethylace	látky přítomné	fluvoxamin
acetaminophen	oxidace	v tabákovém kouři	quercetin
warfarin	C <sup>6</sup> -hydroxylace		7,8-benzoflavon
PAU	hydroxylace		cyprifloxacin

#### 2.2.1.5.2 CYP2A6

CYP2A6 je významným lidským CYP, tvoří asi 4 % celkového jaterního cytochromu P450 a je také exprimován v plicní tkáni a v oblasti nosohltanu (32,43).

Substráty tohoto enzymu jsou látky důležité pro lidské zdraví, CYP2A6 hraje významnou úlohu např. při oxidaci nikotinu. Exprese proteinu je snížena při infekci způsobené virem hepatitidy A (43).

Příklady několika typických substrátů spolu s induktory a inhibitory CYP2A6 shrnuje tab. 3.

Tab. 3 - Přehled substrátů, induktorů a inhibitorů CYP2A6 (27,32,38,44,45).

<b>CYP2A6</b>			
SUBSTRÁT	REAKCE	INDUKTORY	INHIBITORY
kumarin	C <sup>7</sup> -hydroxylace	dexamethazon	tranilcypromin
nikotin	oxidace	barbituráty	8-methoxypsoralen
zidovudin			pilocarpin

### 2.2.1.5.3 CYP2C9

CYP2C9 je zástupcem pro člověka významné podrodiny 2C, kam patří ještě CYP2C8, CYP2C18 a CYP2C19. Cytochromy P450 této rodiny jsou primárně jaterními enzymy. (32,45)

Typickým substrátem jsou slabě kyselé sloučeniny (44). CYP2C9 vykazuje výrazný genetický polymorfismus, což komplikuje nalezení optimální dávky léčiv, které jsou substrátem tohoto enzymu (43). Jedním z významných substrátů CYP2C9 je warfarin, lék proti srážení krve. Vyšší hladiny warfarinu způsobené jeho pomalým odbouráváním (nízkou aktivitou CYP2C9) mohou vést až k vnitřnímu krvácení. V tab. 4 jsou uvedeny některé typické substráty spolu s induktory a inhibitory CYP2C9.

Tab. 4 - Přehled substrátů, induktorů a inhibitorů CYP2C9 (27,31,38,43–45).

<b>CYP2C9</b>			
<b>SUBSTRÁT</b>	<b>REAKCE</b>	<b>INDUKTORY</b>	<b>INHIBITORY</b>
diclofenak	C <sup>4</sup> -hydroxylace	rifampicin	sulfafenazol
S-warfarin	C <sup>7</sup> -hydroxylace	barbituráty	isoniazid
tolbutamid	C <sup>4</sup> -hydroxylace		flukonazol
fenytoin	C <sup>4</sup> -hydroxylace		

### 2.2.1.5.4 CYP2D6

Tento cytochrom P450 vykazuje výrazný genetický polymorfismus a širokou substrátovou specifitu (32,45). Jeho typickými substráty jsou slabě bazické sloučeniny obsahující nitro skupinu, blokátory  $\beta$ -adrenergních receptorů a antidepresiva (44,45).

CYP2D6 není indukovatelný žádnou známou látkou, jeho množství tedy závisí jenom na genetické výbavě jedince (43,45). V tab. 5 jsou uvedeny příklady typických substrátů, induktorů a inhibitorů tohoto enzymu.

Tab. 5 - Přehled substrátů, induktorů a inhibitorů CYP2D6 (27,31,38,43–46).

CYP2D6			
SUBSTRÁT	REAKCE	INDUKTORY	INHIBITORY
amitriptylin	C <sup>10</sup> -hydroxylace		quinidin
kodein	O-demethylace		4-methylpyrazol
bufuralol	C <sup>1</sup> -hydroxylace		methadon
debrisochinon	C <sup>4</sup> -hydroxylace		

#### 2.2.1.5.5 CYP3A4

Původně byl tento cytochrom P450 označován jako P450NF podle schopnosti oxidovat nifedipin (32).

CYP3A4 je pravděpodobně nejvýznamnějším lidským cytochromem P450 z pohledu obsahu v tkáních a množství substrátů. Nejen že tvoří 25 % všech lidských jaterních CYP, ale vyskytuje se i v dalších tkáních. Také se podílí na metabolických přeměnách velké části léčiv (asi 50 %). Z toho pramení farmakologický problém u pacientů, kteří užívají více léčiv metabolizovaných tímto enzymem. Zde může docházet k ovlivnění metabolických přeměn aplikovaných léčiv. (32,41,45) Jako příklad můžeme uvést současné podání některých antifungálních látek společně s imunosupresivy. Antifungální látky (např. ketokonazol) významně inhibují CYP3A4, což může vést u pacientů k významnému zvýšení hladin imunosupresiv v krevní plasmě (37). Tab. 6 shrnuje některé substráty, induktory a inhibitory CYP3A4.

### **2.2.2 Lékové interakce**

Lékové interakce jsou definovány jako vzájemné působení mezi dvěma nebo více farmaky, kdy podání dvou různých léčiv ovlivní působení a účinky alespoň jednoho z nich. Ovlivněna může být nejen míra účinku léčiva, ale také délka trvání účinku. Stejný efekt jako současně podávané léčivo může mít ale i látka konzumovaná s potravou, různé rostlinné přípravky, doplňky stravy nebo také alkohol. (25)

Někdy je lékových interakcí využíváno záměrně, např. když se využívá kombinované léčby (cytostatika) nebo při podání antidota při intoxikaci organismu, ale často jsou tyto interakce nežádoucí, ovlivňují léčbu a mohou pacienta až ohrozit na životě. (25,47)

Tab. 6 - Přehled substrátů, induktorů a inhibitorů CYP3A4 (27,31,32,38,41,43,44,46).

CYP3A4			
SUBSTRÁT	REAKCE	INDUKTORY	INHIBITORY
testosteron	C <sup>6β</sup> -hydroxylace	rifampicin	ketokonazol
paracetamol	oxidace	barbituráty	erytromycin
midazolam	C <sup>1</sup> -hydroxylace	karbamazepin	fluvoxamin
kortisol	C <sup>6β</sup> -hydroxylace	fenytoin	saquinivir
nifedipin	oxidace	klofibrát	troleandomycin
lidokain	N-deethylace		azamulin
erytromycin	N-demethylace		gestoden
dapson	N-hydroxylace		
atorvastatin	<i>o</i> - a <i>p</i> - hydroxylace		

Podle mechanismu vzniku lékových interakcí je můžeme dělit na farmaceutické, kdy dochází k chemickým nebo fyzikálně-chemickým interakcím jednotlivých partnerů, a to častěji mimo organismus, nebo na úrovni vstupu látek do organismu, farmakodynamické, kdy látky interagují na úrovni receptorů a farmakokinetické, kterými se zabývá tato práce.

Farmakokinetické lékové interakce jsou interakce na úrovni absorpce, biotransformace a exkrece. Interakce na úrovni biotransformace jsou velmi časté. Vznikají změny v aktivitě enzymů – indukce nebo inhibice enzymu.

Při indukci enzymu dochází k aktivaci syntézy a aktivity enzymu, zvyšuje se biotransformace, a tím se může snižovat účinek léčiva, případně délka jeho účinku. Pokud má ovšem metabolit vyšší účinek než aplikovaná látka, zvyšuje se účinek na organismus a toto zvýšení může vést až k intoxikaci. Naopak, dochází-li k inhibici enzymu, léčivo je metabolizováno s nižší účinností, tím pádem dojde ke zvýšení hladiny nemetabolizovaného léčiva, které může vést k delšímu času účinku léčiva, případně až k intoxikaci. (25,47)

Některé induktory a inhibitory vybraných CYP jsou uvedeny v tab. 2-6.



### **3 CÍLE PRÁCE**

Cílem této diplomové práce bylo ověřit možný vliv účinných látek přírodního původu na aktivity vybraných jaterních cytochromů P450, a tím určit možnou souvislost vyplývající ze současného podání léčiv a konzumace těchto látek.

Pro studium vlivu na jaterní CYP byl vybrán zlatobýl obecný a brusnice borůvka, které jsou hojně využívány v lidové léčbě a jsou přidávány do různých doplňků stravy.

Součástí práce bylo identifikovat a stanovit množství účinné látky ve vybraném doplňku stravy a ověřit vliv tohoto doplňku na aktivitu jaterních CYP.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 MATERIÁL

#### 4.1.1 Mikrosomy

Lidské jaterní mikrosomy (MS), váčky z endoplazmatického retikula vzniklé při homogenizaci jaterní tkáně, byly připraveny frakční centrifugací na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty UP (48). Použití jater od dárců bylo schváleno Etickou komisí FN a LF Olomouc v souladu se Zákonem č. 285/2000 Sb.

$$\begin{aligned}\text{Charakterizace MS: } c_{\text{proteinu}} &= 22,7 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} \\ c_{\text{P450}} &= 11,17 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}\end{aligned}$$

#### 4.1.2 Primární kultury lidských hepatocytů

Primární kultury lidských hepatocytů byly připraveny na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci metodou dvoufázové kolagenové perfuze z lidských jater (49). Použití jaterních buněk od dárců bylo schváleno Etickou komisí FN a LF Olomouc v souladu se Zákonem č. 285/2000 Sb.

#### 4.1.3 Použité přírodní látky, doplňky stravy

Extrakt ze zlatobýlu obecného byl dodán od firmy Walmark (Praha, Česká republika).

Odvar a výluh ze zlatobýlu obecného byl připravován z komerčně dostupného čaje Zlatobýl obecný nať od firmy Valdemar Grešík-Natura s.r.o (Děčín, Česká republika).

Plody borůvek byly sbírané v létě roku 2015 ve východních Čechách a byly skladovány v mrazáku při  $-20 \text{ } ^\circ\text{C}$  až do použití.

#### 4.1.4 Chemikálie

Firmou Sigma Aldrich Praha, CZ byly dodány testosteron, kumarin, isocitrát (ISO), síran hořečnatý, tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), fenacetin, warfarin, isocitrátdehydrogenáza (IDH), nikotinaminadenindinukleotidfosfát (NADP<sup>+</sup>), bufuralol a BCA protein kit.

Sacharosa, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), isopropanol, chlorid draselný, dihydrogenfosforečnan draselný, chlorid sodný, uhličitan sodný, kyselina trihydrogenfosforečná, kyselina octová, kyselina chlorovodíková, kyselina chloristá, octan sodný byly dodány firmou Lach-Ner Neratovice, CZ.

Standardy anthokyanů (delfinidin-3-*O*-galaktosid, delfinidin-3-*O*-glukosid, delfinidin-3-*O*-arabinosid, petunidin-3-*O*-galaktosid, petunidin-3-*O*-glukosid, malvidin-3-*O*-galaktosid, malvidin-3-*O*-glukosid, kyanidin-3-*O*-galaktosid, kyanidin-3-*O*-glukosid a peonidin-3-*O*-glukosid) byly dodány firmou Extrasythese Genay, Francie.

Další chemikálie byly následujícího původu: methanol (Merck, Darmstadt, Německo), acetonitril (VWR, Randor, Pensylvánie, USA), dusík (Linde, Wiesbaden, Německo), fenylmethylsulfonfyl fluorid (PMSF) (Fluka, Buchs, SG, Švýcarsko), leiokarposid (Rotichrom, Karlsruhe, Německo).

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

#### 4.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

analytické váhy AX 105 DeltaRange, Mettler Toledo (Greifensee, Švýcarsko)

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

centrifuga Eppendorf mini spin (Eppendorf, Hamburg, Německo)

centrifuga Hettich Mikro 22R (dodáno firmou Schoeller Instruments, Praha, CZ)

centrifuga Labofuge 400 (Heraeus, Hanau, Německo)

kolona RP100-LC18 250x4 mm (Merck, Praha, CZ)

kolona LiChroCART 250x4 mm s náplní LiChrospher 100 RP-18 endcapped (5 µm) (Merck, Praha, CZ)

magnetická míchačka Heidolph MR 1 000 (dodáno firmou Fisher Scientific, Pardubice, CZ)

minitřepačka IKA MS 3 basic (dodáno firmou MERCI s.r.o., Brno, CZ)

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

sonikátor (Dynatech, Brno, CZ)

spektrofotometr Shimadzu UV-2401 PC (Shimadzu, Tokio, Japonsko)

suchá lázeň MD-MP01-D (dodáno firmou Biotech, Praha, CZ)

ultracentrifuga Optima LE-80K (Beckman, dodáno firmou Biotech, Praha, CZ), rotor 70.Ti

ultracentrifugační zkušavky (Beckman, dodáno firmou Biotech, Praha, CZ)

ultrazvuk UCC 4 (Notus-Powersonic s.r.o., Vráble, SK)

vodní lázeň WB 14 (Memmert, Schwabach, Německo)

vortex Heidolph REAX top (dodáno firmou Fisher Scientific, Pardubice, CZ)

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

HPLC systém I (Shimadzu; Tokyo, Japonsko): Software (Shimadzu CLASS-VP), řídicí jednotka (Shimadzu SCL-10A VP), detektor (UV-VIS detektor Shimadzu SPD-10A a fluorescenční detektor Shimadzu RF-10A XL), vyhřívání kolony (Shimadzu CTO-10AC VP), autosampler se smyčkou 50 µl (Shimadzu SIL-10AD VP), odplyňovač mobilní fáze (Shimadzu DGU-14A), pumpa (Shimadzu LC-10AD VP).

HPLC systém II (Shimadzu Tokyo, Japonsko): Software (Shimadzu LC solution), řídicí jednotka (Shimadzu CBM-20A), detektor (UV-VIS detektor Shimadzu SPD-M20A a fluorescenční detektor Shimadzu RF-10A XL), vyhřívání kolony (Shimadzu CTO-20AC), autosampler se smyčkou 50 µl (Shimadzu SIL-20AC), odplyňovač mobilní fáze (Shimadzu DGU-20A<sub>5</sub>), pumpa (Shimadzu LC-20AD).

## 4.3 METODY

### 4.3.1 Izolace mikrosomální frakce z lidských jater

Pro izolaci mikrosomů byly všechny potřebné nástroje dány předem vychladit, s játry se pracovalo na ledu. Játra byla po zvážení rozstříhána v předem vychlazeném homogenizačním pufru ( $0,25 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  sacharosa,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  EDTA, pH 7,4), do kterého byl těsně před použitím přidán  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  PMSF v isopropanolu (inhibitor proteáz). Játra byla zfiltrována přes gázu a následně ještě dvakrát promyta homogenizačním pufrům. Poté byl k játrům přidán homogenizační pufr o trojnásobném objemu váhy jater a játra byla homogenizována ponorným dispergačním homogenizátorem 3 x 10 s. Homogenát byl přepipetován do 50ti ml zkumavek, ty byly vyváženy a centrifugovány 10 min při 6 500 RPM ( $4\,117 \text{ x g}$ ) při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Supernatant byl odlit do čistých 50 ml zkumavek, ty byly vyváženy a opět centrifugovány při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  25 min; 11 000 RPM ( $11\,790 \text{ x g}$ ).

Supernatant byl slit do ultracentrifugačních (UC) zkumavek, ty byly doplněny po okraj homogenizačním pufrům a uzavřeny víčkem. Bylo zkontrolováno, že uvnitř zkumavky není žádná vzduchová bublina. Zkumavky byly centrifugovány na ultracentrifuze Optima LE-80K 60 min; 35 000 RPM ( $90\,552 \text{ x g}$ ) při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a k sedimentu obsahujícímu mikrosomální frakci byl přidán promývací pufr ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris,  $0,15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl,  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  PMSF v isopropanolu, pH 7,4) o objemu odpovídajícímu váze jater. Suspenze byla rehomogenizována v homogenizátoru Pottera a Elvehjema (P-E) a po homogenizaci přelita do čistých UC zkumavek. Ty byly opět doplněny promývacím pufrům, uzavřeny víčkem a bylo zkontrolováno, zda neobsahují vzduchovou bublinu. Následně byla opět provedena centrifugace 60 min při 35 000 RPM ( $90\,552 \text{ x g}$ ) a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Supernatant byl odstraněn, sediment opatrně setřen ze stěn zkumavek a v P-E homogenizátoru resuspendován v rehomogenizačním pufru ( $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  EDTA, 20% (v/v) glycerol, pH 7,4) o objemu zhruba 2/10 váhy jater. Po rehomogenizaci byl odebrán vzorek pro stanovení koncentrace proteinu a koncentrace CYP a zbytek byl uchován v mrazicím boxu při  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  (50).

### **4.3.2 Stanovení celkové koncentrace proteinu v mikrosomální frakci**

Ke stanovení celkové koncentrace v mikrosomální frakci byl použit komerční kit firmy Pierce (Rockford, USA) s využitím sodné soli bicinchoninové kyseliny (BCA) (51).

Vzorek byl 50x naředěn. K 12,5  $\mu$ l vzorku byl přidáno 100  $\mu$ l směsi činidel A (BCA a vinan sodný v alkalickém prostředí roztoku uhličitanu sodného a hydrogenuhličitanu sodného) a B (4% (v/v) roztok pentahydrátu síranu měďnatého) v poměru 50:1. Směs byla inkubována 30 min při 37 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo provedeno spektrofotometrické stanovení celkového množství proteinu, absorbance byla měřena při 562 nm a celkové množství proteinu bylo stanoveno z kalibrační křivky s použitím hovězího albuminu.

### **4.3.3 Stanovení celkové koncentrace CYP v mikrosomální frakci jater**

Celkovou koncentraci CYP v mikrosomální frakci lze určit pomocí spektrofotometrického stanovení po redukci dithioničnanem sodným a reakci s navázaným oxidem uhelnatým (52).

Mikrosomální frakce byla naředěna a cytochrom P450 byl zredukován přidavkem dithioničitanu sodného. Takto získaná suspenze byla rozpipetována do dvou kyvet a na dvoupaprskovém spektrofotometru mezi 500 a 400 nm nastavena nulová linie. Následně byla jedna kyveta se vzorkem probublávána oxidem uhelnatým po dobu 1 min. Poté bylo opět provedeno spektrofotometrické měření. Celková koncentrace CYP byla vypočítána z absorpčního maxima při vlnové délce 450 nm a příslušného molárního absorpčního koeficientu.

### **4.3.4 Příprava vzorků přírodních látek pro měření jejich vlivu na jaterní CYP**

#### **4.3.4.1 Příprava roztoku extraktu, odvaru a výluhu zlatobýlu obecného**

Extrakt ze zlatobýlu obecného byl podle výrobce připraven extrakcí do směsi organických rozpouštědel v extrakčním poměru 10:1 s minimálním výsledným obsahem zbytkového rozpouštědla. Extrakt byl dále ředěn destilovanou vodou na požadovanou koncentraci.

Odvar a výluh ze zlatobýlu obecného byl připravován z komerčně dostupného čaje Zlatobýl obecný nať podle návodu na obalu. Odvar byl připraven tak, že 0,67 g čaje bylo zalito 50 ml studené destilované vody a tato směs byla přivedena k varu. Po dosažení varu byl odvar odstaven z vařiče a nechal se zakrytý stát. Doporučená doba louhování byla 15 min. Výluh byl připraven tak, že 0,67 g čaje bylo zalito 50 ml vroucí destilované vody, směs byla přikryta a nechala se odstát po doporučenou dobu 15 min.

#### **4.3.4.2 Příprava roztoku z plodů brusnice borůvky**

K 10 ml destilované vody bylo přidáno 5 g plodů brusnice borůvky. Směs byla homogenizována pomocí ponorného mixéru a filtrována přes vatou. Filtrát byl uložen v mrazicím boxu při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do použití.

#### **4.3.5 HPLC stanovení koncentrace leiokarposidu v extraktu, odvaru a výluhu ze zlatobýlu obecného**

Byl připraven zásobní roztok leiokarposidu v methanolu o koncentraci  $0,8\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Kalibrační roztoky byly připraveny v dubletu ředěním zásobního roztoku mobilní fází (MeOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; pH 2,5 v poměru 15:10:75, v/v/v). Kalibrace metody byla provedena s kalibračními roztoky o koncentraci 0,008; 0,014; 0,02; 0,05; 0,08; 0,11 a  $0,14\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Podmínky HPLC analýzy: isokratická eluce, doba analýzy 30 min, průtok  $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , UV detekce při 216 nm. S využitím této metody byl stanoven obsah leiokarposidu v roztoku extraktu, výluhu a odvaru ze zlatobýlu. (10)

Dále bylo touto metodou stanoveno množství leiokarposidu ve výluhu a odvaru ze zlatobýlu obecného (připraven viz kap. 4.3.4.1) v závislosti na délce louhování. Vzorky byly odebrány po 5, 15 a 30 minutách louhování a následně byla v těchto vzorcích stanovena koncentrace leiokarposidu. Vzorky byly zředěny 1:1 v mobilní fázi a měřeny v dubletu.

### 4.3.6 Spektrofotometrické stanovení celkových anthokyanů v roztoku plodů brusnice borůvky

Tato metoda je založena na změně absorpce anthokyanů při rozdílných hodnotách pH. Anthokyaniny podléhají reversibilní přeměně struktury v závislosti na změně pH; při pH 1 se anthokyaniny vyskytují v barevné oxoniové formě, při pH 4,5 přechází anthokyaniny do bezbarvé hemiketalové formy. Rozdíl absorpce oxoniové a hemiketalové formy anthokyanů přibližně při 520 nm odpovídá celkovému množství přítomných anthokyanů (51).

Roztoky připravené z plodů brusnice borůvky byly zředěny dvěma puframi: pufr A (pH 1) ( $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl, pH upraveno pomocí HCl) a pufr B (pH 4,5) ( $0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{CH}_3\text{COONa}$ , pH upraveno pomocí HCl). Následně bylo měřeno absorpční spektrum v rozmezí 250-750 nm. Při výpočtu celkové koncentrace anthokyanů byl použit molární absorpční koeficient pro kyanidin-3-*O*-glukosid a výpočet byl proveden podle vzorce 1,

$$C_{\text{anthokyanů}} = \frac{A \cdot M \cdot DF \cdot 10^3}{\epsilon \cdot l} \quad (1)$$

Vzorec na výpočet koncentrace celkových anthokyanů v  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (51).

kde  $A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}$ ,  $M$  je molekulová hmotnost kyanidin-3-*O*-glukosidu ( $449,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $DF$  je zředovací faktor,  $\epsilon$  je molární absorpční koeficient a  $l$  je šířka kyvety v cm.  $10^3$  je přidáno pro převod z gramů na miligramy. Absorbance při 700 nm je měřena z důvodu korekce možného pozadí (51).

### 4.3.7 Stanovení anthokyanů v plodech brusnice borůvky s využitím HPLC

Identifikace jednotlivých anthokyanů obsažených v roztoku plodů brusnice borůvky byla provedena na  $\text{C}_{18}$  koloně (LiChroCART 250x4 mm s náplní LiChrospher 100 RP-18 endcapped ( $5 \mu\text{m}$ )) s gradientovou elucí složky A mobilní fáze ( $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{ACN}:\text{H}_3\text{PO}_4$  v poměru 94,64:2,6:2,5:0,26 v/v/v/v) a složky B mobilní fáze (100% ACN) podle tab. 7 (gradientová eluce, 35 min, průtok  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ) (53). Složka A mobilní fáze byla upravena oproti původní literatuře tak, aby pH nekleslo pod 2 z důvodu ochrany kolony. Nástřik byl  $50 \mu\text{l}$ , detekce při 520 nm.



Tab. 7 – HPLC gradient pro separaci anthokyanů.

čas (min)	procento složky A (%)	procento složky B (%)
0,1	100	0
5	100	0
20	80	20
25	70	30
30	100	0
35	100	0

Roztok plodů brusnice borůvky byl zředěn destilovanou vodou na koncentraci  $0,12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  celkových anthokyanů a následně ještě 10x složkou A mobilní fáze. Roztok byl přefiltrován přes filtr Millex®GP 0,22  $\mu\text{m}$ . Byla provedena předběžná analýza vzorku, a zároveň byly nastříknuty roztoky standardů anthokyanů - delfinidin-3-*O*-galaktosid (del-gala), delfinidin-3-*O*-glukosid (del-glu), delfinidin-3-*O*-arabinosid (del-ara), petunidin-3-*O*-galaktosid (pet-gala), petunidin-3-*O*-glukosid (pet-glu), malvidin-3-*O*-galaktosid (malv-gala), malvidin-3-*O*-glukosid (malv-glu), kyanidin-3-*O*-galaktosid (ky-gala), kyanidin-3-*O*-glukosid (ky-glu) a peonidin-3-*O*-glukosid (peo-glu) - o koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$ .

Pro vybrané identifikované anthokyaniny byla provedena kalibrace a stanovení obsahu jednotlivých anthokyanů v roztoku plodů brusnice borůvky.

V dalším kroku byla provedena hydrolyza anthokyanů za vzniku anthokyanidinů podle práce Dursta a Wrolstada (53) a podle práce Kopečné Zapletalové (54). Roztok plodů brusnice borůvky byl zředěn na  $0,55 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  celkových anthokyanů, k 1 ml roztoku byly přidány 2 ml 0,1M HCl a vzorek byl hydrolyzován 1 hod na vodní lázni při 37 °C. Po hydrolyze byl vzorek centrifugován 10 min při 3 500 x g. Supernatant byl odpařen při 40 °C ve vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v 500  $\mu\text{l}$  2M HCl a hydrolyzován 30 min ve vroucí vodní lázni. Vzorek byl poté ochlazen na ledu, 20  $\mu\text{l}$  vzorku bylo zředěno 100x složkou A mobilní fáze a vzorek byl analyzován HPLC metodou s gradientovou elucí podle tab. 8. Zároveň byly nastříknuty standardy anthokyanidinů petunidinu, peonidinu, kyanidinu, delfinidinu a malvinidinu. Pro analýzu byla použita kolona LiChroCART 250x4 mm s náplní LiChrospher 100 RP-18 endcapped (5  $\mu\text{m}$ ), nástřik byl 50  $\mu\text{l}$ , detekce 520 nm.

Tab. 8 - HPLC gradient pro separaci anthokyanidinů.

čas (min)	procento složky A (%)	procento složky B (%)
0,1	95	5
20	80	20
25	95	5
30	95	5
40	95	5

#### **4.3.8 Stanovení vlivu vybraných přírodních látek na aktivitu jaterních mikrosomálních CYP**

Vliv vybraných přírodních látek na enzymovou aktivitu byl studován pro CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4 pomocí markerových substrátů s detekcí HPLC.

##### **4.3.8.1 Vliv účinných látek v extraktu ze zlatobýlu obecného na aktivity CYP**

Vliv extraktu ze zlatobýlu obecného na aktivitu jaterních CYP byl stanoven v koncentračních hladinách 0,042; 0,083 a 0,167 mg·ml<sup>-1</sup> extraktu ze zlatobýlu obecného. Experimentální podmínky stanovení vlivu extraktu zlatobýlu obecného na CYP v lidské mikrosomální jaterní frakci shrnuje tab. 9. Jednotlivé HPLC metody jsou popsány v kapitolách 4.3.8.1.1. - 4.3.8.1.5.

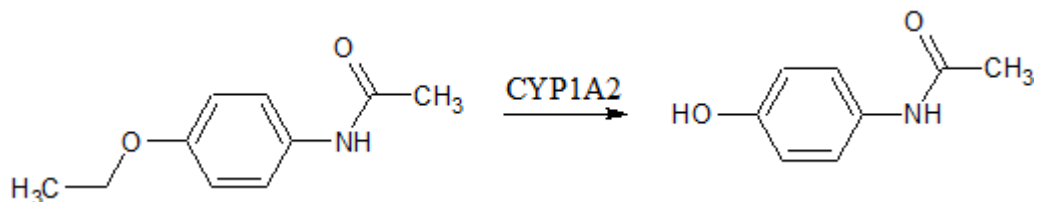
Míra inhibice byla stanovena jako procentuální úbytek vzniklého produktu vzhledem ke kontrole, která neobsahovala extrakt ze zlatobýlu obecného.

Vliv extraktu ze zlatobýlu obecného na lidské jaterní CYP byl stanoven i na primárních kulturách lidských hepatocytů (LH 63 a LH 64). Použití jaterních buněk od dvou dárců bylo schváleno Etickou komisí FN a LF Olomouc v souladu se Zákonem č. 285/2000 Sb. Hepatocyty byly izolovány podle metody Pichardové et al. (49), poté byla provedena inkubace hepatocytů s extraktem ze zlatobýlu obecného po dobu 24 h v koncentračních hladinách 0,042; 0,083 a 0,167 mg·ml<sup>-1</sup>. Specifický substrát jednotlivých CYP byl se směsí inkubován 2 h. Studium míry inhibice aktivit CYP

vlivem extraktu ze zlatobýlu obecného bylo provedeno HPLC metodami shrnutými v tab. 9.

#### 4.3.8.1.1 Stanovení aktivity CYP1A2

Aktivita CYP1A2 byla stanovena na základě *O*-deethylace fenacetinu (obr. 9).

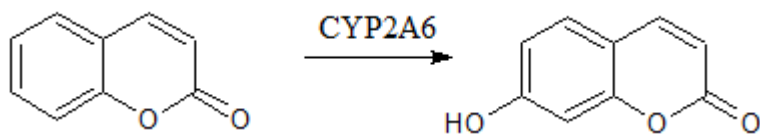


Obr. 9 – *O*-deethylace phenacetinu za účasti CYP1A2 (podle (55)).

Pro HPLC analýzu na HPLC systému I bylo odebráno 150  $\mu$ l supernatantu po deproteinaci reakční směsi. Složení mobilní fáze bylo MeOH:H<sub>2</sub>O v poměru 2:8 v/v, pH mobilní fáze bylo upraveno pomocí H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> na 2,9. Podmínky HPLC analýzy byly následující: isokratická eluce, průtok 1 ml·min<sup>-1</sup>, doba analýzy 22 min. Produkt enzymatické reakce byl analyzován UV detekcí při 300 nm.

#### 4.3.8.1.2 Stanovení aktivity CYP2A6

Aktivita CYP2A6 byla stanovena pomocí substrátu kumarinu, který je tímto CYP specificky hydroxylován v poloze 7 (obr. 10).



Obr. 10 – Hydroxylace kumarinu za účasti CYP2A6 (podle (56)).

Z reakční směsi bylo odebráno pro HPLC analýzu na HPLC systému I 200  $\mu$ l supernatantu po deproteinaci reakční směsi. Mobilní fáze měla složení 0,5% (v/v) CH<sub>3</sub>COOH:ACN v poměru 60:40 v/v. Podmínky analýzy byly: isokratická eluce, průtok 1 ml·min<sup>-1</sup>, doba analýzy 5 min. Produkt byl detekován fluorescenčním detektorem (excitace 338 nm, emise 458 nm).

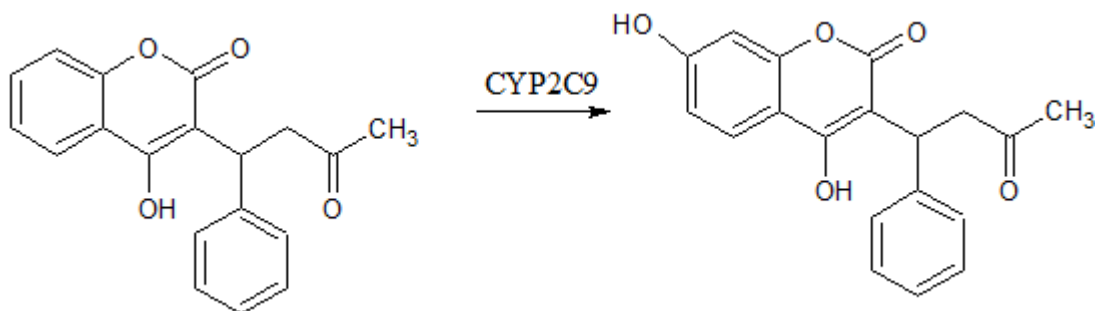
Tab. 9 – Stanovení vlivu extraktu ze zlatobýlu obecného na lidskou mikrosomální jaterní frakci CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4.

CYP1A2	CYP2A6	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
<b>objem reakční směsi</b> 200 $\mu$ l	<b>objem reakční směsi</b> 100 $\mu$ l	<b>objem reakční směsi</b> 250 $\mu$ l	<b>objem reakční směsi</b> 200 $\mu$ l	<b>objem reakční směsi</b> 500 $\mu$ l
100 mM fosfátový pufr (pH = 7,4)	100 mM fosfátový pufr (pH = 7,4)	100 mM fosfátový pufr (pH = 7,4)	100 mM fosfátový pufr (pH = 7,4)	50 mM TRIS/150 mM KCl (pH = 7,4)
<b>Mikrosomální frakce</b> 70 pmol cytochromu P450	<b>Mikrosomální frakce</b> 35 pmol cytochromu P450	<b>Mikrosomální frakce</b> 250 pmol cytochromu P450	<b>Mikrosomální frakce</b> 67,3 pmol cytochromu P450	<b>Mikrosomální frakce</b> 70 pmol cytochromu P450
<b>Markerový substrát</b> 25 $\mu$ M fenacetin	<b>Markerový substrát</b> 6,25 $\mu$ M kumarin	<b>NADPH generující systém</b> (NADP <sup>+</sup> 0,8 mM, isocitrát 6 mM, IDH 0,4 U·ml <sup>-1</sup> , Mg <sup>2+</sup> 8 mM)	<b>Markerový substrát</b> 25 $\mu$ M bufuralol	<b>NADPH generující systém</b> (NADP <sup>+</sup> 0,5 mM, isocitrát 4 mM, IDH 0,2 U·ml <sup>-1</sup> , Mg <sup>2+</sup> 5 mM)
<b>extrakt ze zlatobýlu obecného</b> 0; 0,042; 0,083; 0,167 mg·ml <sup>-1</sup>	<b>extrakt ze zlatobýlu obecného</b> 0; 0,042; 0,083; 0,167 mg·ml <sup>-1</sup>	<b>extrakt ze zlatobýlu obecného</b> 0; 0,042; 0,083; 0,167 mg·ml <sup>-1</sup>	<b>extrakt ze zlatobýlu obecného</b> 0; 0,042; 0,083; 0,167 mg·ml <sup>-1</sup>	<b>extrakt ze zlatobýlu obecného</b> 0; 0,042; 0,083; 0,167 mg·ml <sup>-1</sup>
<b>preinkubace</b> 30 min; 37 °C	<b>preinkubace</b> 30 min; 37 °C	<b>preinkubace</b> 30 min; 37 °C	<b>preinkubace</b> 30 min; 37 °C	<b>preinkubace</b> 30 min; 37 °C

<b>NADPH generující systém</b> (NADP <sup>+</sup> 0,8 mM, isocitrát 6 mM, IDH 0,3 U·ml <sup>-1</sup> , Mg <sup>2+</sup> 8mM)	<b>NADPH generující systém</b> (NADP <sup>+</sup> 0,8 mM, isocitrát 6 mM, IDH 0,3 U·ml <sup>-1</sup> , Mg <sup>2+</sup> 8mM)	<b>Markerový substrát</b> 200 μM warfarin	<b>NADPH generující systém</b> (NADP <sup>+</sup> 0,5 mM, isocitrát 6 mM, IDH 0,1 U·ml <sup>-1</sup> , Mg <sup>2+</sup> 5 mM)	<b>Markerový substrát</b> 100 μM testosteron
<b>inkubace</b> 20 min; 37 °C	<b>inkubace</b> 15 min; 37 °C	<b>inkubace</b> 20 min; 37 °C	<b>inkubace</b> 20 min; 37 °C	<b>inkubace</b> 30 min; 37 °C
<b>zastavení reakce</b> 70% (v/v) HClO <sub>4</sub>	<b>zastavení reakce</b> 100% methanol	<b>zastavení reakce</b> 70% (v/v) HClO <sub>4</sub>	<b>zastavení reakce</b> 70% (v/v) HClO <sub>4</sub>	<b>zastavení reakce</b> směs 1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> a 2 M NaCl
centrifugace 10 min 11 463 x g, HPLC detekce (55)	centrifugace 10 min 12 513 x g při 4°C, HPLC detekce (56)	centrifugace 10 min 12 513 x g při 4°C, HPLC detekce (57)	centrifugace 10 min 219 x g, HPLC detekce (58)	vířivá extrakce do 2 ml dichlormethanu (15 s), centrifugace 5 min, 877 x g, 4 °C 1 ml spodní fáze extraktu odpařen dusíkem, rozpuštěn v 200 μl MF (64% (v/v) MeOH) HPLC detekce (59)

#### 4.3.8.1.3 Stanovení aktivity CYP2C9

Aktivita CYP2C9 je stanovována pomocí substrátu S-warfarinu, který je tímto CYP v poloze 7 hydroxylován (obr. 11).

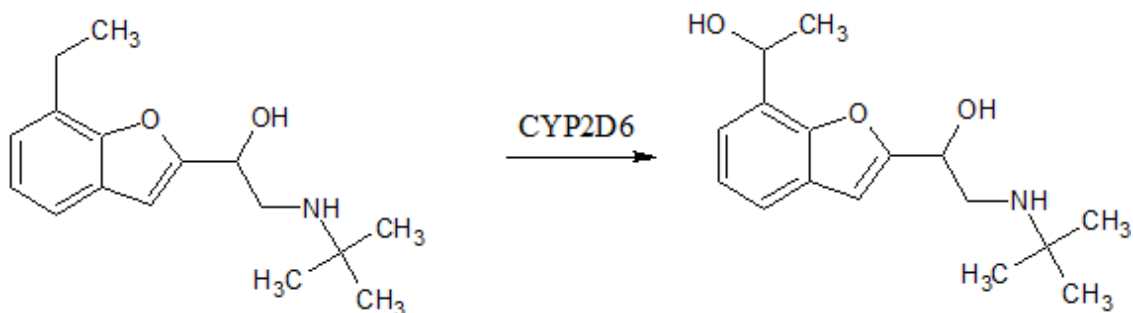


Obr. 11 – Hydroxylace S-warfarinu za účasti CYP2C9 (podle (57)).

Pro analýzu na HPLC systému I bylo odebráno 200  $\mu$ l supernatantu po deproteinaci reakční směsi. Mobilní fáze měla složení:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH = 3):MeOH:ACN v poměru 52:32:16 v/v/v. Podmínky analýzy byly: isokratická eluce, průtok 1 ml·min<sup>-1</sup>, doba analýzy 38 min. Produkt enzymatické reakce byl detekován při 306 nm (UV detekce).

#### 4.3.8.1.4 Stanovení aktivity CYP2D6

Substrátem, který je využíván pro studium aktivity CYP2D6 je bufuralol, který je tímto CYP hydroxylován v poloze 1 (obr. 12).



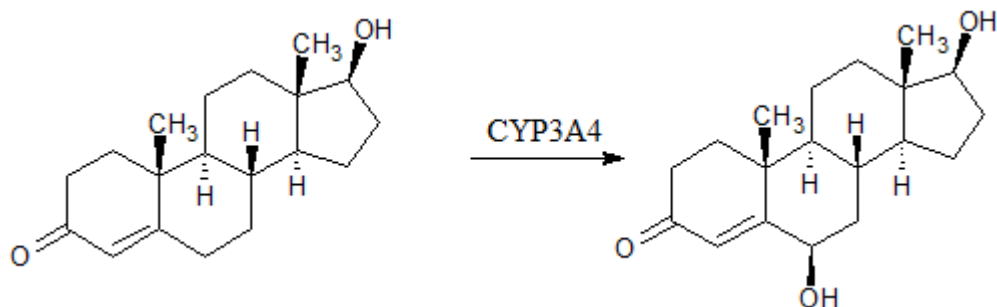
Obr. 12 – Hydroxylace bufuralolu za účasti CYP2D6 (podle (58)).

Z reakční směsi bylo po deproteinaci reakční směsi odebráno 150  $\mu$ l supernatantu na analýzu HPLC systémem I. MF: 2mM  $\text{HClO}_4$ :ACN v poměru 7:3 v/v. Podmínky

analýzy byly: isokratická eluce, průtok  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , doba analýzy 38 min. Produkt byl analyzován pomocí fluorescenční detekce (excitace 252 nm a emise 302 nm).

#### 4.3.8.1.5 Stanovení aktivity CYP3A4

CYP3A4 specificky hydroxyluje testosteron v poloze 6, čehož se využívá při studiu aktivity tohoto CYP (obr. 13).



Obr. 13 – Hydroxylace testosteronu za účasti CYP3A4 (podle (59)).

150  $\mu\text{l}$  upraveného vzorku bylo použito pro HPLC analýzu na HPLC systému I. Mobilní fázi byl 64% (v/v) MeOH. Podmínky HPLC analýzy byly: isokratická eluce, průtok  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , doba analýzy 14,5 min. Produkt enzymatické reakce byl detekován UV detekcí při 245 nm.

#### 4.3.8.2 Vliv účinných látek v plodech brusnice borůvky na aktivity CYP

Vliv účinných látek obsažených v plodech brusnice borůvky (anthokyanů) byl stanoven HPLC metodou sledující přeměnu warfarinu jako substrátu pro více forem CYP podle optimalizované metody Fojtíkové (57). Koncentrační hladiny celkových anthokyanů byly 0,0006; 0,0012; 0,003; 0,006; 0,03 a 0,044  $\text{mg anthokyanů} \cdot \text{ml}^{-1}$  v reakční směsi – vypočítáno podle celkové koncentrace anthokyanů v roztoku plodů brusnice borůvky za předpokladu, že do krevního oběhu se po konzumaci potravin obsahujících anthokyanů dostane přibližně 1 % celkového množství anthokyanů (60). Nejnižší vybraná koncentrace odpovídá konzumaci přibližně 100 g plodů brusnice borůvky v závislosti na konkrétním obsahu anthokyanů v dané rostlině. Reakční směs byla připravena stejně jako v tab. 9 pro CYP2C9.

Touto metodou byl určen vliv na aktivitu jaterních CYP2C9, CYP3A4 a CYP1A1/2. CYP2C9 katalyzuje hydroxylaci S-warfarinu převážně v poloze 7 (UV

detekce, fluorescenční detekce), menší měrou v poloze 6, a také hydroxylaci R-warfarinu v poloze 4 (UV detekce). CYP3A4, CYP1A2 a CYP1A1 katalyzují hydroxylaci především R-warfarinu; CYP3A4 v poloze 10 (UV detekce) a CYP1A1/2 v poloze 6 (fluorescenční detekce) (61). Míra vlivu byla určena jako procentuální změna množství vzniklého produktu vůči kontrole bez přítomnosti roztoku plodů brusnice borůvky.



## 5 VÝSLEDKY

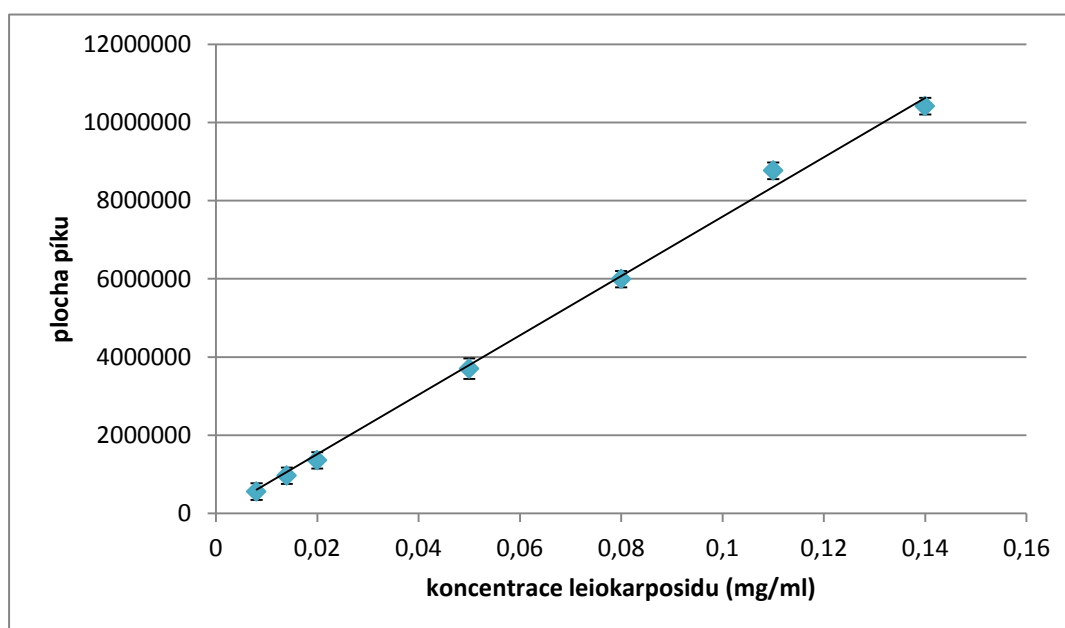
### 5.1 CHARAKTERIZACE MIKROSOMÁLNÍ FRAKCE LIDSKÉHO JATERNÍHO HOMOGENÁTU

Mikrosomální frakce získaná frakční centrifugací z lidského jaterního homogenátu byla charakterizována stanovením koncentrace CYP, která byla měřena spektrofotometricky (viz kap. 4.3.3). Koncentrace proteinů byla stanovena na 22,7 mg·ml<sup>-1</sup> a koncentrace CYP 11,17 μmol·l<sup>-1</sup>.

### 5.2 CHARAKTERIZACE ROZTOKU EXTRAKTU ZLATOBÝLU OBECNÉHO

Roztok extraktu zlatobýlu obecného byl charakterizován stanovením koncentrace leiokarposidu, tedy sloučeniny, které je připisován významný pozitivní účinek na lidský organismus. Koncentrace byla stanovena HPLC metodou (10) na základě kalibrační přímky s použitím roztoků standardu leiokarposidu v různých koncentračních hladinách (0,008; 0,014; 0,02; 0,05; 0,08; 0,11 a 0,14 mg·ml<sup>-1</sup>) (viz kap. 4.3.5). Tyto roztoky byly připraveny v dubletu. Kalibrační závislost je počítána z průměrných hodnot dvou měřených vzorků každé koncentrační hladiny a uvedena na obr. 14.

Rovnice regrese:  $y = 7,589 \cdot 10^7 x + 0$  ( $y = a \cdot x + b$ ),  $R^2 = 0,9971$ .



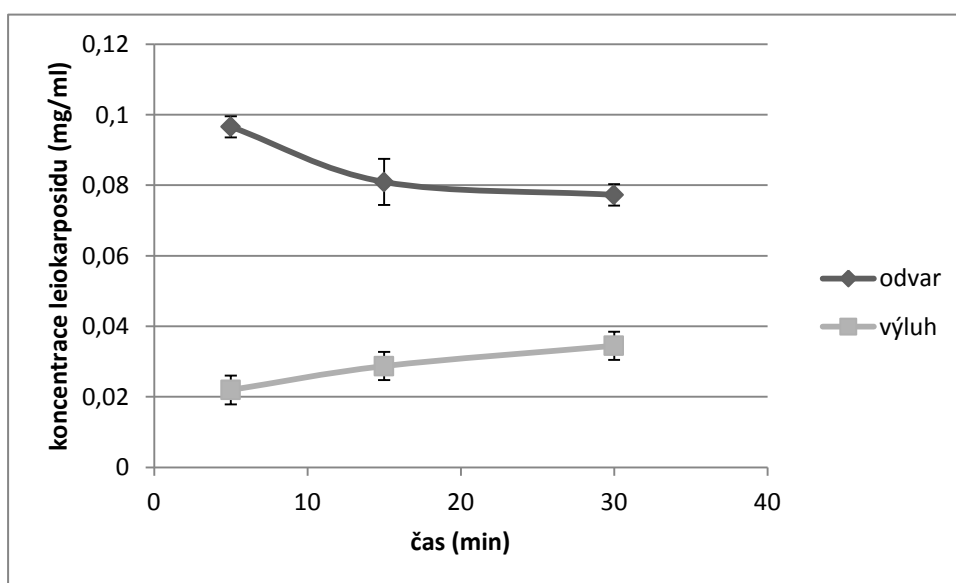
Obr. 14 – Kalibrační závislost pro HPLC stanovení koncentrace leiokarposidu.

Koncentrace leiokarposidu v roztoku extraktu ze zlatobýlu obecného byla stanovena pro 7 mg extraktu ze zlatobýlu obecného rozpuštěného v 1 ml vody. Koncentrace leiokarposidu v extraktu ze zlatobýlu obecného byla  $0,00233 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (molární koncentrace je  $3,79\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), což odpovídá podílu leiokarposidu v extraktu ze zlatobýlu obecného asi 0,033 %. Výsledek je průměrem dvou měřených vzorků. Touto metodou jsme také chtěli měřit koncentraci leiokarposidu pro roztok extraktu ze zlatobýlu obecného o koncentraci  $0,167 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (koncentrace, pro níž byl měřen vliv na CYP), ovšem výsledky nebylo možné kvantifikovat, protože obsah leiokarposidu v takto malé dávce byl pod mezí detekce.

Změřená koncentrace leiokarposidu ve výluhu byla  $880 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  a v odvaru  $1570 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  v roztocích odpovídajících navážce 0,167 mg do 1 ml vody.

Dále byla stanovena stabilita leiokarposidu v odvaru a výluhu ze zlatobýlu obecného v závislosti na délce přípravy. Výsledná koncentrace je průměrem dvou měřených vzorků v dubletu (obr. 15).

Koncentrace leiokarposidu v odvaru s časem postupně klesá, což může mít příčinu v tepelném rozkladu leiokarposidu, zatímco ve výluhu se hladina leiokarposidu mírně zvyšuje (obr. 15). Toto zvyšování koncentrace leiokarposidu je pravděpodobně dané vhodnějšími podmínkami pro extrakci leiokarposidu do roztoku. Rozdíly ovšem nejsou statisticky významné.



Obr. 15 – Stabilita leiokarposidu v odvaru a výluhu v závislosti na délce přípravy.

## 5.3 CHARAKTERIZACE ROZTOKU Z PLODŮ BRUSNICE BORŮVKY

### 5.3.1 Stanovení celkového obsahu monomerních anthokyanů spektrofotometricky

Měření celkového obsahu anthokyanů v roztoku plodů brusnice borůvky bylo provedeno v dubletu. Absorpční maximum bylo pozorováno při 514 nm.

Pro pH - 1:  $A_{514\text{nm}} = 0,733$  a  $A_{700\text{nm}} = 0,079$

Pro pH - 4,5:  $A_{514\text{nm}} = 0,002$  a  $A_{700\text{nm}} = 0,007$

$$c = \frac{(0,733-0,002)-(0,079-0,007) \cdot 449,2 \cdot 100 \cdot 10^3}{26\,900 \cdot 1} = 1\,077,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

Koncentrace celkových anthokyanů v připraveném roztoku plodů brusnice borůvky byla  $1\,077,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vzhledem k přípravě tohoto roztoku, byla koncentrace celkových anthokyanů v plodech borůvek stanovena na  $3\,301,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ .

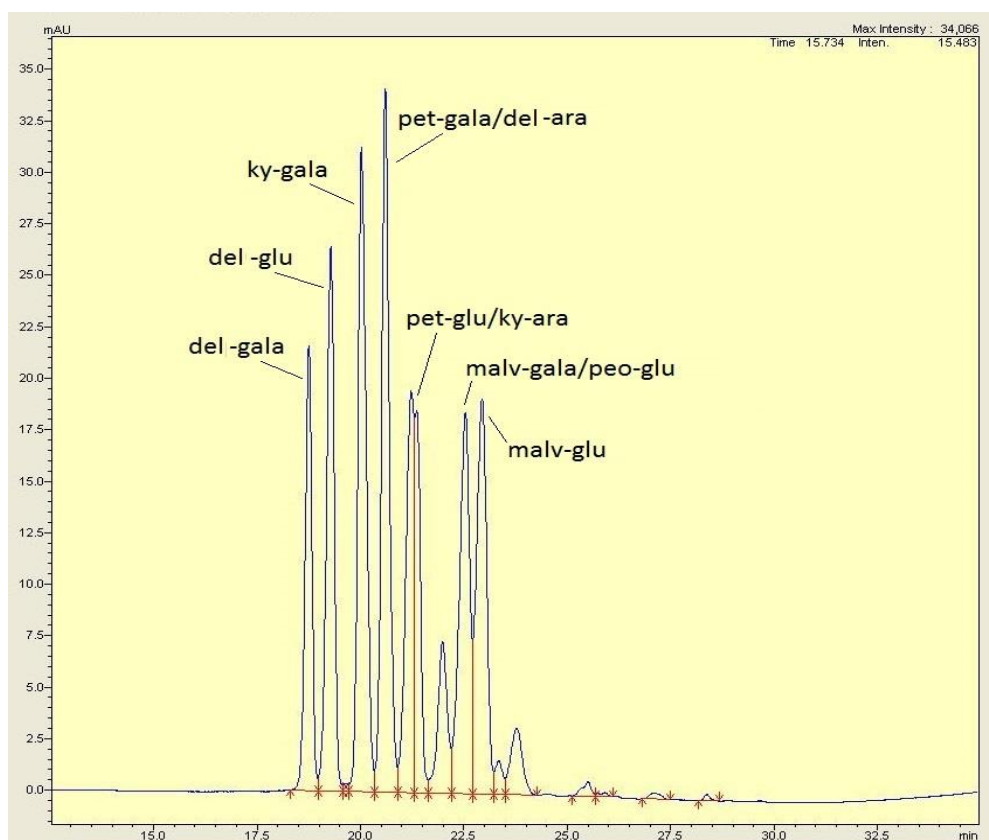
### 5.3.2 Stanovení anthokyanů v roztoku z plodů brusnice borůvky pomocí HPLC

Chromatogram vzorku brusnice borůvky naznačuje, že plody brusnice borůvky obsahují minimálně 10 různých anthokyanů (obr. 16). Na obrázku je vyznačen odhad identifikace anthokyanů podle chromatogramů standardů. Retenční časy jednotlivých standardů jsou uvedeny v tabulce 10. Některé standardy vykazovaly stejný retenční čas, a proto jsme nemohli s jistotou určit, který z nich je obsažen v brusnici borůvce, případně pokud tam jsou oba, v jaké míře. Ukázka chromatogramu jednoho ze standardů je na obr. 17.

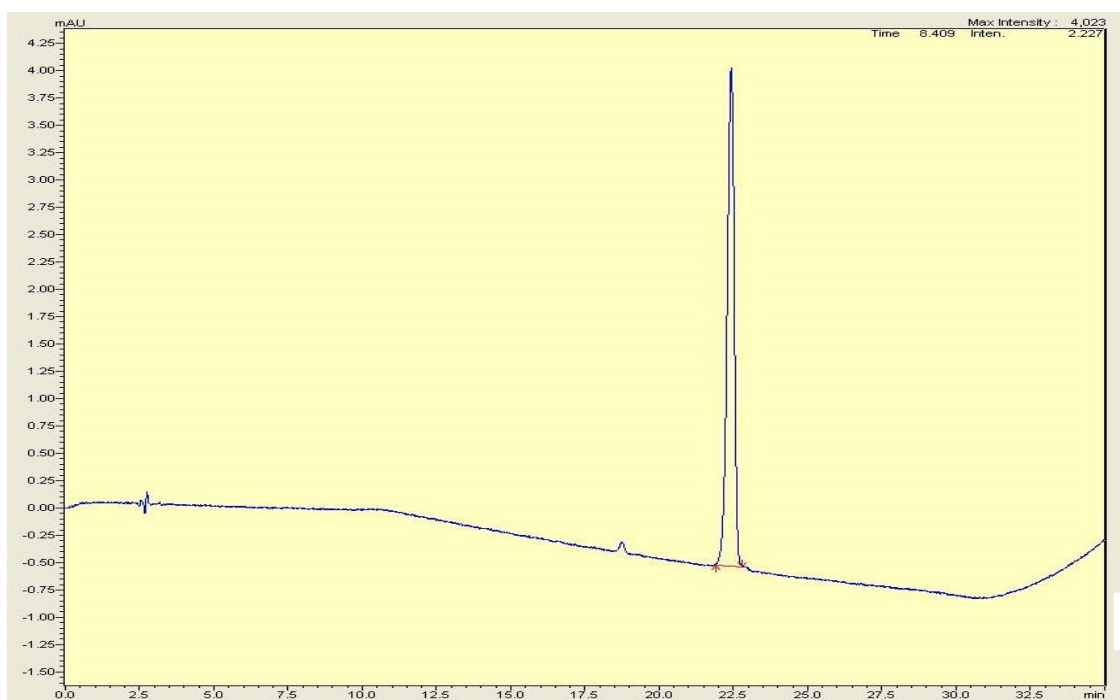
Dále jsme provedli měření vzorku roztoku z plodů brusnice borůvky s přidavkem standardů. To nám ukázalo, že ve vzorku brusnice borůvky mohou být obsaženy všechny z testovaných anthokyanů. Porovnání chromatogramu vzorku samotného s chromatogramy vzorku po přidavku malvidinu-3-*O*-galaktosidu a peonidinu-3-*O*-glukosidu můžete vidět na obr. 18.

Tab. 10 – Retenční časy jednotlivých standardů anthokyanů.

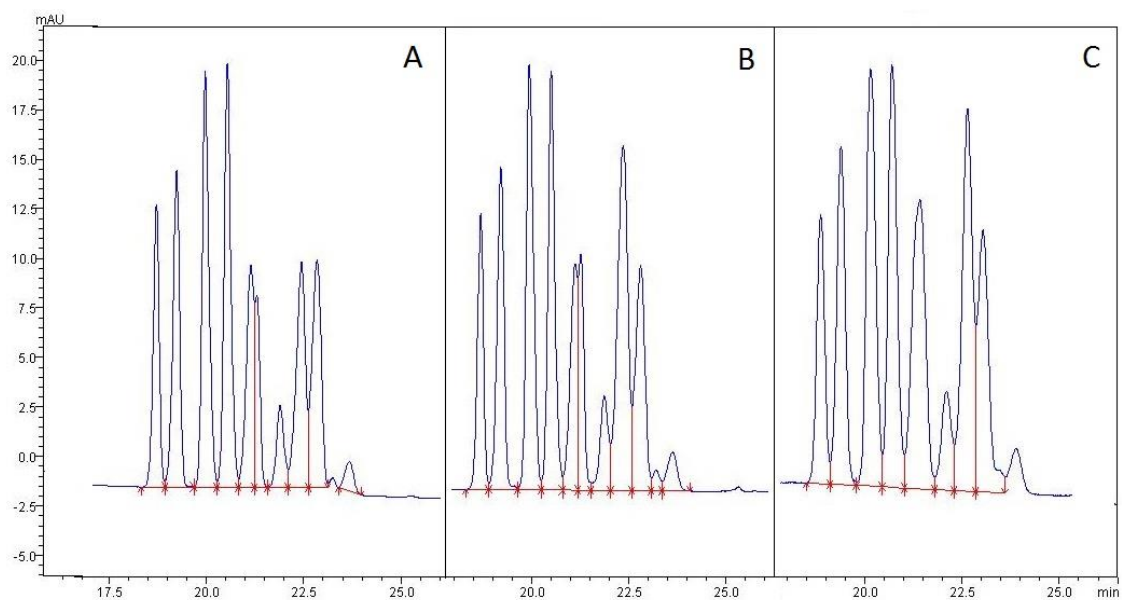
ANTHOKYAN	$t_R$ (min)
delfinidin-3- <i>O</i> -galaktosid	18,9
delfinidin-3- <i>O</i> -glukosid	19,2
kyanidin-3- <i>O</i> -galaktosid	20,1
petunidin-3- <i>O</i> -galaktosid	20,6
delfinidin-3- <i>O</i> -arabinosid	20,6
petunidin-3- <i>O</i> -glukosid	21,2
kyanidin-3- <i>O</i> -arabinosid	21,4
malvidin-3- <i>O</i> -galaktosid	22,4
peonidin-3- <i>O</i> -glukosid	22,6
malvidin-3- <i>O</i> -glukosid	22,9



Obr. 16 – Chromatogram vzorku brusnice borůvky s vyznačením odhadu identifikace jednotlivých anthokyanů. Del – delfinidin, ky – kyanidin, pet – petunidin, malv – malvidin, peo – peonidin, gala – galaktosid, glu – glukosid, ara – arabinosid.

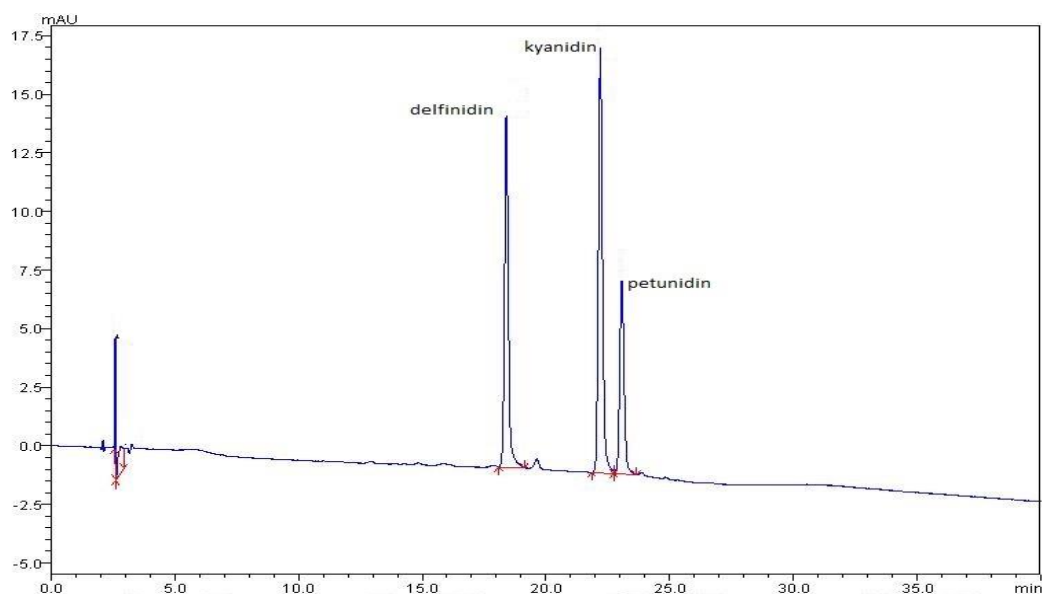


Obr. 17 – Ukázka chromatogramu jednoho ze standardů anthokyanů, malvidin-3-*O*-galaktosidu.



Obr. 18 – Porovnání chromatogramů vzorku roztoku brusnice borůvky (A) a téhož vzorku s přidavky standardů – malvidin-3-*O*-galaktosidu (B) a peonidin-3-*O*-glukosidu (C).

Dalším krokem při identifikaci jednotlivých anthokyanů byla jejich hydrolyza podle práce Dursta a Wrolstada (53), upraveno podle práce Kopečné Zapletalové (54) a následná HPLC analýza. Hydrolyzou je odštěpen glukosidový zbytek anthokyanů, získáme tedy neglykosidované anthokyanidiny. Analýzou hydrolyzovaného vzorku můžeme potvrdit nebo vyloučit přítomnost některých anthokyanů z analýzy nehydrolyzovaného vzorku. Současně s hydrolyzovaným vzorkem roztoku plodů brusnice borůvky byly nastříknuty i roztoky standardů vybraných anthokyanidinů (petunidinu, peonidinu, kyanidinu, delphinidinu a malvidinu). Chromatogram hydrolyzovaného vzorku s odhadem identifikace jednotlivých anthokyanidinů podle chromatogramů standardů je na obr. 19.



Obr. 19 – Chromatogram hydrolyzovaného vzorku roztoku z plodů brusnice borůvky.

Analýza hydrolyzovaného vzorku naznačila, že vzorek obsahuje minimálně 3 anthokyanidiny a podle chromatogramů standardů jsme určili, že to jsou delphinidin, kyanidin, a petunidin. Peonidin nebyl v hydrolyzovaném vzorku prokázán. Standard malvidinu byl pravděpodobně poškozen, poskytoval nejednoznačné chromatogramy s více píky, analýzu tedy nebylo možno správně provést a vyloučit nebo potvrdit přítomnost malvidinu ve vzorku. Ovšem po vyloučení přítomnosti peonidinu ve vzorku, byla přítomnost glukosidů malvidinu prokázána již po analýze nehydrolyzovaného vzorku (viz obr. 16).

Pro vybrané standardy anthokyanů (del-gala, del-glu, pet-gala, pet-glu, malv-gala, malv-glu a ky-gala) byla provedena kalibrace. Pro každý anthokyan bylo zvoleno pět koncentračních hladin a každý bod byl průměrem pěti měření. Rovnice regrese s hodnotami spolehlivosti shrnuje tabulka 11.

Tab. 11 – Rovnice regrese a hodnoty spolehlivosti při kalibraci anthokyanů. Hodnota „x“ je koncentrace v  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a „y“ je výška píku.

<b>anthokyan</b>	<b>rovnice regrese</b>	<b>hodnota spolehlivosti R<sup>2</sup></b>
del-gala	$y=6\,611,09x + 167,48$	0,9993
del-glu	$y=6\,258,26x + 120,922$	0,9988
pet-gala	$y=2\,969,06x + 1758,91$	0,9971
pet-glu	$y=6\,639,42x + 231,052$	0,9995
malv-gala	$y=7\,527,28x + 222,577$	0,9998
malv-glu	$y=6\,077,15x + -253,851$	0,9980
ky-gala	$y=3\,653,08x + 351,0045$	0,9959

Z těchto dat byla ve vzorku výpočtem stanovena koncentrace anthokyanů del-gala ( $1,62\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), del-glu ( $1,96\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), malv-gala ( $1,29\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a malv-glu ( $1,69\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Přesné koncentrace dalších anthokyanů nebylo možné určit, protože nebyly v nehydrolyzovaném vzorku jednoznačně rozlišeny.

## **5.4 STANOVENÍ VLIVU VYBRANÝCH DOPLŇKŮ STRAVY NA JATERNÍ CYTOCHROMY P450 POMOCÍ MARKEROVÝCH SUBSTRÁTŮ**

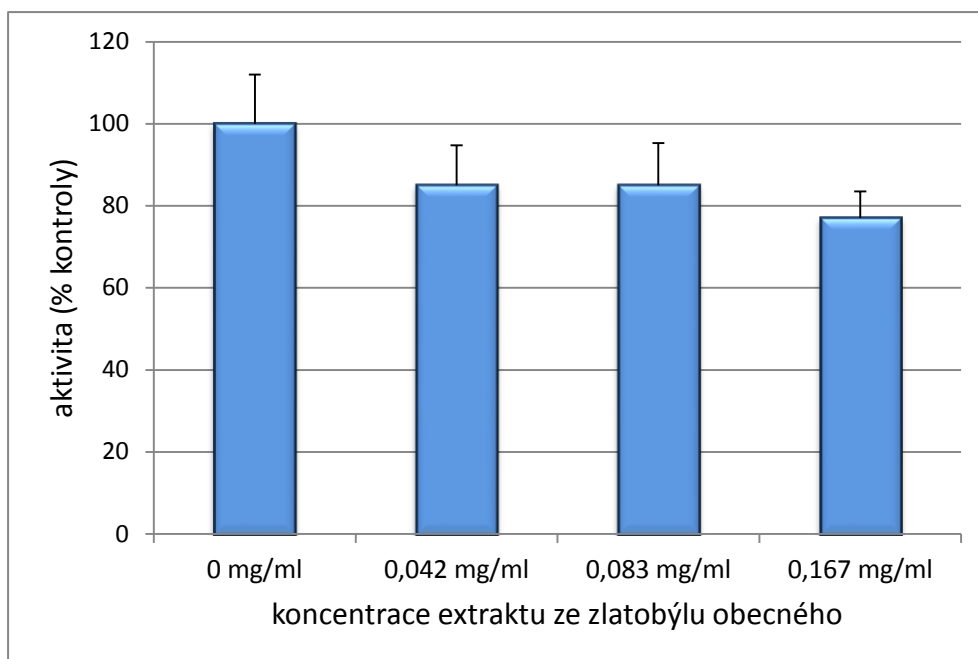
### **5.4.1 Stanovení vlivu extraktu ze zlatobýlu obecného na jaterní cytochromy P450 v mikrosomální frakci a v primárních kulturách lidských hepatocytů**

Vliv extraktu ze zlatobýlu obecného na aktivitu jaterních CYP v mikrosomální frakci byl měřen pomocí markerových substrátů pro CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4 (tab. 9) s HPLC detekcí produktů reakce. Měření bylo prováděno v koncentračních hladinách 0,042; 0,083 a 0,167 mg·ml<sup>-1</sup> extraktu ze zlatobýlu obecného. Výsledky ovlivnění enzymových aktivit byly stanoveny ve dvou paralelních měřeních jako procentuální úbytek metabolitu markerového substrátu proti kontrole, kde nebyl extrakt ze zlatobýlu obecného přidán do reakční směsi.

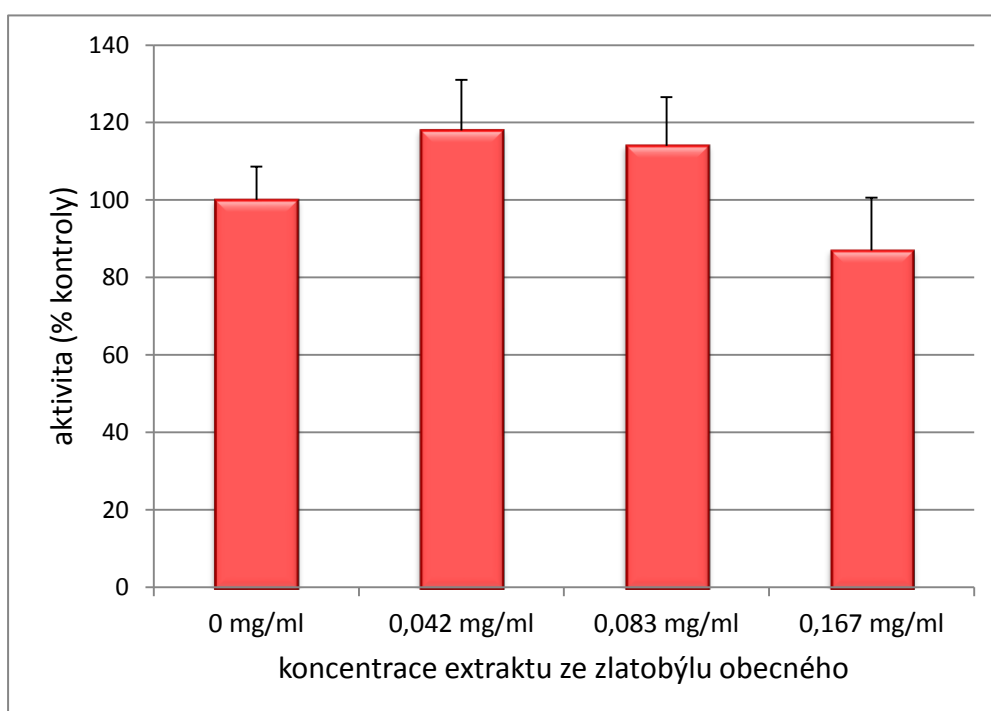
Dále byl vliv extraktu ze zlatobýlu obecného na aktivitu CYP měřen i v primárních kulturách lidských hepatocytů (LH 63 a LH 64). Experimenty byly prováděny v duplikátech s detekcí metabolitů pomocí HPLC metod. Koncentrační hladiny extraktu ze zlatobýlu obecného byly 0,042; 0,083; 0,167 mg·ml<sup>-1</sup>.

Při měření vlivu extraktu ze zlatobýlu obecného na aktivitu CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4 v lidské mikrosomální frakci jater se neprojevila signifikantní změna aktivity žádného z testovaných CYP v žádné koncentrační hladině použitého extraktu. Tyto závěry byly potvrzeny i při měření změn aktivit těchto CYP v primárních kulturách lidských hepatocytů. Výsledky měření vlivu extraktu ze zlatobýlu obecného na mikrosomální jaterní CYP jsou shrnuty na obr. 20-24. Vliv extraktu zlatobýlu obecného na CYP v primárních kulturách lidských hepatocytů je znázorněn na obr. 25.

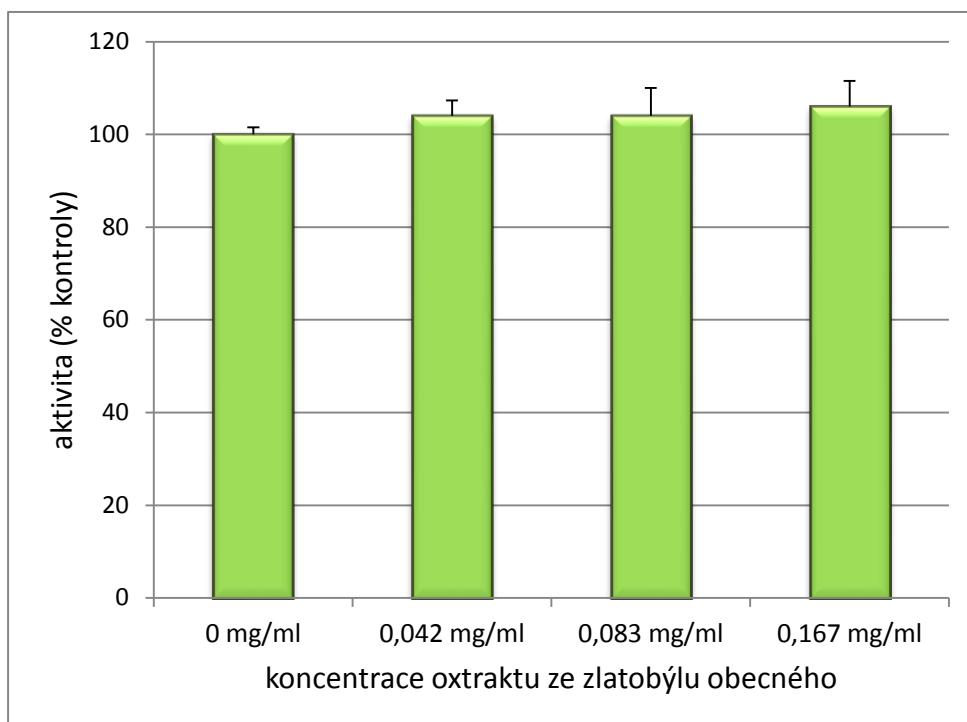




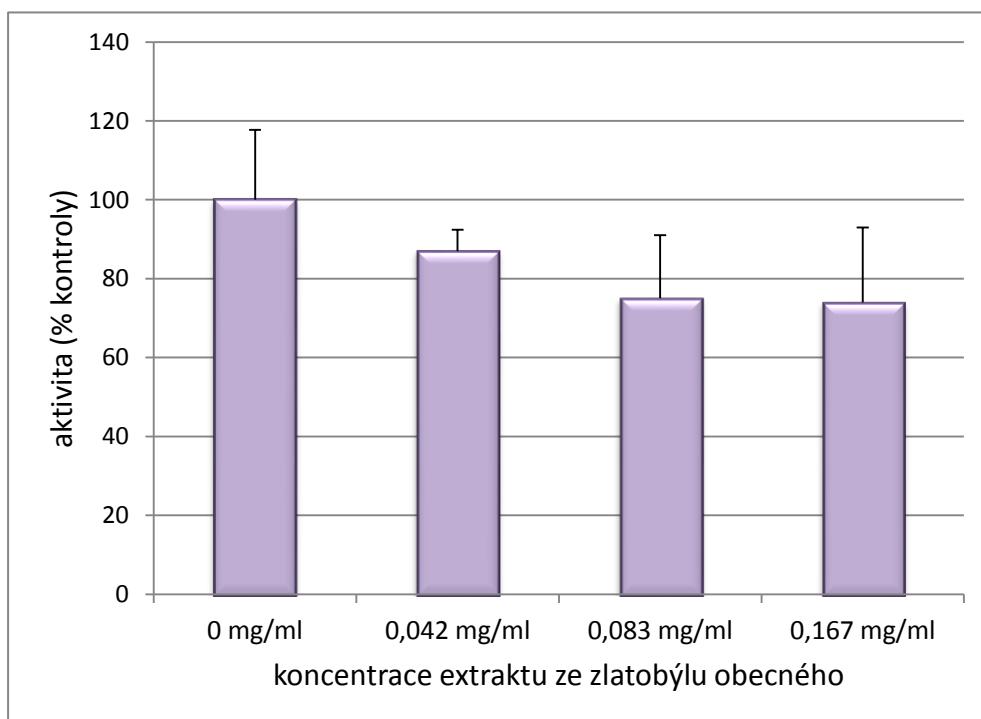
Obr. 20 – Vliv extraktu ze zlatobýlu obecného na aktivitu jaterního mikrosomálního CYP 1A2 pomocí markerového substrátu fenacetinu.



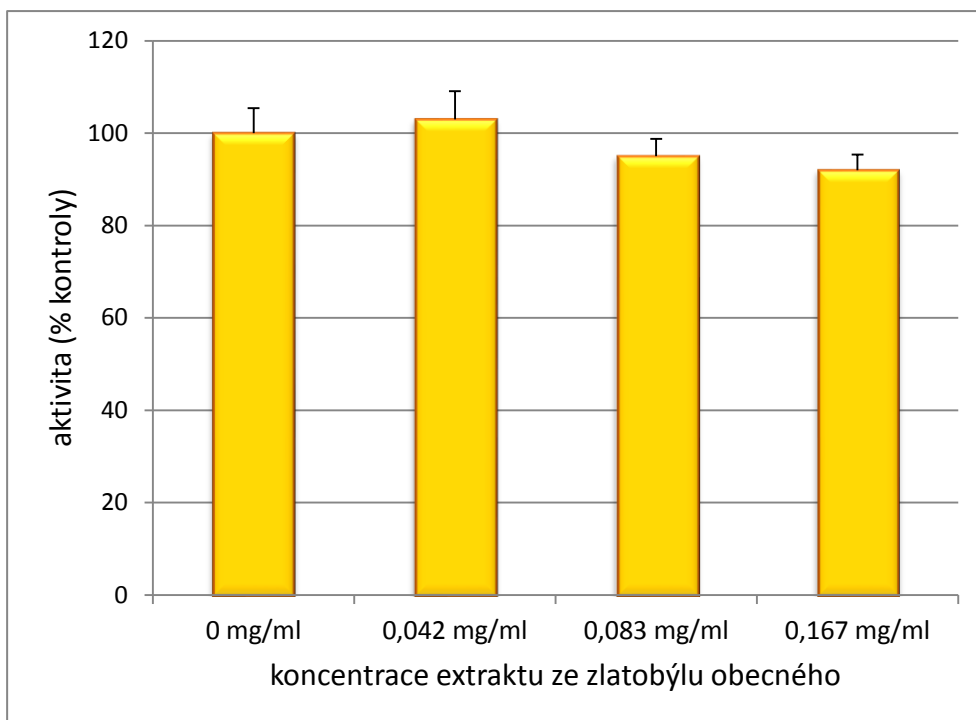
Obr. 21 – Vliv extraktu zlatobýlu obecného na aktivitu jaterního mikrosomálního CYP 2A6 pomocí markerového substrátu kumarinu.



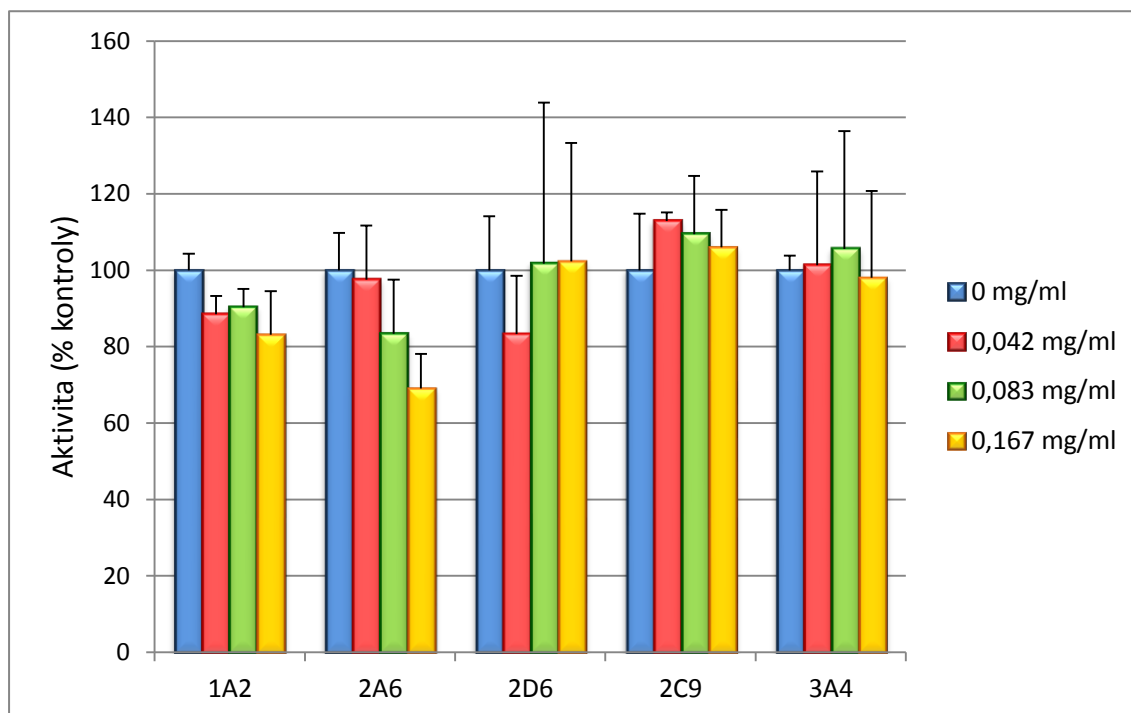
Obr. 22 – Vliv extraktu ze zlatobýlu obecného na aktivitu jaterního mikrosomálního CYP 2C9 pomocí markerového substrátu warfarinu.



Obr. 23 – Vliv extraktu zlatobýlu obecného na aktivitu jaterního mikrosomálního CYP 2D6 pomocí markerového substrátu bufuralolu.



Obr. 24 – Vliv extraktu zlatobýlu obecného na aktivitu jaterního mikrosomálního CYP 3A4 pomocí markerového substrátu testosteronu.

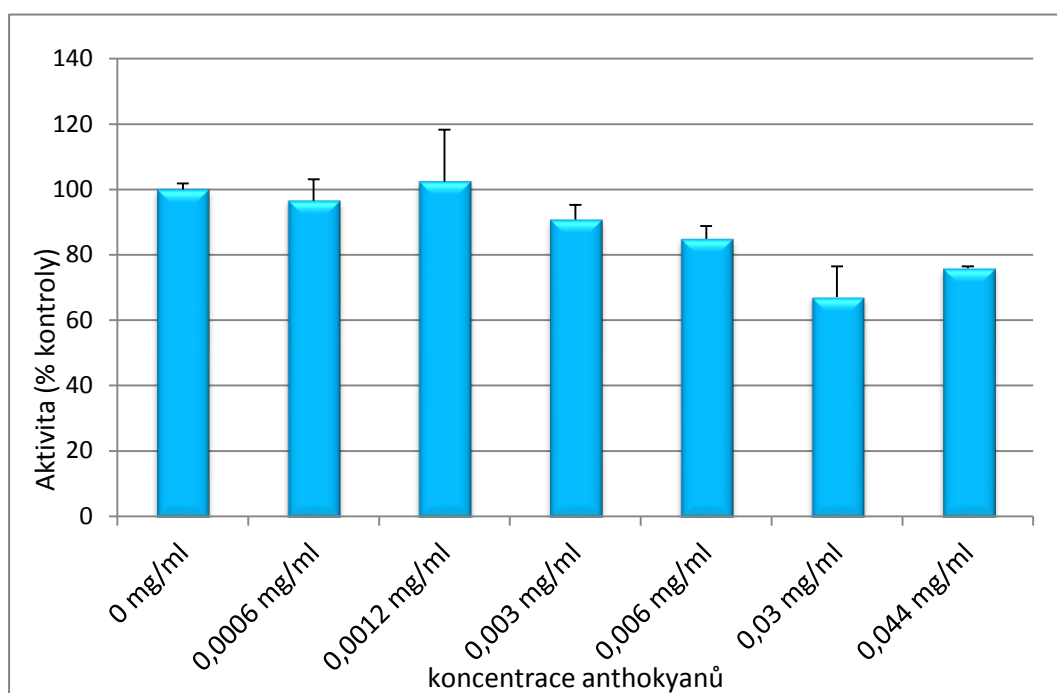


Obr. 25 Vliv extraktu ze zlatobýlu obecného na aktivitu CYP v primární kultuře lidských hepatocytů.

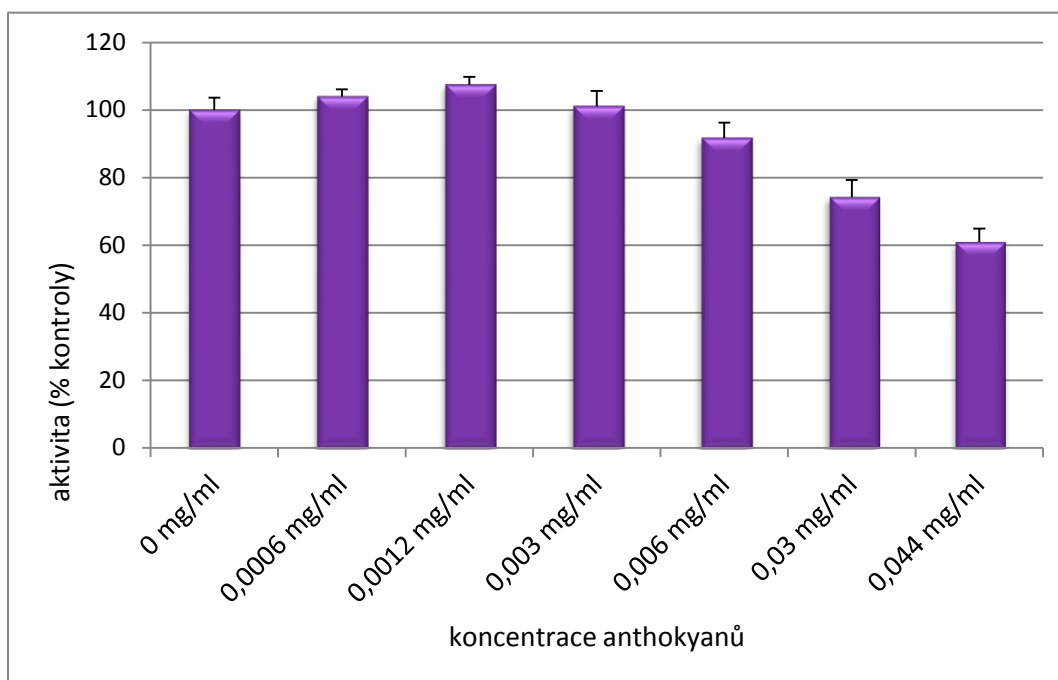
#### 5.4.2 Stanovení vlivu roztoku plodů brusnice borůvky na aktivitu jaterních cytochromů P450

Vliv roztoku z plodů brusnice borůvky na aktivitu cytochromů P450 byl studován pomocí markerového substrátu warfarinu, na jehož metabolismu se podílí více forem CYP. V našem experimentu jsme sledovali změnu aktivity CYP1A1/2, CYP2C9, CYP2C8/9, CYP2C18/19 a CYP3A4. Detekce jednotlivých metabolitů byla prováděna s využitím HPLC (viz kap. 4.3.8.2). Měření bylo provedeno v dubletu v koncentračních hladinách anthokyanů 0,0006; 0,0012; 0,003; 0,006; 0,03 a 0,044 mg na 1 ml reakční směsi (určeno na základě spektrofotometrického stanovení celkové koncentrace anthokyanů v plodech brusnice borůvky) (51). Nejmenší koncentrace odpovídá konzumaci přibližně 100 g plodů brusnice borůvky. Míra vlivu roztoku z plodů brusnice borůvky na aktivity jednotlivých forem CYP je vyjádřena jako procentuální úbytek sledovaného metabolitu markerového substrátu warfarinu v reakční směsi oproti kontrole, která roztok z plodů brusnice borůvky neobsahovala.

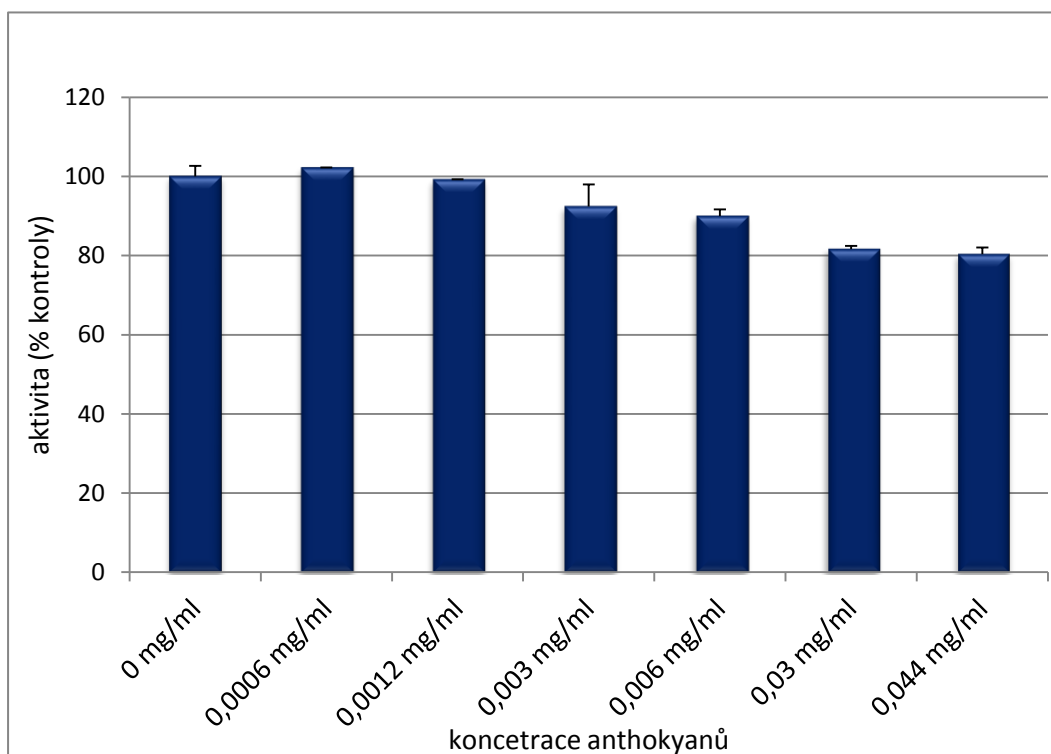
Z výsledků je patrný mírný inhibiční efekt na CYP2C8/9 a CYP2C18/19 (aktivita klesla na 60,9 % původní aktivity) a CYP3A4 (aktivita byla snížena přibližně o 33 %), ovšem až ve velmi vysokých koncentracích anthokyanů, které by odpovídaly konzumaci až 7 500 g plodů brusnice borůvky. Grafy popisující efekt roztoku plodů brusnice borůvky na jednotlivé CYP shrnují obr. 26-29.



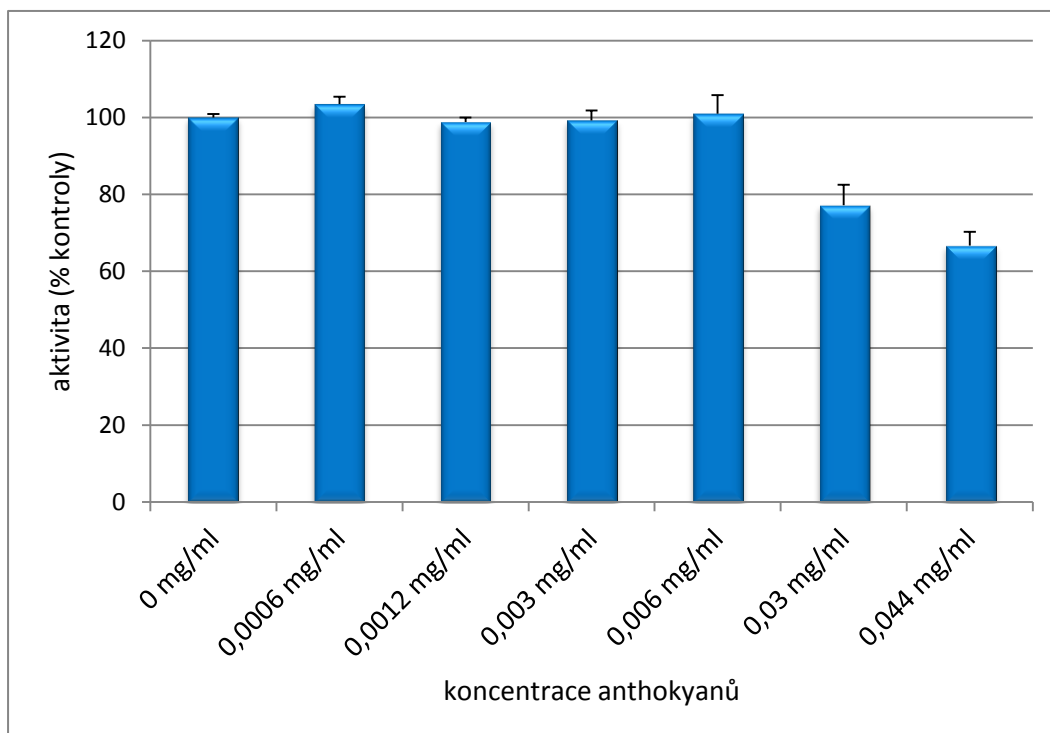
Obr. 26 – Vliv roztoku z plodů brusnice borůvky na aktivitu jaterního CYP 1A1/2 pomocí přeměny markerového substrátu warfarinu na 6-OH-warfarin (fluorescenční detekce).



Obr. 27 – Vliv roztoku z plodů brusnice borůvky na aktivitu jaterního CYP 2C9/2C18 pomocí přeměny markerového substrátu warfarinu na 4-OH-warfarin (UV detekce).



Obr. 28 – Vliv roztoku z plodů brusnice borůvky na aktivitu jaterního CYP 2C9 pomocí přeměny markerového substrátu warfarinu na 7-OH-warfarin (fluorescenční detekce).



Obr. 29 – Vliv roztoku z plodů brusnice borůvky na aktivitu jaterního CYP 3A4 pomocí přeměny markerového substrátu warfarinu na 10-OH-warfarin (UV detekce).

## 6 DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat vybrané doplňky stravy nebo přírodní látky s pozitivním efektem na lidský organismus a zjistit, zda ovlivňují aktivitu zvolených cytochromů P450. Pokud by tyto látky ovlivňovaly aktivitu některých typů cytochromů P450, mohlo by při současné konzumaci léčiv dojít k nežádoucím lékovým interakcím na úrovni metabolismu a případnému ovlivnění léčby pacienta. Předmětem našeho výzkumu byly dvě součásti doplňků stravy – zlatobýl obecný a brusnice borůvka.

Zlatobýl obecný je oblíbenou rostlinou při léčbě močových cest a zánětlivých onemocnění. Obsahuje velmi mnoho různých účinných látek, ovšem za diuretické, analgetické a antiflogistické účinky je z velké části zodpovědný fenolický glykosid leiokarposid (7,8). Jeho množství v komerčně používaném extraktu zlatobýlu obecného bylo měřeno i v rámci této diplomové práce s využitím HPLC podle publikované metody (10). Naší analýzou jsme zjistili, že podíl leiokarposidu v extraktu ze zlatobýlu obecného je 0,033 %. Tyto výsledky jsou nižší než očekávané. V práci Thiem a kol. (10) se podíl leiokarposidu pohyboval v rozmezí 0,14-0,24 % v sušině, v závislosti na roku sklizně. Ještě větší podíl leiokarposidu v sušině byl zjištěn v práci Barbary Kolodziej (62), pohyboval se v rozmezí 0,47-1,17 % v závislosti na podmínkách, ve kterých byla rostlina pěstována.

Obsah leiokarposidu jsme dále zjišťovali také v odvaru a výluhu připraveném podle návodu na obalu používané čajové sušiny (po 15 min louhování). Současně jsme sledovali změnu obsahu leiokarposidu v odvaru a výluhu v závislosti na délce přípravy. V případě odvaru s časem obsah leiokarposidu mírně klesá (0,09 – 0,07 mg·ml<sup>-1</sup>), pokles však není významný a mohl by být způsoben možným tepelným rozkladem leiokarposidu vlivem varu. Obsah leiokarposidu ve výluhu s časem naopak mírně stoupá, ale také se nejedná o výrazný rozdíl (0,02 – 0,03 mg·ml<sup>-1</sup>). Celkově je obsah leiokarposidu vyšší v odvaru, je tedy zjevné, že způsob přípravy má vliv na celkový obsah leiokarposidu.

V předešlých letech bylo provedeno velmi mnoho testů zaměřujících se na účinky zlatobýlu obecného na organismus, ovšem jen velmi málo studií, které by se zaměřovaly na vliv této byliny na CYP. Byl například testován vliv produktu obsahující zlatobýl obecný Solidanin<sup>®</sup> na expresi genu pro CYP3A4 a CYP1A2, kdy bylo zjištěno,

že tento produkt nemá vliv na expresi genu pro CYP1A2, ale dochází ke slabé signifikantní indukci genu pro CYP3A4 u LS180 buněk – buněk karcinomu tlustého střeva (63). Nádorové buňky a exprese genů v nich ovšem mohou vykazovat odlišné chování oproti zdravým buňkám.

Při našem měření vlivu extraktu ze zlatobýlu obecného na aktivity CYP v mikrosomální frakci bylo zjištěno, že extrakt nemá významný vliv na žádný z testovaných cytochromů P450 v žádné z testovaných koncentračních hladin. Testování na primárních kulturách lidských hepatocytů vedlo ke stejným výsledkům. Nejvýraznější, přesto statisticky nevýznamná, byla mírná inhibice aktivity CYP2D6 v mikrosomální frakci (aktivita klesla na 74 % původní aktivity), ovšem při měření vlivu na CYP v primárních kulturách lidských hepatocytů se tento trend neprojevil.

Při zjišťování vlivu extraktu ze zlatobýlu obecného na jaterní CYP se při měření s využitím lidských hepatocytů projevila v měření relativně velká směrodatná odchylka. To by mohlo být dáno tím, že hepatocyty jsou biologickým materiálem, výsledky jsou velice závislé na dárci, jeho životosprávě, pohlaví, věku apod., proto se experimenty musí několikrát opakovat, aby se získaly jednoznačné výsledky.

Druhou zkoumanou bylinou byla brusnice borůvka. Tato rostlina je staletí používanou bylinou při průjmech, zánětlivých onemocněních, k desinfekci dutiny ústní apod. Za léčivé účinky při průjmech odpovídají třísloviny, které jsou významnou složkou listů i plodů. Antioxidační, antidiabetické, protizánětlivé a antiobesitní účinky brusnice borůvky jsou připisovány především anthokyanům (16,19–22).

Plody brusnice borůvky použité v této práci byly charakterizovány podle celkového množství anthokyanů spektrofotometrickou metodou podle Leea a kol. (51). Celkové množství anthokyanů v plodech brusnice borůvky bylo stanoveno na 330 mg/100 g. Tato hodnota je porovnatelná s výsledky z jiných prací, například v roce 2010 Garzón a kol. (64) stanovili množství anthokyanů v borůvce na  $329 \pm 28$  mg/100 g borůvek. K obdobnému výsledku došli i Prior a kol. (300 mg/100 g) (65), a Vasco a kol. (66) zjistili obdobné hodnoty pro *Vaccinium floribundum* (345 mg/100 g).

Pro přesnější charakterizaci plodů borůvek byly identifikovány jednotlivé anthokyaniny obsažené v roztoku metodou HPLC podle Dursta a Wrolstada (53). Pro porovnání bylo zvoleno 10 standardů nejběžněji se vyskytujících anthokyanů. Chromatogram naznačil, že roztok plodů brusnice borůvky obsahuje nejméně 10 různých anthokyanů. Tyto analýzy naznačily, že vzorek obsahuje v určité míře všechny testované anthokyaniny. Pro lepší identifikaci jednotlivých anthokyanů byla dále



provedena hydrolýza vzorku metodou podle Dursta a Wrolstada (53) upravenou podle práce Kopečné Zapletalové (54). Na chromatogramu byly patrné tři píky, které vzhledem k retenčním časům odpovídaly 3 anthokyanidinům (delfinidinu, kyanidinu, a petunidinu). Standard malvidinu nebyl nalezen, nicméně analýza nehydrolyzovaného vzorku přítomnost glykosidů tohoto anthokyanidinu potvrdila. Přítomnost peonidinu ve vzorku byla touto analýzou vyloučena. Bylo zjištěno, že nejvýznamnějšími anthokyany v roztoku plodů brusnice borůvky jsou delfinidin-3-galaktosid, delfinidin-3-glukosid, delfinidin-3-arabinosid, kyanidin-3-galaktosid, kyanidin-3-arabinosid, petunidin-3-galaktosid, petunidin-3-glukosid, malvidin-3-galaktosid a malvidin-3-glukosid. Toto složení odpovídá i dříve publikovaným pracím Kähkönen a kol. (17), Jovančević a kol. (67) nebo Lätti a kol. (68).

V posledních několika letech se brusnice borůvka opět vrátila do pozornosti vědců. Bylo publikováno mnoho prací o jejích blahodárných účincích na lidský organismus. Interakcemi účinných látek obsažených v brusnici borůvce s jaterními cytochromy P450 se ovšem zabývalo mnohem méně prací. Voll v rámci své diplomové práce (69) studovala vliv extraktu z brusnice borůvky na CYP1A a CYP3A v prasečí mikrosomální frakci. Zjistila mírný inhibiční efekt tohoto extraktu na CYP1A, která se ovšem projevila pouze u mikrosomů ze samce prasete.

V této diplomové práci byl studován vliv na lidské mikrosomální CYP1A1/1A2, CYP2C9 a CYP3A4. Inhibiční vliv na CYP1A1/1A2 nebyl tak výrazný jako ve výše zmíněné práci, nicméně byl také zaznamenán. Aktivita těchto CYP v našich experimentech klesla na 67 % původní aktivity. Inhibiční vliv byl také zaznamenán u přeměny warfarinu na 4-OH-warfarin za účasti CYP2C8/9/18/19 (aktivita klesla na 61 % původní aktivity), ovšem při přeměně na 7-OH-warfarin za účasti stejného CYP2C9 (ale také CYP1A1/1A2 a CYP2C8) nebyl tento efekt tak výrazný, aktivita poklesla pouze na 80 %. Výraznější pokles aktivity v případě vzniku 4-OH-warfarinu lze přisoudit dalším formám CYP, které se této přeměny účastní, zejména pak CYP2C18. Za inhibici tohoto cytochromu P450 pravděpodobně z největší části odpovídá anthokyanin delfinidin-3-glukosid a kyaniny (70). Roztok plodů brusnice borůvky ovlivnil mírně i aktivitu CYP3A4, poklesla na 67 % původní aktivity. Tento výsledek podporuje práce Srovnalové a kol. (70), která popisuje efekt jednotlivých anthokyanů na aktivitu vybraných CYP, kde byla aktivita CYP3A4 inhibována v různé míře téměř všemi testovanými anthokyany. Žádný z testovaných CYP ovšem nebyl

roztokem plodů borůvek ovlivněn natolik, aby byla výrazným způsobem ovlivněna metabolizace současně podávaného léčiva.

## 7 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala vlivem vybraných účinných látek z doplňků stravy na jaterní cytochromy P450 v lidské mikrosomální frakci a na primárních kulturách lidských hepatocytů. Zároveň byly provedeny analýzy ke kvantifikaci hlavních účinných látek v těchto součástech doplňků stravy.

Prvním ze zkoumaných doplňků byl komerčně používaný extrakt ze zlatobýlu obecného. Zlatobýl obecný vykazuje mnoho blahodárných účinků na lidské zdraví a je využíván i v tradičních medicínách. Za hlavní účinnou látku, která je odpovědná za převážnou většinu těchto účinků, je považován fenolický glykosid leiokarposid. Byla provedena validace HPLC metody ke kvantifikaci množství leiokarposidu a následné stanovení koncentrace leiokarposidu v extraktu ze zlatobýlu obecného. Celkový obsah byl  $3,79 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , tedy asi 0,033 %.

Bylo provedeno měření vlivu extraktu ze zlatobýlu obecného na aktivitu vybraných CYP v lidské mikrosomální frakci a na dvou primárních kulturách lidských hepatocytů. Aktivita vybraných CYP byla vyhodnocena pomocí HPLC metod s využitím specifických substrátů. Extrakt ze zlatobýlu obecného nevykazoval významnou změnu aktivity žádného z testovaných CYP a to v žádné ze studovaných koncentračních hladin.

Druhou testovanou součástí doplňků stravy byly plody brusnice borůvky využívané v tradičních medicínách již celá staletí. Jednou z významných součástí této rostliny jsou anthokyany, které vykazují velmi mnoho různých blahodárných účinků na lidský organismus. Spektrofotometrickou metodou bylo stanoveno celkové množství anthokyanů v plodech brusnice borůvky na (vztaženo na kyanidin-3-glukosid)  $3301,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . S využitím HPLC bylo zjištěno, že nejvýznamnějšími anthokyany ve vzorku jsou delfinidin-3-*O*-galaktosid, delfinidin-3-*O*-glukosid, delfinidin-3-*O*-arabinosid, kyanidin-3-*O*-galaktosid, kyanidin-3-*O*-arabinosid, petunidin-3-*O*-galaktosid, petunidin-3-*O*-glukosid, malvidin-3-*O*-galaktosid a malvidin-3-*O*-glukosid.

Dále byl studován vliv roztoku plodů borůvek na vybrané CYP s využitím warfarinu jako specifického substrátu pro několik cytochromů P450. Mírná inhibice aktivity byla zaznamenána u CYP1A1/1A2 (až 72 % původní aktivity), CYP2C9/2C18 (až 61 % původní aktivity) a CYP3A4 (až 66 % původní aktivity). Tyto inhibice ovšem

nejsou natolik významné, aby byla výrazným způsobem ovlivněna metabolizace současně podávaných léčiv.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) Zákon O Potravinách a Tabákových Výrobcích a O Změně a Doplnění Některých Souvisejících Zákonů; 1997; Vol. 1997.
- (2) Šípal, Z.; Anzenbacher, P.; Peč, P.; Pospíšil, J.; Růžička, I. *Biochemie*; Státní pedagogické nakladatelství: Praha, 1992.
- (3) Vodrážka, Z. *Biochemie pro studenty středních škol a všechny, které láká tajemství živé přírody*; Scientia: Praha, 1998.
- (4) Toxicology - Prof. RNDr. Jiří Patočka, DrSc - *Solidago virgaurea*: obsahové látky <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=print&sid=443> (accessed May 2, 2016).
- (5) Slavík, B.; Štěpánková, J. *Květena České Republiky 7*; Academia: Praha, 2004.
- (6) Nijveldt, R. J.; Nood, E. van; Hoorn, D. E. van; Boelens, P. G.; Norren, K. van; Leeuwen, P. A. van. *Flavonoids: A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications*. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, 74 (4), 418–425.
- (7) *Assesment Report for Herbal Substance(s), Herbal Preparation(s) or Combinations Thereof with Traditional Use Solidago Virgaurea L., Herba*. European Medicines Agency 2008.
- (8) Bisset, N. G.; Wichtl, M. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*; Medpharm: Stuttgart, 1994.
- (9) Kalemba, D. *Constituents of the Essential Oil of Solidago Virgaurea L. Flavour Fragr. J.* **1998**, 13 (6), 373–376.
- (10) Thiem, B.; Wesołowska, M.; Skrzypczak, L.; Budzianowsky, J. *Phenolic Compounds in Two Solidago L. Species from in Vitro Culture*. *Pol. Pharm. Soc.* **2001**, 58 (4), 277–281.
- (11) Thiem, B.; Goślińska, O. *Antimicrobial Activity of Solidago Virgaurea L. from in Vitro Cultures*. *Fitoterapia* **2002**, 73 (6), 514–516.
- (12) Demir, H.; Açı̇k, L.; Bali, E. B.; Koç, L. Y.; Kaynak, G. *Antioxidant and Antimicrobial Activities of Solidago Virgaurea Extracts*. *Afr. J. Biotechnol.* **2009**, 8 (2), 274–279.
- (13) Korbelář, J.; Endris, Z. *Naše Rostliny v Lékařství*; Avicenum: Praha, 1973.
- (14) Janča, J.; Zentrich, J. A. *Herbář Léčivých Rostlin. Díl 1*; Eminent: Praha, 1994.
- (15) Jirásek, V.; Starý, F. *Atlas Léčivých Rostlin*; Státní pedagogické nakladatelství: Praha, 1986.
- (16) Chu, W.; Cheung, S. C. M.; Lau, R. A. W.; Benzie, I. F. F. *Bilberry (Vaccinium Myrtillus L.)*. In *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*; Benzie, I. F. F., Wachtel-Galor, S., Eds.; CRC Press: Broken Sound Parkway NW, 2011; pp 55–71.
- (17) Kähkönen, M. P.; Heinämäki, J.; Ollilainen, V.; Heinonen, M. *Berry Anthocyanins: Isolation, Identification and Antioxidant Activities*. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, 83 (14), 1403–1411.
- (18) Bagchi, D.; Sen, C. K.; Bagchi, M.; Atalay, M. *Anti-Angiogenic, Antioxidant, and Anti-Carcinogenic Properties of a Novel Anthocyanin-Rich Berry Extract Formula*. *Biochem. Mosc.* **2004**, 69 (1), 75–80.
- (19) Zafra-Stone, S.; Yasmin, T.; Bagchi, M.; Chatterjee, A.; Vinson, J. A.; Bagchi, D. *Berry Anthocyanins as Novel Antioxidants in Human Health and Disease Prevention*. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, 51 (6), 675–683.

- (20) Youdim, K. A.; Shukitt-Hale, B.; MacKinnon, S.; Kalt, W.; Joseph, J. A. Polyphenolics Enhance Red Blood Cell Resistance to Oxidative Stress: In Vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2000**, 1523 (1), 117–122.
- (21) Kong, J.-M.; Chia, L.-S.; Goh, N.-K.; Chia, T.-F.; Brouillard, R. Analysis and Biological Activities of Anthocyanins. *Phytochemistry* **2003**, 64 (5), 923–933.
- (22) Tsuda, T.; Horio, F.; Uchida, K.; Aoki, H.; Osawa, T. Dietary Cyanidin 3-O- $\beta$ -D-Glucoside-Rich Purple Corn Color Prevents Obesity and Ameliorates Hyperglycemia in Mice. *J. Nutr.* **2003**, 133 (7), 2125–2130.
- (23) Seeram, N. P. Berry Fruits for Cancer Prevention: Current Status and Future Prospects. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56 (3), 630–635.
- (24) Wang, L.-S.; Stoner, G. D. Anthocyanins and Their Role in Cancer Prevention. *Cancer Lett.* **2008**, 269 (2), 281–290.
- (25) Martínková, J.; Chládek, J.; Mičuda, S.; Cermanová, J.; Grim, J. *Obecná Farmakologie*; Olga Čermáková: Hradec Králové, 2001.
- (26) Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E. Drug-Metabolizing Enzymes – An Overview. In *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*; Anzenbacher, P., Zanger, U. M., Eds.; Wiley-VCH Verlag & Co.: Weinheim, Germany, 2012; pp 3–25.
- (27) Parkinson, A.; Ogilvie, B. W.; Paris, B. L.; Hensley, T. N.; Loewen, G. J. Human Biotransformation. In *Biotransformation and metabolite elucidation of xenobiotics*; Nassar, A. F., Eds.; John Wiley & Sons, 2010.
- (28) Parkinson, A.; Ogilvie, B. W. Biotransformation of Xenobiotics. In *Casarett and Doull's toxicology, the basic science of poisons*; Klaassen, C. D., Eds.; The McGraw-Hill Companies, 2008.
- (29) Handschin, C.; Meyer, U. A. Induction of Drug Metabolism: The Role of Nuclear Receptors. *Pharmacol. Rev.* **2003**, 55 (4), 649–673.
- (30) Josephy, P. D.; Guengerich, F. P.; Miners, J. O. “Phase I and Phase II” Drug Metabolism: Terminology That We Should Phase Out? *Drug Metab. Rev.* **2005**, 37 (4), 575–580.
- (31) Guengerich, F. P. Cytochromes P450. In *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*; Anzenbacher, P., Zanger, U. M., Eds.; Wiley-VCH Verlag & Co.: Weinheim, Germany, 2012; pp 27–66.
- (32) Stiborová, M.; Hudeček, J.; Hodek, P.; Frei, E. Význam Cytochromů P450 pro Lidské Zdraví. *Chem. Listy* **1999**, 93, 229–237.
- (33) Poulos, T. L.; Johnson, E. F. Structures of Cytochrome P450 Enzymes. In *Cytochrome P450 Structure, Mechanism, and Biochemistry*; Ortiz de Montellano, P. R., Eds.; Springer: Switzerland, 2015; pp 3–32.
- (34) Meunier, B.; de Visser, S. P.; Shaik, S. Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Rev.* **2004**, 104 (9), 3947–3980.
- (35) Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chem. Rev.* **2005**, 105 (6), 2253–2278.
- (36) Werck-Reichhart, D.; Feyereisen, R. Cytochromes P450: A Success Story. *Genome Biol.* **2000**, 1 (6), 3003.1–3003.9.
- (37) Nebert, D. W.; Russell, D. W. Clinical Importance of the Cytochromes P450. *The Lancet* **2002**, 360 (9340), 1155–1162.
- (38) Rendic, S.; Carlo, F. J. D. Human Cytochrome P450 Enzymes: A Status Report Summarizing Their Reactions, Substrates, Inducers, and Inhibitors. *Drug Metab. Rev.* **1997**, 29 (1–2), 413–580.

- (39) D W Nebert; Gonzalez, and F. J. P450 Genes: Structure, Evolution, and Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, 56 (1), 945–993.
- (40) Evans, W. E.; Relling, M. V. Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. *Science* **1999**, 286 (5439), 487–491.
- (41) Ingelman-Sundberg, M. Human Drug Metabolising Cytochrome P450 Enzymes: Properties and Polymorphisms. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2003**, 369 (1), 89–104.
- (42) Reynald, R. L.; Sansen, S.; Stout, C. D.; Johnson, E. F. Structural Characterization of Human Cytochrome P450 2C19: Active Site Differences between P450s 2C8, 2C9, and 2C19. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287 (53), 44581–44591.
- (43) Guengerich, F. P. Human Cytochrome P450 Enzymes. In *Cytochrome P450 Structure, Mechanism, and Biochemistry*; Ortiz de Montellano, P. R., Eds.; Springer: Switzerland, 2015; pp 523–785.
- (44) Zanger, U. M.; Schwab, M. Cytochrome P450 Enzymes in Drug Metabolism: Regulation of Gene Expression, Enzyme Activities, and Impact of Genetic Variation. *Pharmacol. Ther.* **2013**, 138 (1), 103–141.
- (45) Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E. Cytochromes P450 and Metabolism of Xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2001**, 58 (5–6), 737–747.
- (46) Newton, D. J.; Wang, R. W.; Lu, A. Y. Cytochrome P450 Inhibitors. Evaluation of Specificities in the in Vitro Metabolism of Therapeutic Agents by Human Liver Microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **1995**, 23 (1), 154–158.
- (47) Květina, J.; Grundmann, M. Farmakologické Interakce. *Klin. Farmakol. Farm.* **2003**, No. 1, 17–21.
- (48) Lake, B. G. Preparation and Characterization of Microsomal Fraction for Studies on Xenobiotics Metabolism. In *Biochemical toxicology - a practical approach*; Snell, K., Mullock, B., Eds.; IRL Press: Oxford, 1987.
- (49) Pichard, L.; Gillet, G.; Fabre, I.; Dalet-Beluche, I.; Bonfils, C.; Thenot, J. P.; Maurel, P. Identification of the Rabbit and Human Cytochromes P-450III A as the Major Enzymes Involved in the N-Demethylation of Diltiazem. *ResearchGate* **1990**, 18 (5), 711–719.
- (50) Šípal, Z.; Anzenbacher, P.; Entlicher, G. Pokročilé Cvičení Z Biochemie: Skriptum pro Posl. Přírodověd. Fakulty; Univerzita Karlova, 1981.
- (51) Lee, J.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* **2005**, 88 (5), 1269–1278.
- (52) Schenkman, J. B.; Jansson, I. Spectral Analyses of Cytochromes P450. In *Cytochrome P450 protocols*; Phillips, I. R., Shephard, E. A., Eds.; Humana Press: New York, 1998.
- (53) Durst, R. W.; Wrolstad, R. E. Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- (54) Kopečná Zapletalová, M. Studium ovlivnění enzymových aktivit mikrosomálních jaterních cytochromů P450 látkami flavonoidní struktury používanými jako nutraceutika. Disertační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, 2015.
- (55) Tassaneeyakul, W.; Birkett, D. J.; Veronese, M. E.; McManus, M. E.; Tukey, R. H.; Quattrochi, L. C.; Gelboin, H. V.; Miners, J. O. Specificity of Substrate and

- Inhibitor Probes for Human Cytochromes P450 1A1 and 1A2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, 265 (1), 401–407.
- (56) Waxman, D. J.; Chang, T. K. H. Spectrofluorometric Analysis of CYP2A6-Catalyzed Coumarin 7-Hydroxylation. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ **2006**, 320, 91–96.
- (57) Fojtíková, M. Vliv Vybraných Přírodních Látek Na Jaterní Cytochromy P450. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, 2012.
- (58) L. Crespi, C.; K. H. Chang, T.; J. Waxman, D. CYP2D6-Dependent Bufuralol 1'-Hydroxylation Assayed by Reversed-Phase Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. In *Cytochrome P450 Protocols*; Phillips, I., Shephard, E., Eds.; *Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>; Humana Press, 1998; pp 141–146.
- (59) Guengerich, F. P.; Martin, M. V.; Beaune, P. H.; Kremers, P.; Wolff, T.; Waxman, D. J. Characterization of Rat and Human Liver Microsomal Cytochrome P-450 Forms Involved in Nifedipine Oxidation, a Prototype for Genetic Polymorphism in Oxidative Drug Metabolism. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261 (11), 5051–5060.
- (60) Fernandes, I.; Faria, A.; Calhau, C.; de Freitas, V.; Mateus, N. Bioavailability of Anthocyanins and Derivatives. *J. Funct. Foods* **2014**, 7, 54–66.
- (61) Kaminsky, L. S.; Zhang, Z.-Y. Human P450 Metabolism of Warfarin. *Pharmacol. Ther.* **1997**, 73 (1), 67–74.
- (62) Kołodziej, B. Results of the Studies on Goldenrod (*Solidago Virgaurea* L. Ssp. *Virgaurea*) Cultivation in Poland. In *Proceedings of the Fifth Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries*; Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno: Brno, 2008; p 83.
- (63) Brandin, H.; Viitanen, E.; Myrberg, O.; Arvidsson, A.-K. Effects of Herbal Medicinal Products and Food Supplements on Induction of CYP1A2, CYP3A4 and MDR1 in the Human Colon Carcinoma Cell Line LS180. *Phytother. Res.* **2007**, 21 (3), 239–244.
- (64) Garzón, G. A.; Narváez, C. E.; Riedl, K. M.; Schwartz, S. J. Chemical Composition, Anthocyanins, Non-Anthocyanin Phenolics and Antioxidant Activity of Wild Bilberry (*Vaccinium Meridionale* Swartz) from Colombia. *Food Chem.* **2010**, 122 (4), 980–986.
- (65) Prior, R. L.; Cao, G.; Martin, A.; Sofic, E.; McEwen, J.; O'Brien, C.; Lischner, N.; Ehlenfeldt, M.; Kalt, W.; Krewer, G.; et al. Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46 (7), 2686–2693.
- (66) Vasco, C.; Riihinen, K.; Ruales, J.; Kamal-Eldin, A. Chemical Composition and Phenolic Compound Profile of Mortiño (*Vaccinium Floribundum* Kunth). *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57 (18), 8274–8281.
- (67) Jovančević, M.; Balijagić, J.; Menković, N.; Scaron, K.; avikin; Zdunić, G.; Janković, T.; Dekić-Ivanković, M. Analysis of Phenolic Compounds in Wild Populations of Bilberry (*Vaccinium Myrtillus* L.) from Montenegro. *J. Med. Plants Res.* **2011**, 5 (6), 910–914.
- (68) Lätti, A. K.; Riihinen, K. R.; Kainulainen, P. S. Analysis of Anthocyanin Variation in Wild Populations of Bilberry (*Vaccinium Myrtillus* L.) in Finland. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56 (1), 190–196.
- (69) Woll, F. In vitro inhibition of CYP1A and CYP3A by phenolic compounds from bilberry (*Vaccinium myrtillus*), in male and female porcine liver microsomes. Diplomová práce, Swedish University of Agricultural Sciences, 2015.



- (70) Srovnalova, A.; Svecarova, M.; Kopečna Zapletalova, M.; Anzenbacher, P.; Bachleda, P.; Anzenbacherova, E.; Dvorak, Z. Effects of Anthocyanidins and Anthocyanins on the Expression and Catalytic Activities of CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, and CYP3A4 in Primary Human Hepatocytes and Human Liver Microsomes. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62 (3), 789–797.