

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



**Vliv přírodních látek obsažených v
léčivých čajích na jaterní cytochromy
P450**

Bakalářská práce

Vypracovala:	Martina Mýlková
Studijní program:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Studijní obor:	Katedra Organická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Eva Anzebacherová Doc., RNDr., CSc.

Olomouc 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a 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

Olomouc

2017

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce paní Doc. RNDr. Evě Anzebacherové za její rady, vedení a hlavně trpělivost díky čemuž jsem tuto práci mohla zpracovat. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Veronice Tománkové. Byla vždy oporou a vycházela mi vstříc. Dále bych chtěla poděkovat všem, kdo mi dokázali poradit během mých hodin strávených v laboratoři na ústavu lékařské chemie. A nakonec mým blízkým za jejich podporu během studia.

Obsah

Abstrakt	6
Abstract	7
Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod	9
2 Teoretická část	10
2.1 Xenobiotika a jejich metabolismus	10
2.1.1 Úvod	10
2.1.2 Osud cizorodých látek v organismu	10
2.2 Fáze metabolismu xenobiotik	11
2.2.1 I. Fáze metabolismu cizorodých látek	11
2.2.2 II. Fáze metabolismu cizorodých látek	14
3 Ibišek Súdánský (Hibiscus Sabdariffa)	16
3.1 Léčivé účinky	17
3.1.1 Flavonoidy	18
3.2 Anthokyaniny a anthokyanidiny	19
3.2.1 Struktura	20
3.2.2 Pozitivní účinky anthokyanů na organismus	21
4 Cíle práce	22
5 Experimentální část	23
5.1 Použitý materiál a přístrojové vybavení	23
5.2 Použitá metodika	26
5.2.1 Příprava odvaru a výluhu čaje	26
5.2.2 Spektrofotometrické měření koncentrace monomerních anthokyanů v ibiřkovém čaji, ověření stability anthokyanů	26
5.2.3 Měření koncentrace monomerních anthokyanů v kandovaném ibišku	27
5.2.4 Stanovení anthokyanů a anthokyanidinů pomocí HPLC	28
5.2.5 Stanovení aktivit vybraných jaterních cytochromů P450	29

5.2.6	Stanovení inhibice aktivit jaterních cytochromů P450	32
5.3	Výsledky	34
5.3.1	Spektrofotometrické měření koncentrace monomerních anthokyanů v ibiškovém čaji, ověření stability anthokyanů	34
5.3.2	Měření koncentrace monomerních anthokyanů v kandovaném ibišku	37
5.3.3	Stanovení anthokyanů a anthokyanidinů pomocí HPLC	38
5.3.4	Stanovení inhibice aktivit jaterních cytochromů P450	40
6	Diskuse	43
7	Závěr	44
	Seznam použité literatury	45

Bibliografická identifikace:**Jméno a příjmení autora:** Martina Mýlková**Název práce:** Vliv přírodních látek obsažených v léčivých čajích na jaterní cytochromy P450**Typ práce:** Bakalářská práce**Pracoviště:** Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci**Školitel:** Doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.**Rok obhajoby práce:** 2017

Abstrakt

Civilizační choroby např. cukrovka, obezita, vysoká hladina cholesterolu, nádorová onemocnění nebo deprese představují závažné zdravotní problémy naší populace. K léčení těchto onemocnění se většinou přistupuje s využitím poznatků tzv. klasické medicíny. U klasické medicíny je léčba zdravotních problémů založena na vědecky ověřených poznatcích a zkušenostech generací lékařů.

Vedle tohoto přístupu má svůj stále rostoucí význam také medicína nazývaná jako alternativní. Jedním z příkladů využití alternativní medicíny při léčení chorob je konzumace různých léčivých čajů připravených z rostlin. Využívání rostlin v lékařství sahá daleko do historie lidstva. Do 18. století bylo bylinářství obvyklou formou léčby, a i dnes je opět velmi oblíbené. Velké množství lidí při méně závažných onemocněních volí místo klasických léčiv bylinné přípravky.

Nesmíme ale zapomínat na to, že účinné látky, obsažené v léčivých rostlinách, jsou z organismu eliminovány stejnými mechanismy, kterými jsou odstraňována klinicky užívaná léčiva. Může nastat situace, kdy enzymy účastníci se metabolických přeměn léčiv, jsou ovlivněny (inhibovány nebo indukovány) látkami obsaženými v léčivých čajích. Tento stav (léková interakce na úrovni metabolismu) může vést k závažným zdravotním komplikacím.

Jedny z nejvýznamnějších enzymů metabolismu léčiv jsou cytochromy P450. Vliv účinných látek přítomných v léčivých čajích na aktivitu těchto enzymů bude náplní této bakalářské práce.

Klíčová slova: Cytochromy P450, anthokyaniny, anthokyanidiny, *Hibiscus Sabdariffa***Jazyk:** čeština

Počet stran:

Bibliographical identification:**Author's first name and surname:** Martina Mýlková**Title:** Effect of natural substances present in medicinal teas on hepatic cytochromes P450**Type of thesis:** bachelor**Department:** Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University in Olomouc**Advisor:** Doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.**The year of presentation:** 2017

Abstract

Civilization diseases such as diabetes, obesity, high cholesterol, cancer or depression represent serious health problems of our population. To treat these diseases we usually use knowledge of a classical medicine. Within classic medicine the treatment is based on scientifically proved knowledge and experiences shared by generations of physicians.

In addition to this approach, increasing importance also has a medicine well known as alternative medicine. One example of using alternative medicine to treat diseases is consumption of medicinal teas prepared from plants. The use of plants in medicine goes far into the history of mankind. Until 18th century herbalism was the usual form of treatment and even today it is very popular again. A large number of people prefer herbal remedies from classic medicine for less serious illnesses.

However, we must not forget that the active ingredients contained in medicinal plants are eliminated from the body by the same mechanisms by which clinically-used drugs are removed. There may be situations where enzymes involved in metabolic drug metabolism are affected (inhibited or induced) by drugs contained in medication teas. This state (drug interaction at metabolism level) can lead to serious health complications.

One of the most important enzymes in drug metabolism is cytochrome P450. The influence of the active substances present in medicinal products on the activity of these enzymes will be the subject of this bachelor thesis.

Keywords: Cytochromes P450, anthocyanins, anthocyanidins, *Hibiscus Sabdariffa***Language:** Czech

Number of pages:

Seznam použitých zkratek

CYP - zkratka pro cytochrom P450

NADPH+H⁺ - redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát

ACN - acetonitril

K/PO₄ - pufr dihydrogenfosforečnanu draselného

FAD - flavinadeninukleotid

FMN - flavinmononukleotid

Kys. - kyselina

HPLC - vysokotlaká kapalinová chromatografie

RPM - rychlost otáčení rotoru otáčky/minutu

RH - xenobiotikum

ROH - hydroxylované xenobiotikum

O₂ - kyslík

H⁺ - vodíkový kationt

UDP - uridindifosfát

PAPS - 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate

UV/VIS spektroskopie- ultrafialovo viditelná spektroskopie

pH - vodíkový exponent vyjadřující kyselost nebo zásaditost roztoku

A - absorbance

c- koncentrace

1 Úvod

Kolem nás je spousta cizorodých látek, které působí na náš organismus. Tyto cizorodé látky neboli xenobiotika se mohou dostat do našeho organismu bez našeho vědomí, nebo, což je velmi časté, jsou podávány např. jako léky, doplňky stravy atd. V případě, kdy je aplikováno více cizorodých látek do našeho organismu, může docházet k jejich vzájemným interakcím, zejména na úrovni metabolismu.

Rostliny jsou odedávna využívány jako zdroj léčivých látek. Čaje, které jsou z těchto léčivých bylin připravovány, mohou ovlivňovat metabolismus léků, které daný člověk užívá. Proto je nutné zjistit jejich možnou vzájemnou interakci, aby k tomuto ovlivnění nedocházelo a předešlo se vzniku zdravotních komplikací.

Předmětem našeho studia byl ibišek súdánský neboli *Hibiscus Sabdariffa*. Tato rostlina, kde se využívá květu rostliny, je používána v čajích, jak ve směsích, tak i samostatně. Z důvodu rostoucí oblíbenosti čajů z této byliny, je nutné se zamyslet, zda, účinné látky obsažené v ibišku mohou ovlivňovat i metabolismus léčiv.

2 Teoretická část

2.1 Xenobiotika a jejich metabolismus

2.1.1 Úvod

Xenobiotika neboli cizorodé látky jsou všude kolem nás a náš organismus je jim stále častěji vystaven. Jako xenobiotika můžeme považovat léky, drogy, přípravky v potravě (barviva, ochucovadla, stabilizátory), znečišťující látky (cigaretový kouř, pesticidy, hnojiva) a další. Jelikož tyto látky ovlivňují náš život, je velice důležité znát, jak organismus s xenobiotiky nakládá a jak tyto látky působí na buněčné úrovni. Tyto znalosti nám totiž mohou pomoci se vypořádat se stále zvyšujícím se nápoem cizorodých látek na náš organismus. Především mohou pomoci při medikaci pacienta, tak aby nedocházelo ke vzájemným interakcím mezi léčivy [1].

2.1.2 Osud cizorodých látek v organismu

Hlavními druhy xenobiotik jsou léky, chemické karcinogeny a případně další sloučeniny, které se do prostředí dostali nejrůznějšími cestami. Je odhadováno, že v přírodě se vyskytuje více jak 200 000 chemikálií vytvořených člověkem a většina těchto sloučenin je v lidském těle metabolizována. Jen výjimečně je xenobiotikum vyloučeno v nezměněné podobě [1,2].

Jak už bylo zmíněno, léčiva nebo jiná xenobiotika vpravená do organismu mohou být vyloučena v nezměněné podobě (vysoce polární látky), mohou se spontánně měnit, anebo může dojít k jejich biotransformaci pomocí enzymů a potom k jejich exkreci. V některých případech se léčiva enzymatickou přeměnou mohou stát farmakologicky účinnější, může dojít k jejich bioaktivaci [1,2].

Na metabolismu xenobiotik se podílí celá řada enzymů, předmětem našeho zájmu byly cytochromy P450. Metabolismus xenobiotik může probíhat téměř v každém orgánu našeho organismu. Nejvýznamněji se na metabolických přeměnách podílejí játra, ledviny nebo plíce [2].

2.2 Fáze metabolismu xenobiotik

Jako jeden z prvních kroků je to, že xenobiotikum vstupuje do krevního řečiště, kde pomocí interakce s plazmatickými proteiny sloužící jako přenašeče např. albumin, se dostává dále k jednotlivým tělním buňkám [1].

Samotný metabolismus xenobiotik se většinou rozděluje do dvou fází.

Hlavním smyslem metabolismu cizorodých látek je zvýšení jejich rozpustnosti ve vodě. Metabolickými přeměnami se zvyšuje polarita cizorodých látek, čímž se usnadňuje vylučování z těla. Kdyby nebyla xenobiotika měněna na polární formy, zůstávala by v tukové tkáni téměř natrvalo a tím by docházelo k jejich bioakumulaci [1,3].

2.2.1 I. Fáze metabolismu cizorodých látek

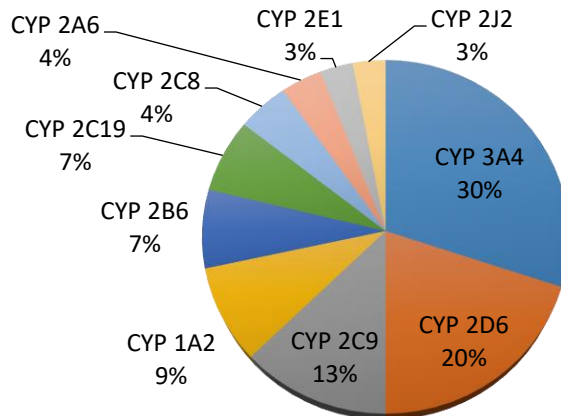
V průběhu první fáze dochází zpravidla k zavedení (nebo odkrytí) polární funkční skupiny do molekuly xenobiotika. Polárními skupinami jsou hydroxy - (-OH), amino - (-NH₂), merkaptó - (-SH), karbonylové - (=CO) a karboxylové - (-COOH). Vzniklé polárnější produkty jsou snadněji vylučitelné z organismu [2].

Důležitou reakcí je hydroxylace katalyzovaná cytochromy P450. Kromě hydroxylace enzymy I. fáze katalyzující také deaminaci, dehalogenaci, desulfataci, epoxidaci, peroxidaci a redukci. Častá je také hydrolysa esterů za účasti esterás. [1].

Ve většině případů jsou cizorodé látky přeměněny v první fázi metabolismu na látky méně aktivní. V některých případech se ale stává, že v první fázi jsou neaktivní léčiva (nazývána proléčiva) metabolizována na biologicky aktivní sloučeniny. Jiným příkladem je situace, kdy původní xenobiotikum je přeměněno na látku toxickou nebo karcinogenní. Můžeme říci, že v některých případech mohou reakce, kterými xenobiotika procházejí, zvyšovat biologickou aktivitu [1,3].

2.2.1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou biotransformační hemové enzymy, které lze nalézt v živočišné, rostlinné i bakteriální říši. Jsou široce rozšířenou skupinou hemoproteinů. V lidském genomu je známo 57 těchto enzymů. Vyskytují se zejména v endoplazmatickém retikulu jater a v gastrointestinálním traktu, ale i v jiných orgánech [4].



Obrázek 1. Ukázka množství jednotlivých izoforem cytochromu P450 v organismu [5]

2.2.1.1.1 Názvosloví cytochromů P450

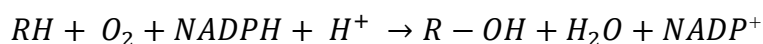
Cytochromy P450 se v odborné literatuře označují zkratkou CYP, což vyjadřuje příslušnost těchto enzymů k jedné superrodině [1, 2]. Po ní v názvu následuje arabská číslice, která určuje rodinu, ke které cytochrom P450 náleží. V jednotlivých rodinách se nacházejí cytochromy P450 když je jejich aminokyselinová sekvence shodná alespoň ze 40%. Za arabskou číslicí určující rodinu je umístěno velké písmeno, které nám říká, do jaké podrodiny daný cytochrom P450 náleží. Podrodinová aminokyselinová sekvence musí být shodná, alespoň z 55%. Nakonec jsou jednotlivým enzymům cytochromu P450 přidělena čísla [3,4,6].

Jako příklad můžeme uvést CYP1A1, což znamená, že cytochrom P450 patří do rodiny 1, jeho podrodina je A a je prvním jednotlivým členem této rodiny. Stejně názvosloví se používá i pro geny kódující cytochromy, jen s výjimkou toho, že geny jsou uváděny kurzívou. Gen kódující CYP1A1 má název *CYP1A1* [3].

Jeho název je odvozen od maxima absorpčního spektra redukované formy v komplexu s CO při 450 nm. Což je pro hemové proteiny neobvyklé, jelikož jiné hemoproteiny absorbují kolem 417 nm [2].

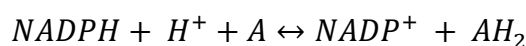
2.2.1.1.2 Hydroxylace xenobiotik za účasti cytochromu P450

Hydroxylace je nejvýznamnější reakcí první fáze metabolismu cizorodých látek. Hlavními enzymy, které tuto hydroxylaci katalyzují, jsou cytochromy P450. U lidí jsou kódovány 57 geny. Tyto monooxygenasy katalyzují oxidaci uhlovodíku RH podle následující reakce [1, 4]:

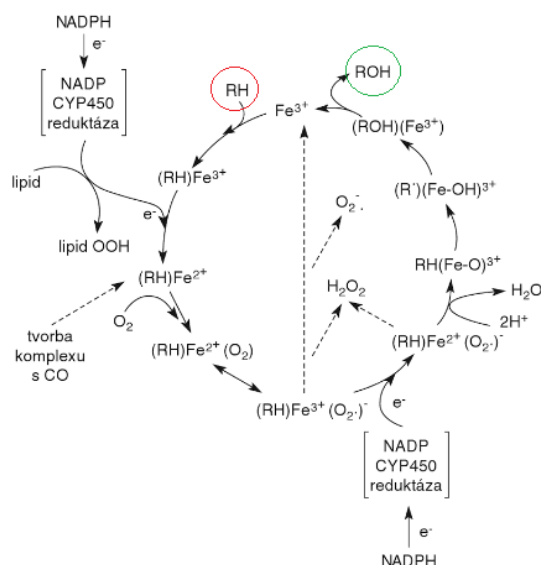


RH v rovnici představuje širokou škálu xenobiotik (exogenních látek), kam právě řadíme léky, karcinogeny, pesticidy, ropné produkty, znečišťující látky, atd. Jako substrát, ale také může být endogenní sloučenina, jako jsou např. steroidy, eikosanoidy, deriváty mastných kyselin, retinoidy, atd. Obecně o těchto všech sloučeninách můžeme říci, že to jsou lipofilní substráty, které jsou hydroxylací převedeny na více hydrofilní (v rovnici R-OH) [3,4].

Reakčního mechanismu se také účastní $NADPH+H^+$ (redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát), který je zdrojem elektronů. To je využíváno k tvorbě redukovaného cytochromu P450 pomocí enzymu NADPH-cytochrom P450-reduktasy (A), na kterou jsou přeneseny elektrony z $NADPH+H^+$ jako první, a až následně na cytochrom P450 [3,7].



Vše vede k aktivaci molekulárního kyslíku a vstupem jednoho atomu kyslíku do substrátu. Druhý atom kyslíku, tedy druhá polovina O_2 se redukuje na vodu [3,4]. Celý sled reakcí, jak působí cytochromy P450 na uhlovodíky RH nám popisuje reakční schéma hydroxylačního procesu obrázek 2.



Obrázek 2. Reakční mechanismus hydroxylačního procesu (Farmakokinetika; 2006)

2.2.2 II. Fáze metabolismu cizorodých látek

Již více polární deriváty, které vznikly přeměnou xenobiotik v první fázi, jsou ve fázi druhé konjugovány např. s kyselinou glukuronovou, sulfátem, acetátem, glutathionem s některými aminokyselinami nebo jsou methylovány [1].

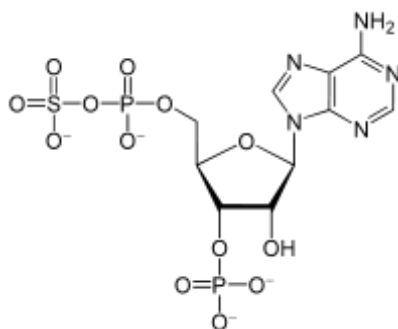
2.2.2.1 Glukuronidace

Glukuronidace je pravděpodobně nejčastější probíhající konjugáční reakcí. Jedná se o kojugaci s kyselinou glukuronovou. Kyselina glukuronová se může při konjugaci vázat ke skupinám obsahující kyslík, dusík nebo i síru [1,2].

Z biochemického hlediska probíhá glukuronidace xenobiotik v podstatě shodně jako glukuronidace bilirubinu. Jedná se o přenos glukuronové kyseliny z UDP-glukuronosylu na příslušný substrát. V lidském organismu se vyskytuje více forem UDP-glukuryltransferas přítomných v endoplazmatickém retikulu i v cytosolu. V podobě glukuronidů se vylučují z organismu např. anilin, kyseliny banzoová, fenol a mnoho steroidů [1,2].

2.2.2.2 Sulfatace

Jedná se o biotransformační reakci katalyzovanou sulfotransferasami. Sulfatace probíhá jak u endogenních sloučenin, např. u steroidů či glykosaminoglykanů, tak i u řady xenobiotik, např. u některých alkoholů, arylaminů a fenolů. Typickými substráty jsou malé jednoduché molekuly se slabou rozpustností v tucích. Donorem sulfátu je adenosin-3'-fosfát-5'-fosfosulfát neboli PAPS. Tato sloučenina se nazývá aktivní sulfát (obrázek 3.) [1,2].

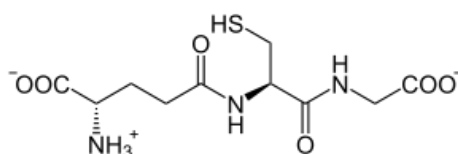


Obrázek 3. PAPS - adenosin-3'-fosfát-5'-fosfosulfát
(<https://en.wikipedia.org/wiki/3%27-Phosphoadenosine-5%27-phosphosulfate>)

2.2.2.3 Konjugace s glutathionem

Glutathion (γ -glutamylcysteinylglycine) je tripeptid skládající se z kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu. Ve zkrácené formě se uvádí jako GHS, kdy -SH je sulfhydrylová skupina cysteinu, která je reakční skupinou molekuly.

Velký počet potenciálních elektrofilních xenobiotik je právě konjugováno s GHS.



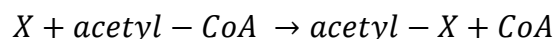
Obrázek 4. Glutathion
(<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Glutathion>)



Enzymy katalyzující uvedenou reakci jsou glutathion-S-transferasy. Ty jsou hojně přítomny v cytosolu jaterních buněk a dále pak v menší míře i v ostatních tkáních [1,2].

2.2.2.4 N-acetylace

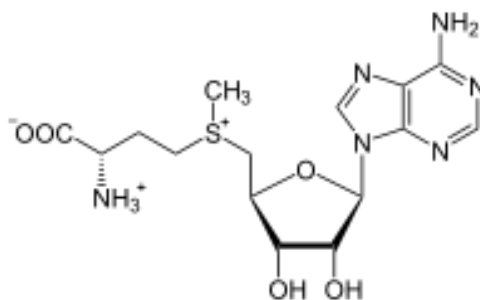
Zdrojem acetylové skupiny pro konjugační reakce je acetyl-CoA. Reakce je katalyzována N-acetyltransferasami. Acetylaci je možné znázornit rovnicí:



Acetylací je metabolizován např. isoniazid, který je používán k léčbě tuberkulózy. [1,2].

2.2.2.5 Methylace

Methylace – podléhá jí několik málo xenobiotik, často ty, které obsahují v molekule skupiny -NX₂, -OH a -SH. Je katalyzována methyltransferasami. Donorem methylu je S-adenosylmethionin [1,2].



Obrázek 5. S-adenosylmethionin
(https://en.wikipedia.org/wiki/S-Adenosyl_methionine)

3 Ibišek Súdánský (*Hibiscus Sabdariffa*)

Do rodu *Hibiscus* se řadí více než 300 druhů ibišků, které jsou rozdílné v tom, jak vypadají, i ve svém použití. Mohou to být byliny, keře i stromy [9].

Ibišek, který jsme použili v našich experimentech, je ibišek súdánský. Ibišek súdánský, známý také v angličtině jako roselle, je jednoletá, dvouděložná rostlina z čeledi slézovité (*Malvaceae*). Je to rostlina výškou spadající mezi travní polokeře a dorůstající až 2,4 m. Má střídavé listy a červené květy, kdy po seschnutí zbyde červený, masitý a šťavnatý kalich [8].

Ibišek je rozšířený po celém světě, v západním Súdánu byl používán už 4000 let př.n.l. Největší koncentrace Ibišku súdánského je především v tropických a subtropických regionech jako je Indie, Čína, Malajsie, Indonésie, Vietnam, Súdán, Egypt, Nigérie a Mexiko. Je ideální plodinou pro rozvojové země, jelikož se snadně pěstuje. Je možné ho pěstovat i v květináči ve vhodných podmínkách [9].

Ibišek súdánský je hojně využíván především pro své pozitivní léčivé účinky. Využívá se téměř celá rostlina, a to jak v potravinářském průmyslu, tak i v průmyslu farmaceutickém. Používá se jako jídlo (marmelády, cukrovinky), bylinné horké a studené nápoje (čaje, vína), aroma, barvivo. Obsahuje spoustu vitamínů a minerálů a tato všestranná léčivka je vhodná při prevenci téměř všech civilizačních chorob [8].



Obrázek 6. Ibišek súdánský

(*Hibiscus Sabdariffa*) (<http://www.dumazahrada.cz/zahrada/2012/9/21/ibišek/>)

3.1 Léčivé účinky

Ibišek se odedávna používá v tradiční medicíně ve východní Asii a v Africe a současné studie potvrzují řadu dalších účinků na organismus [8].

Pro náš výzkum byla zvolena příprava ibišku jako čaje. Sušený květ tohoto ibišku může být připravován samostatně nebo je přidáván téměř do každého ovocného čaje, jak pro svou nezaměnitelnou chuť, tak i pro svou temně vínovou barvu.



Obrázek 7. Sušené květy ibišku (<http://www.fortcm.cz/caje/3924-fu-rong-hua-ibisek-sudansky-50g.html>; <http://www.asianstyle.cz/gastronomie/9091-necaje-to-co-neni-caj-i-cast>)

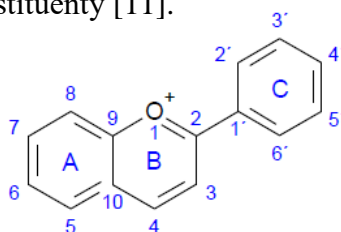
Čaj z ibišku má antibakteriální, antioxidační, dezinfekční a protizánětlivé účinky. Snižuje pocení a tím napomáhá doplnění tekutin, působí pozitivně na metabolismus lipidů, především na cholesterol, a tak zamezuje ukládání tuku v tepnách, pomáhá redukovat nadváhu a pozitivně působí i na diabetes, také má antihypertenzivní efekt. Může být používán i jako prevence proti rakovině [9].

Všechna tato pozitiva jsou spojena s přítomností látek, které ibišek obsahuje. Jsou to především anthokyany, organické kyseliny (kyselina cytrónová, kyselina hydroxycitrónová, kyselina jablečná, kyselina vinná, kyselina šťavelová, kyselina askorbová, ibišková kyselina) a flavonoidy (hibiscitrin, sabdaritrin, gossytrin, quercetin, luteolin). Koncentrace těchto sloučenin se mění v závislosti na odrůdě a genetice ibišku, životním prostředím, ve které se rostlina nachází a také na podmínkách sklizně. Dále obsahuje steroly, terpenoidy, polysacharidy a další minerály [9,10].

3.1.1 Flavonoidy

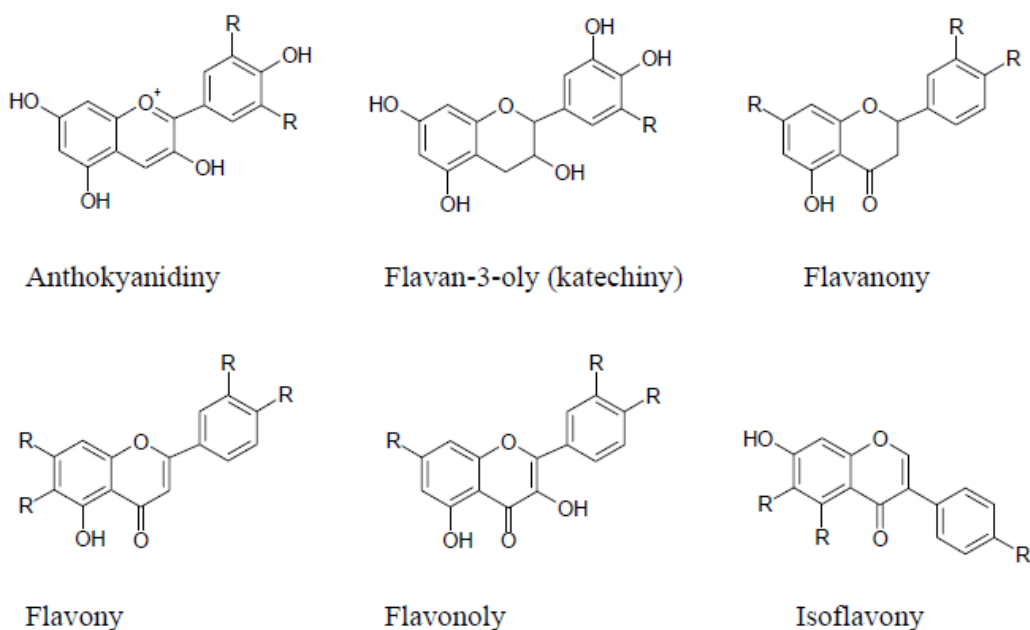
Flavonoidy jsou nejrozsáhlejší skupinou sekundárních metabolitů rostlin s širokou škálou biologických účinků. Je známo více než 8000 různých derivátů a jejich seznam stále narůstá. Rostliny je využívají jako antioxidanty, v boji proti mikroorganismům, pro opylování, jako ochrana před UV zářením, atd. U lidí byly provedeny mnohé studie, které ukázaly, že flavonoidy vykazují pozitivní biologické účinky [11].

Flavonoidy jsou v rostlinách syntetizovány z aromatických aminokyselin (fenylalanin, tyrosin) a malonátu. Základem jejich chemické struktury je tzv. flavan, na který mohou být dále navázány další chemické substituenty [11].



Obrázek 8. Struktura flavanu, od kterého vznikají struktury flavonoidů a anthokyanů

Deriváty flavanu se mohou pak ve své struktuře lišit stupněm oxidace nebo substitucí na kruhu A, B a C. Podle druhu substituce dále hovoříme o jednotlivých derivátech flavanu, jako jsou anthokyanidiny, flavony, isoflavony, atd. V rostlinách se nejčastěji vyskytují jako glykosylované deriváty [11].



Obrázek 9. Základní skelety jednotlivých typů flavonoidů odvozených od flavanu
(<https://web.vscht.cz/~koplkr/Rostlinn%C3%A9%20fenoly%20a%20flavonoidy.pdf>)

Přítomnost flavonoidů přispívá k barevnosti rostlin a k zářivosti barev, jako je modrá, karmínová, oranžová v listech, květech a plodech. Nalezneme je také v semenech, obilninách, léčivých rostlinách, atd. [11].

Z publikovaných studií vyplývá, že flavonoidy vykazují účinek antimikrobiální, antivirový, cytotoxický, antineoplastický, mutagenní, protizánětlivý, antioxidant, antihepatotoxické, proti vysokému tlaku, hypolipidemický a antiagregační. Flavonoidy se řadí mezi tzv. antioxidanty, látky chránící buňky našeho těla proti volným radikálům. Volné radikály jsou molekuly, atomy nebo ionty, které obsahují nepárové elektrony ve valenční slupce. Pokud je volných radikálů v našem těle příliš mnoho, mohou způsobit nenapravitelné škody [11,12,14].

Vědecké výzkumy ukazují, že konzumace flavonoidů je pro člověka mimořádně důležitá a pro dlouhodobé uchování zdraví prospěšná. Jsou to sloučeniny, které jsou obsaženy téměř ve všech rostlinných buňkách jako barviva, kdy rostlinám dodávají jejich charakteristická zbarvení. Najdeme je v citrusových plodech, v jablkách, v bobulovém ovoci, hroznech, rajčatech, v cibuli, v houbách a ve všech druzích zeleniny, jakož i v nápojích, například v čaji, v pivu, v bílém a zejména v červeném víně a v ovocných džusech [12, 13].

3.2 Anthokyany a anthokyanidiny

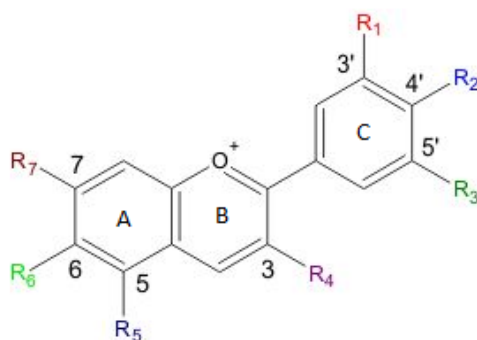
Anthokyany, též nazývané jako anthokyaniny, jsou ve vodě rozpustné přírodní pigmenty způsobující červené až modrofialové barvy v rostlinách. Jsou široce distribuované v barevném ovoci i zelenině např. vinné hrozny, borůvky a ibišek súdánský. Nejvýraznější barvu mají při nízkých hodnotách pH. Jejich barevnost je často také využívána v průmyslové výrobě pro výrobu potravinářských barviv [15,16].

Jak již bylo zmíněno výše, anthokyany řadíme mezi flavonoidy. Jsou poměrně nestabilní a mají náchylnost k degradaci. Jejich stabilita a barevnost je závislá na určitých podmínkách, a to hlavně pH, přítomnosti některých enzymů, teplotě a také sluneční záření. Stabilita se zvyšuje s počtem methoxy-skupin v kruhu B a klesá s počtem hydroxy-skupin viz. 3.2.1. [15].

Důležitost anthokyanů spočívá hlavně v tom, že jsou v obrovské míře konzumovány člověkem, a proto mohou mít přímý vliv na lidský organismus.

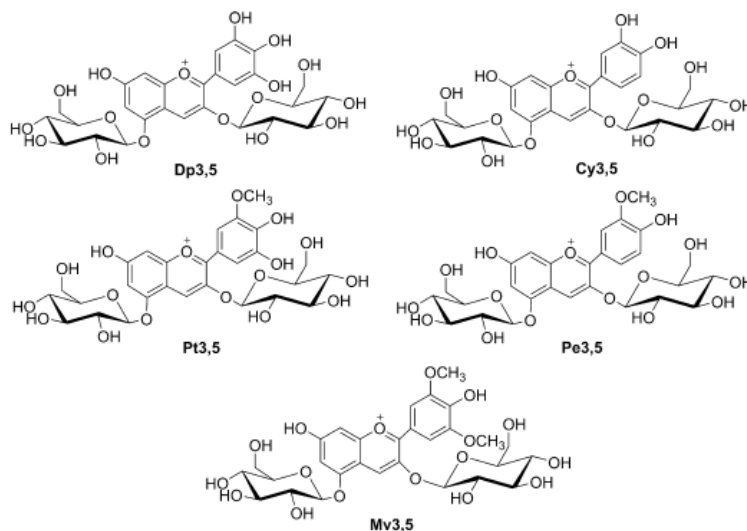
3.2.1 Struktura

Molekula anthokyanu je tvořena aglykonovou (necukernou) částí, která se nazývá anthokyanidin, cukernou složku vázanou na anthokyanidinové jádro je např. xylóza, arabinóza, rhamóza, glukóza a galatóza. Rozdílnost anthokyanů spočívá v počtu a poloze fenolických skupin a také v tom, jaký sacharid se váže na strukturu. [15]



Obrázek 10. Struktura anthokyanidinu
(<http://www.food-info.net/uk/colour/anthocyanin.htm>)

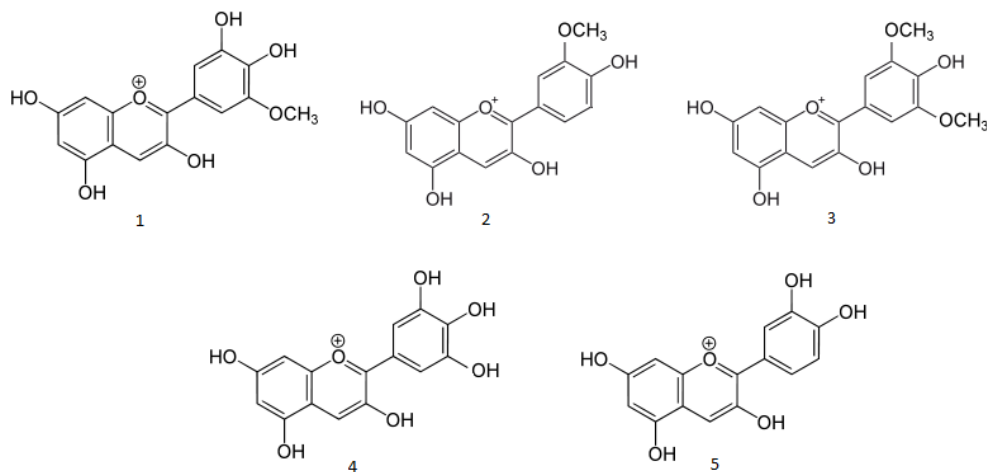
Nejčastěji je sacharidová složka navázána v poloze 3 nebo i v poloze 5 O-glykosidickou vazbou.



Obrázek 11. Dp3,5 – delphinidin-3,5-diglukosid; Cy3,5 – kyanidin-3,5-diglukosid; Pt3,5 – petunidin-3,5-diglukosid; Pe3,5 – peonidin-3,5-diglukosid; Mv3,5 – Malvidin-3,5-diglukosid [27]

Nejčastěji vyskytující se anthokyanidiny, které se v přírodě nacházejí, jsou petunidin, peonidin, malvidin, delphinidin a kyanidin [15].

Delphinidin je zodpovědný za barvu namodralou, kyanidin za barvu fialovou a červenou.



Obrázek 12. struktury anthokyanidinů 1-petunidin, 2-peonidin, 3-malvidin, 4-delphinidin, 5-kyanidin

3.2.2 Pozitivní účinky anthokyanů na organismus

Anthokyanidiny se do našeho těla dostávají po požití. V našich ústech dochází k hydrolýze anthokyanů a ty se pak rozpadají na anthokyanidiny. Tyto metabolity jsou dále zodpovědné za účinky, které se mohou projevit [17].

Anthokyaniny stejně jako flavonoidy působí pozitivně na lidský organismus. Jsou to látky, u kterých byly popsány protizánětlivé a anti-mutagenní vlastnosti. Také slouží při prevenci kardiovaskulárních chorob. Jsou účinné při snižování oxidačního stresu spojeného se stárnutím [18]. V současné době se zvažuje jejich využití v přípravcích proti diabetu [19].

V potravinářském průmyslu stále narůstá jejich využití jako přírodních potravinových barviv, které by mohla nahradit barviva umělá, způsobující alergie a hyperaktivitu [20].

4 Cíle práce

Cíl práce:

Cílem naší práce bylo zjistit vliv účinných látek v odvaru a výluhu z květu Ibišku Súdánského na aktivitu vybraných cytochromů P450.

Dílčí cíle:

Připravit odvar a výluh z květu Ibišku Súdánského a změřit v nich celkový obsah anthokyanů.

V mikrosomální frakci změřit aktivitu cytochromů P450 2C9, 2C19, 3A4 a další cytochromy P450 pomocí jejich specifických substrátů.

Stanovit efekt účinných látek obsažených v květu Ibišku Súdánského na aktivitu cytochromů P450 2C9, 2C19, 3A4 a další cytochromy P450.

Vyhodnotit rizika při současné konzumaci ibišku a léčiv metabolizovaných inhibovanými enzymy.

5 Experimentální část

5.1 Použitý materiál a přístrojové vybavení

Enzymové systémy:

Jako zdroj enzymů byla použita lidská jaterní mikrosomální frakce (poskytnuta Ústavem farmakologie LF, UP).

Charakteristika:

Koncentrace celkového cytochromu P450: 18,19 $\mu\text{mol/l}$

Koncentrace proteinu: 26,85 mg/ml

Specifický obsah cytochromu P450: 0,68 nmol/mg

Testované přírodní látky a jejich standardy:

Sušené květy ibišku súdánského pro přípravu čaje (zakoupeno v HERBA, Masarykova třída 882/28, Olomouc)

Kandovaný květ ibišku súdánského (zakoupeno ve Voňavý krámk s květinami Bruntál)

antokyany delfinidin-3-O-glukosid chlorid (DEL-glu), delfinidin-3-O-galaktosid chlorid (DEL-gala), delfinidin-3-O-arabinosid chlorid (DEL-ara), kyanidin-3-O-galaktosid chlorid (KYA-gala), kyanidin-3-O-arabinosid chlorid (KYA-ara), petunidin-3-O-glukosid chlorid (PET-glu), petunidin-3-O-galaktosid chlorid (PET-gala), malvidin-3-O-glukosid chlorid (MAL-glu), malvidin-3-O-galaktosid chlorid (MAL-gala), peonidin-3-O-glukosid chlorid (PEO-glu) a antokyanidiny delfinidin chlorid (DEL), kyanidin chlorid (KYA), petunidin chlorid (PET), malvidin chlorid (MAL), peonidin chlorid (PEO) byly zakoupeny od firmy Extrasynthese (Genay, Francie)

Chemikálie

isocitrátdehydrogenasa (IDH), kyselina DL-isocitronová (ISO), β -nikotinamidadenindinukleotid fosfát (NADP⁺) bylo dodáno firmou Sigma Aldrich (Praha, CZ)

dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), dichlormethan (CH₂Cl₂), chlorid draselný (KCl), kyselina chloristá (HClO₄), síran hořečnatý heptahydrát (MgSO₄·7H₂O), chlorid sodný (NaCl) bylo dodáno firmou Lach-Ner (Neratovice, CZ)

Trihydrát octanu sodného (CH₃COONa·3H₂O), uhličitan sodný (Na₂CO₃) byly pořízeny od firmy Lachema (Brno, Česká republika);

acetonitril (CH₃CN), methanol (CH₃OH) byly pořízeny od firmy Merck (Praha, CZ)

Dusík zakoupeno od firmy Linde Technoplyn (Praha, CZ)

Chemikálie pro stanovení enzymových aktivit CYP:

Substráty warfarin, diazepam, testosteron, stejně jako příslušné metabolity 7-hydroxywarfarin, desmetyldiazepam, byly dodány firmou Sigma Aldrich (Praha, Česká republika). 6 β -hydroxytestosteron byl zakoupen od firmy Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA).

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

Přístrojové vybavení

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

centrifuga BR4i (Jouan, Saint Nazaire, Francie)

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

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

minicentrifuga HERMLE Z 100 M (HERMLE, Korea)

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

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

spektrofotometr

suchá lázeň MD-MP0,1-D (dodáno firmou Biotech, Praha, CZ)

ultrazvuk K 10 (Kraintek, Podhájska, Slovensko)

vodní lázeň WB 14 (Memmert, Schwabach, Německo)

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

HPLC systém: řídicí jednotka (Shimadzu system controller SCL-10AVP, Japonsko), kolona LiChroCART 250-4 s náplní LiChrospher 100 RP-18 endcapped, velikost částic 5 μm (Merck, Praha, CZ), vyhřívání kolony (Shimadzu column oven CTO-10AC, Japonsko), UV/VIS detektor (Shimadzu, UV-VIS detector SPD-10AVP, Japonsko), fluorimetrický detektor (Shimadzu diode array detector SPD-10A, Japonsko), autosampler se smyčkou 50 μl (Shimadzu autoinjector SIL-10ADVP, Japonsko), odplyňovač mobilní fáze (Shimadzu degasser DGU-20A5, Japonsko), pumpa (Shimadzu liquid chromatograph LC-10AT, Japonsko)

Software:

OpenOffice.org 3.2.1

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

Shimadzu CLASS-VP (Shimadzu, Tokyo, Japonsko)

5.2 Použitá metodika

5.2.1 Příprava odvaru a výluhu čaje

Odvar a výluh z květu ibišku súdánského byly připraveny podle návodu, který byl jako příbalová informace uveden na obalu použitého čaje. Výsledná koncentrace připravených roztoků byla 10 g/l.

Odvar: Do kádinky bylo naváženo 0,5 g čajových lístků ibišku súdánského, ke kterým bylo přidáno 50 ml destilované vody. Směs jsme zahřivali na elektrickém vařiči k varu. Roztok se pomalu barvil do vínové barvy. Jakmile roztok dosáhl varu, nechal se 5 minut vařit a poté se chladil 8 minut mimo vařič. V následujícím kroku byl zfiltrován do čisté kádinky. Výsledný odvar byl rozpipetován do ependorfek a buď okamžitě použit k experimentům, nebo byl zamražen na -80°C .

Výluh: Do kádinky bylo naváženo 0,5 g čajových lístků ibišku súdánského. Do další kádinky bylo nalito 50 ml destilované vody. Destilovaná voda se přivedla k varu na elektrickém vařiči. Ibiškové květy byly zalaty vařící destilovanou vodou. Tato směs se nechala 8 minut louhovat. Bylo patrné postupné zbarvení do vínové barvy roztoku. Po 8 minutách byl roztok zfiltrován do čisté kádinky. Výsledný výluh byl rozpipetován do ependorfek a buď okamžitě použit nebo zamražen na -80°C .

5.2.2 Spektrofotometrické měření koncentrace monomerních anthokyanů v ibiškovém čaji, ověření stability anthokyanů

Pro měření obsahu celkových antokyanů v připraveném v odvaru a výluhu z ibišku súdánského byla použita spektrofotometrická pH-diferenční metoda. Pro každý roztok testovaných vzorků byly použity dvě ředění, jedno s puftrem z chloridu draselného o koncentraci 0,025 mmol/l (pH 1,0) a druhé s puftrem octanu sodného o koncentraci 0,4 mmol/l (pH 4,5). Rozdíl v hodnotách absorbancí v různých hodnotách pH je způsoben strukturní přeměnou jednotlivých antokyanů z barevné oxoniové formy (pH 1,0) na bezbarvou hemiketalovou formu (pH 4,5). Absorbance vzorků čaje byly odečítány při vlnové délce 525 nm a při vlnové délce 700 nm. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda. Výsledná absorbance (A) vzorků ibišku byla vypočítána podle následujícího vztahu:

$$A = (A_{525} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{525} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

Celková koncentrace monomerních antokyanů v původním roztoku je vyjádřena jako ekvivalent kyanidin-3-O-glukosidu a spočítána podle následující rovnice:

$$\text{Obsah celkových antokyanů (mg}\cdot\text{l}^{-1}) = A \cdot M \cdot \check{R} \cdot 1000 / (\varepsilon \cdot L)$$

kde **A** je hodnota absorpance vypočítaná z rovnice (1); **M** je molekulární hmotnost kyanidin 3-glukosidu (449,2 g/mol); **Ř** je ředící faktor; **1000** je faktor pro převod gramů (g) na miligramy (mg); ε je molární absorpční koeficient pro kyanidin 3-glukosid (26 900); a **L** je délka optické dráhy. [21, 22]

Příprava pufrů

0,025 mol/l pufr chloridu draselného o pH 1,0: 1,86 g chloridu draselného bylo rozpuštěno v 480 ml destilované vody. Po úpravě pH pomocí koncentrované HCl na pH 1,0 byl roztok převeden do 500ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku.

0,4mol/l pufr octanu sodného o pH 4,5: 54,43 g octanu sodného bylo rozpuštěno v 480 ml destilované vody. U vzniklého roztoku bylo pH prostřednictvím koncentrované HCl upraveno na pH 4,5. Následně byl roztok převeden do 500ml odměrné baňky a po rysku doplněn destilovanou vodou.

Spektrofotometrická pH-diferenční metoda byla také použita pro určení stability anthokyanů ve vzorcích čajů. Hodnoty koncentrace celkových anthokyanů u čerstvě připraveného čaje byly porovnány s hodnotami u zamražených vzorků.

5.2.3 Měření koncentrace monomerních anthokyanů v kandovaném ibišku

Jak bylo řečeno výše, z ibišku lze připravit nejen čaj, ale i jiné pochutiny. Mezi ně patří i kandovaný ibiškový květ, který se prodává v obchodě k přímé konzumaci.

Měření koncentrace anthokyanů v kandovaném ibišku bylo provedeno spektroskopicky. Bylo naváženo 4 x 0,5 g kandovaného ibiškového květu, který byl vložen do kádinky, rozstříhán na malé kousíčky a rozmělněn skleněnou tyčinkou. Do dvou kádinek, které obsahovaly kandovaný ibišek, bylo přidáno 5 ml 0,025 mol/l pufru složeného z chloridu draselného a HCl o pH 1,0 a do dalších dvou bylo přidáno 5 ml 0,4 mol/l pufru octanu sodného o pH 4,5. Ibišek jsme nechali extrahovat 1 hodinu a 24 hodin. Měření absorpance roztoků a výpočet koncentrace anthokyanů probíhalo stejnou metodou jako při měření koncentrace anthokyanů u vzorků čaje.

5.2.4 Stanovení anthokyanů a anthokyanidinů pomocí HPLC

Vzorky s obsahem anthokyanů a anthokyanidinů byly analyzovány pomocí HPLC [21, 22, 23]. Pro identifikaci jednotlivých anthokyanů byly použity komerčně dostupné standardy. Jednotlivé anthokyanany v našich vzorcích byly identifikovány podle retenčních časů standardů. Identifikace anthokyanidinů byla provedena obdobně s použitím standardů anthokyanidinů [23].

Pro analýzu jednotlivých anthokyanidinů v odvaru a výluhu čaje bylo nutné nejdříve provést hydrolyzu anthokyanů, abychom odstranili navázané sacharidy. Při hydrolyze bylo postupováno následovně:

1 ml vzorku odvaru a 1 ml vzorku výluhu bylo smícháno ve zkumavkách s 2 ml 0,1 mol/l HCl. Takto připravené roztoky se vložily do vodní lázně a inkubovaly po dobu 1 hodiny při 37 °C. Oba roztoky se po 1 hodině zahřívání na vodní lázni centrifugovaly 10 minut při 3 500 g. Vzniklý supernatant byl pro další úpravu přepipetován do skleněných slziček. Slzičky se vložili na vakuovou odparku, kde byl vzorek téměř do sucha odpařen. Odparek byl rozpuštěn v 0,5 ml 2 mol/l HCl a tento roztok byl poté přepipetován do mikrozkupek eppendorf. Mikrozkupek umístěné ve stojánku byly ponořeny do vroucí vody a zahřívány po dobu 30-ti minut. Následně se hydrolyzovaná směs zchladila v ledové lázni. Vzorky se uchovávaly bez přístupu světla, jelikož anthokyanidiny jsou na světle nestabilní.

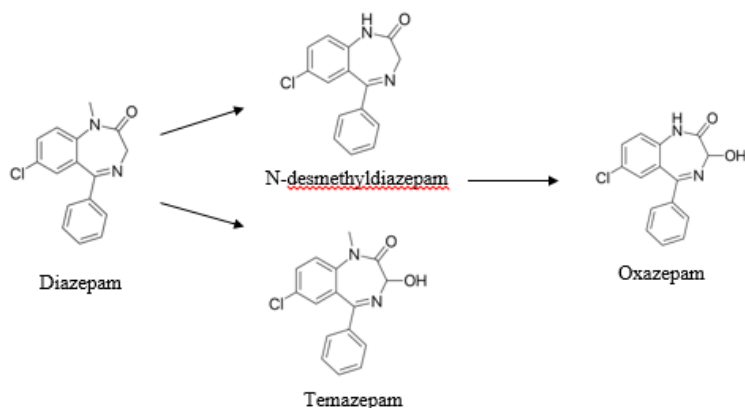
Vzorky k HPLC analýze byly připraveny smícháním 20 µl hydrolyzátu se 180 µl mobilní fáze ($\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{ACN} : \text{H}_3\text{PO}_4 = 946,4 : 26 : 25 : 2,6$). Abychom získali koncentrovanější roztok pro analýzu, byl zbylý hydrolyzát odpařen do sucha při 40 °C pod dusíkem. Odparek se rozpustil v 200 µl mobilní fáze a tento roztok byl přepipetován do vialek a analyzován pomocí HPLC.

5.2.5 Stanovení aktivit vybraných jaterních cytochromů P450

5.2.5.1 Stanovení aktivity CYP2C19 N-demethylací diazepamů a CYP3A4 3-hydroxylací diazepamů

Diazepam patří mezi benzodiazepinové léky řadící se mezi léky proti úzkosti či proti bolesti. Má rychlý nástup účinku a při dlouhodobějším užívání na něj může vznikat závislost [24].

Diazepam byl použit jako substrát pro měření aktivity cytochromů P450 3A4 a 2C19. Forma CYP3A4 metabolizuje diazepam hydroxylací v poloze 3 a vzniká temazepam, zatímco forma CYP2C19 metabolizuje diazepam na N-desmethyldiazepam (nordiazepam) N-demethylací. Z obou metabolitů pak může vznikat oxazepam, konkrétně N-demethylací temazepamu nebo hydroxylací v poloze 3 N-desmethyldiazepamu.



Obrázek 13. Schéma hydroxylace a N-demethylace diazepamů

Celkový objem reakční směsi byl 200 μl . Do směsi se napipetovalo 50 μl 100 mmol/l pufru K/PO_4 o pH 7,4, 20 μl naředěné mikrosomální frakce (ředěno 100 mmol/l K/PO_4 pufrům o pH 7,4), tak aby každá reakční směs obsahovala 70 pmol cytochromu P450. Do směsi bylo dále přidáno 10 μl destilované vody (kontrola). Nakonec bylo napipetováno 65 μl $\text{NADPH}+\text{H}^+$ generujícího systému (konečná koncentrace jednotlivých součástí: NADP^+ nikotinamidadenindunukleotidfosfát 0,5 mmol/l, ISO - kyselina isocitronvá 3,7 mmol/l, IDH - isocitrátdehydrogenáza 18 U/ml, MgSO_4 50 mmol/l) a pak se byla zahájena 30-ti minutová preinkubace při 37 $^\circ\text{C}$. Po preinkubaci bylo do reakční směsi přidáno 50 μl diazepamů o výsledné koncentraci 400 $\mu\text{mol}/\text{l}$. Reakce probíhala 15 minut při 37 $^\circ\text{C}$, pak byla zastavena přidávkem 100 μl ACN. Zkumavky byly po zastavení reakce centrifugovány při 4 $^\circ\text{C}$ po dobu 10 minut při 10 000 rpm. Následovala kvantifikace vytvořených metabolitů pomocí HPLC.

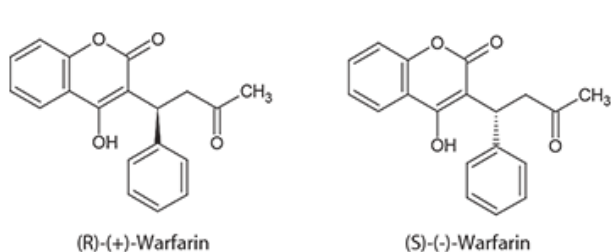
Podmínky chromatografické analýzy: mobilní fáze 50 mmol/l KH_2PO_4 (pH 2,4) a ACN v poměru 55:4,5 isokratická eluce, průtok $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, doba analýzy 22 min. Produkt enzymatické reakce byl analyzován UV detekcí při 236 nm.

5.2.5.2 Stanovení vybraných aktivit cytochromů P450 pomocí warfarinu

Warfarin je antikoagulační léčivo, což znamená, že je zodpovědné za snížení srážlivosti krve s cílem zamezit vzniku trombózy [25].

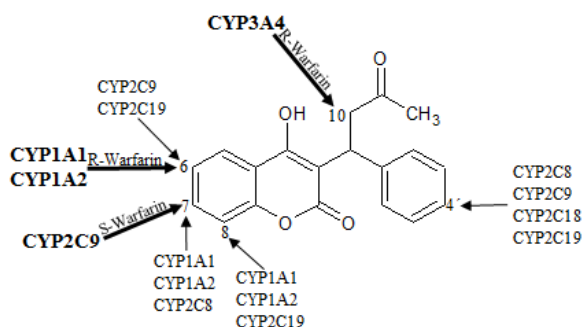
Warfarin se užívá jako racemická směs dvou stereoisomerů. Tyto stereoisomery mohou podléhat metabolismu hned několika cytochromů P450. Místa hydroxylace jsou specifická buď pouze pro jeden cytochrom P450 nebo na nich může docházet k reakci za účasti i více cytochromů P450. To, který z enzymů bude substrát v danou chvíli metabolizovat je dáno podmínkami reakce.

Při našem měření jsme se zaměřili na sledování hladin 7-OH warfarinu (CYP2C9), 6-OH warfarinu (CYP1A1/2) a 4'-OH warfarinu (CYP2C18/19 a CYP2C8/9)



Obrázek 15. Racemická směs warfarinu

(<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/bioanalytical/lcms-warfarin.html>)



Obrázek 14. Místa probíhající reakcí na warfarinu různými druhy cytochromů

Celkový objem reakční směsi byl 250 μl . Do zkumavky bylo napipetováno 90 μl 100 mmol/l pufru K/PO_4 o pH 7,4. Dále byla přidána ředěná mikrosomální frakce (ředěno 100 mmol/l K/PO_4 puftrem o pH 7,4), tak aby reakční směs v každém vzorku obsahovala 250 pmol cytochromů P450 a také 10 μl destilované vody (kontrola). Po přidání 77,5 μl $\text{NADPH} + \text{H}^+$ generujícího systému (konečná koncentrace jednotlivých součástí: NADP^+ nikotinamidadenindunukleotidfosfát 0,5 mmol/l, ISO - kyselina isocitronvá 3,7 mmol/l, IDH - isocitrátdehydrogenáza 18 U/ml, MgSO_4 50 mmol/l) byla reakční směs preinkubována 30 minut při 37 °C. Enzymová reakce byla nastartována přidávkem 25 μl warfarinu (výsledná koncentrace v reakční směsi 2 mmol/l). Reakce probíhala 20 minut při 37 °C. Reakce byla zastavena deproteinací přidáním 5 μl 70 % HClO_4 . Po zastavení reakce byla směs 10 minut

centrifugována při 14 000 rpm za chlazení 4 °C. 200 µl supernatantu bylo přepipetováno do vialek a následovala analýza na HPLC.

Podmínky chromatografické analýzy: mobilní fáze obsahovala KH_2PO_4 (pH 3):methanol:acetonitril v poměru 52:32:16 (v/v/v), nástřik 50 µl, isokratická eluce, průtok 1 ml·min⁻¹, doba analýzy 38 min. Produkty enzymatické reakce byly detekovány při 306 nm a fluorescenčně (excitace 320 nm, emise 415 nm).

5.2.5.3 Stanovení aktivity CYP3A4 pomocí 6β – hydroxylace testosteronu

Testosteron je řazen mezi steroidní hormony ze skupiny androgenů. V organismu je hydroxylován za účasti cytochromu P450 3A4 v poloze 6β.



Obrázek 16. Hydroxylace testosteronu na 6-β -hydroxytestosteron

Enzymová reakce probíhala v tlustostěnných centrifugačních zkumavkách. Celkový objem reakční směsi byl 500 µl. Do zkumavek bylo napipetováno 215 µl pufru K/PO_4 (pH 7,4) o koncentraci 100 mmol/l a 10 µl destilované vody (kontrola), 20 µl ředěné mikrosomální frakce (ředěno 100 mmol/l K/PO_4 puftrem o pH 7,4) tak, aby reakční směs obsahoval 100 pmol cytochromů P450. Dále bylo přidáno 155 µl $\text{NADPH}+\text{H}^+$ generujícího systému (konečné koncentrace jednotlivých součástí: NADP^+ nikotinamidadenindunukleotidfosfát 0,5 mmol/l, ISO - kyselina isocitronvá 3,7 mmol/l, IDH - isocitrátdehydrogenáza 18 U/ml, MgSO_4 50 mmol/l). Reakční směs byla preinkubována 30 minut při 37 °C a enzymová reakce byla nastartována přidávkem 100 µl testosteronu o výsledné koncentraci 500 µmol/l a směs byla inkubována 20 minut při 37 °C. Pro zastavení reakce byl použit 1 ml roztoku 1 mol/l Na_2CO_3 / 2 mol/l NaCl a hned po tomto kroku bylo skleněnými pipetami napipetováno 2000 µl dichlormethanu. Po přidání dichlormethanu byly zkumavky 15 s promíchávány na vortexu a pak byly vzorky centrifugovány 10 minut při 10 000 rpm. Po centrifugaci bylo odebráno skleněnými pipetami 1000 µl ze spodní vrstvy a tento roztok byl přenesen do čistých skleněných zkumavek. Odpipetovaný roztok byl vysušen pod proudem dusíku při 40 °C. Odparek byl rozpuštěn ve 200 µl mobilní fáze tvořené z 64 % methanolu. Následovala analýza na HPLC.

Podmínky chromatografické analýzy: mobilní fáze obsahovala 64 % methanol, nástřik 50 μl , isokratická eluce, průtok 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, doba analýzy 38 min. Produkty enzymatické reakce byly detekovány při 254 nm.

5.2.6 Stanovení inhibice aktivit jaterních cytochromů P450

5.2.6.1 Inhibice aktivity CYP2C19 a CYP3A4 při metabolismu diazepamu

Celkový objem reakční směsi byl 200 μl . Do směsi se napipetovalo 50 μl 100 mmol/l pufru K/PO_4 o pH 7,4. Byl přidán odvar nebo výluh čaje, každý o objemu 10 μl , kdy konečné koncentrace anthokyanů v reakční směsi byly 1 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml a 60 000 ng/ml. Dále bylo použito 20 μl pufrů ředěné mikrosomální frakce (ředěno 100 mmol/l K/PO_4 pufr o pH 7,4), tak aby každá reakční směs obsahovala 70 pmol cytochromu P450. Pak bylo přidáno 65 μl generujícího systému $\text{NADPH}+\text{H}^+$ (konečné koncentrace jednotlivých složek: NADP^+ nikotinamidadenindunukleotidfosfát 0,5 mmol/l, ISO - kyselina isocitronová 3,7 mmol/l, IDH - isocitrátdehydrogenáza 18 U/ml, MgSO_4 50 mmol/l). Reakční směs byla preinkubována 30 minut při 37 °C. Reakce byla nastartována přidavkem diazepamu o finální koncentraci 400 μM a inkubace probíhala 15 minut při 37 °C. Reakce byla zastavena přidavkem 100 μl ACN. Po zastavení byla směs centrifugována 10 minut při 10 000 rpm a při 4 °C. Následovala analýza na HPLC za stejných podmínek jako v kapitole 5.2.5.1.

5.2.6.2 Inhibice aktivity CYP při metabolismu warfarinu

Celkový objem reakční směsi byl 250 μl . Do zkumavky bylo napipetováno 90 μl 100 mmol/l pufru K/PO_4 o pH 7,4. Dále bylo přidáno 10 μl odvaru nebo výluhu tak, aby koncentrace anthokyanů v reakční směsi byla 1 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml a 60 000 ng/ml. Do reakční směsi byla přidána ředěná mikrosomální frakce (ředěno 100 mmol/l K/PO_4 pufr o pH 7,4), tak aby reakční směs v každém vzorku obsahovala 250 pmol cytochromů P450. Po přidání 77,5 μl $\text{NADPH}+\text{H}^+$ generujícího systému (konečná koncentrace jednotlivých součástí: NADP^+ nikotinamidadenindunukleotidfosfát 0,5 mmol/l, ISO - kyselina isocitronová 3,7 mmol/l, IDH - isocitrátdehydrogenáza 18 U/ml, MgSO_4 50 mmol/l) byla reakční směs preinkubována 30 minut při 37 °C. Po preinkubaci byla enzymová reakce nastartována přidavkem 25 μl roztoku warfarinu (výsledná koncentrace v reakční směsi 2 mmol/l) a probíhala 20 minut při 37 °C. Reakce byla zastavena deproteinací přidáním 5 μl 70 % HClO_4 . Po deproteinaci byla směs 10 minut centrifugována při 14 000 rpm při 4 °C.

200 μl supernatantu bylo přepipetováno do vialek a následovala analýza na HPLC za stejných podmínek jako v kapitole 5.2.5.2.

5.2.6.3 Inhibice aktivity CYP3A4 při metabolismu testosteronu

Reakce se prováděla v tlustostěnných zkumavkách určených do centrifugy. Celkový objem reakční směsi byl 500 μl . Nejdříve bylo napipetováno 215 μl 100 mmol/l pufru K/PO₄ o pH 7,4. Dále bylo aplikováno 10 μl odvaru nebo výluhu o výsledné koncentraci anthokyanů 10 ng/ml a 60 000 ng/ml. Dále bylo přidáno 20 μl ředěné mikrosomální frakce (ředěno 100 mmol/l pufrém K/PO₄ o pH 7,4) tak, aby každý ze vzorků obsahoval 100 pmol cytochromů P450. Po přidání 155 μl NADPH+H⁺ generujícího systému (konečné koncentrace jednotlivých složek: NADP⁺ nikotinamidadenindunukleotidfosfát 0,5 mmol/l, ISO - kyselina isocitronvá 3,7 mmol/l, IDH - isocitrátdehydrogenáza 18 U/ml, MgSO₄ 50 mmol/l), byla směs preinkubována 30 minut při 37 °C. Poté bylo přidáno 100 μl testosteronu (výsledná koncentrace 500 $\mu\text{mol/l}$) a roztok byl inkubován 20 minut při 37 °C. Pro zastavení reakce byl použit 1 ml roztoku 1 mol/l Na₂CO₃ / 2 mol/l NaCl a hned po tomto kroku byly skleněnými pipetami napipetovány 2 ml dichlormethanu. Po přidání dichlormethanu byly zkumavky 15 s promíchávány na vortexu a pak byly vzorky centrifugovány 10 minut při 10 000 rpm. Po centrifugaci bylo odebráno skleněnými pipetami 1000 μl ze spodní vrstvy, tento roztok byl přenesen do čistých skleněných zkumavek a odpařen do sucha pod proudem dusíku při 40 °C. Odparek byl rozpuštěn ve 200 μl mobilní fáze tvořené z 64 % methanolu. Následovala analýza na HPLC za stejných podmínek jako v kapitole 5.2.5.3.

5.3 Výsledky

5.3.1 Spektrofotometrické měření koncentrace monomerních anthokyanů v ibiřkovém čaji, ověření stability anthokyanů

Při tomto měření bylo postupováno podle metodiky viz. 5.2.2. Pro první měření byly použity čerstvě připravené vzorky odvaru a výluhu. Zbytek vzorků byl zamražen a uchováván při -80°C. Pro další měření (2. měření) byly tyto vzorky po jednom týdnu rozmrazeny a opět po měření zamrazeny. Pro třetí měření byly tyto vzorky použity po měsíčním zamražení.

Výsledky byly dosaženy do rovnic:

$$A = (A_{cca525} - A_{700})_{pH1,0} - (A_{cca525} - A_{700})_{pH4,5}$$

$$c = A * MW * DF * 1000 / (\epsilon * L)$$

1. měření	pH pufru	Absorbance kolem 520 nm	Absorbance při 700 nm
Výluh (100x ředěno)	1,0	0,050	0,001
	4,5	0,007	0,001
Odvar (100x ředěno)	1,0	0,044	0,001
	4,5	0,008	0,001
Výluh (20x ředěno)	1,0	0,236	0,000
	4,5	0,036	0,002
Odvar (20x ředěno)	1,0	0,218	0,001
	4,5	0,037	0,003

Tabulka 1. Měření koncentrace monomerních anthokyanů ve vzorcích čerstvě připraveného odvaru a výluhu

100x ředěné

Výluh A = 0,043; c = 71,805205 mg/l

Odvar A = 0,036; c = 60,115985 mg/l

20x ředěné

Výluh A = 0,202; c = 67,463794 mg/l

Odvar A = 0,183; c = 61,117918 mg/l

2. měření	pH pufru	Absorbance kolem 520 nm	Absorbance při 700 nm
Výluh (100x ředěno)	1,0	0,050	0,004
	4,5	0,012	0,007
Odvar (100x ředěno)	1,0	0,046	0,004
	4,5	0,011	0,004
Výluh (20x ředěno)	1,0	0,237	0,003
	4,5	0,050	0,003
Odvar (20x ředěno)	1,0	0,220	0,001
	4,5	0,038	0,002

Tabulka 2. Měření koncentrace monomerních anthokyanůve vzorcích odvaru a výluhu jednou zamražených a rozmražených

100x ředěné

Výluh A = 0,041; c = 68,46543 mg/l

Odvar A = 0,035; c = 58,446097 mg/l

20x ředěné

Výluh A = 0,187; c = 62,45383 mg/l

Odvar A = 0,183; c = 61,117918 mg/l

3. měření	pH pufru	Absorbance kolem 520 nm	Absorbance při 700 nm
Výluh (100x ředěno)	1,0	0,049	-0,001
	4,5	0,010	0,002
Odvar (100x ředěno)	1,0	0,043	-0,003
	4,5	0,005	-0,003
Výluh (20x ředěno)	1,0	0,226	-0,002
	4,5	0,031	-0,001
Odvar (20x ředěno)	1,0	0,216	-0,003
	4,5	0,031	-0,002

Tabulka 3. Měření koncentrace monomerních anthokyanů z 2x rozmražených vzorků výluhu a odvaru

100x ředěné

Výluh A = 0,042; c = 70,135316 mg/l

Odvar A = 0,038; c = 63,4557621 mg/l

20x ředěné

Výluh A = 0,196; c = 65,4596283 mg/l

Odvar A = 0,186; c = 62,1198513 mg/l

Poslední měření bylo provedeno na nově připravených vzorcích čaje s cílem ověřit homogenitu obsahu anthokyanů v jednotlivých květech ibišku.

4. měření	pH pufru	Absorbance kolem 520 nm	Absorbance při 700 nm
Výluh (100x ředěno)	1,0	0,047	-0,002
	4,5	0,007	-0,001
Odvar (100x ředěno)	1,0	0,043	-0,002
	4,5	0,005	-0,001
Výluh (20x ředěno)	1,0	0,225	-0,002
	4,5	0,034	-0,001
Odvar (20x ředěno)	1,0	0,216	-0,002
	4,5	0,035	-0,001

Tabulka 4. Kontrolní měření koncentrace monomerních anthokyanů v čerstvě připravených vzorcích odvaru a výluhu

100x ředěné

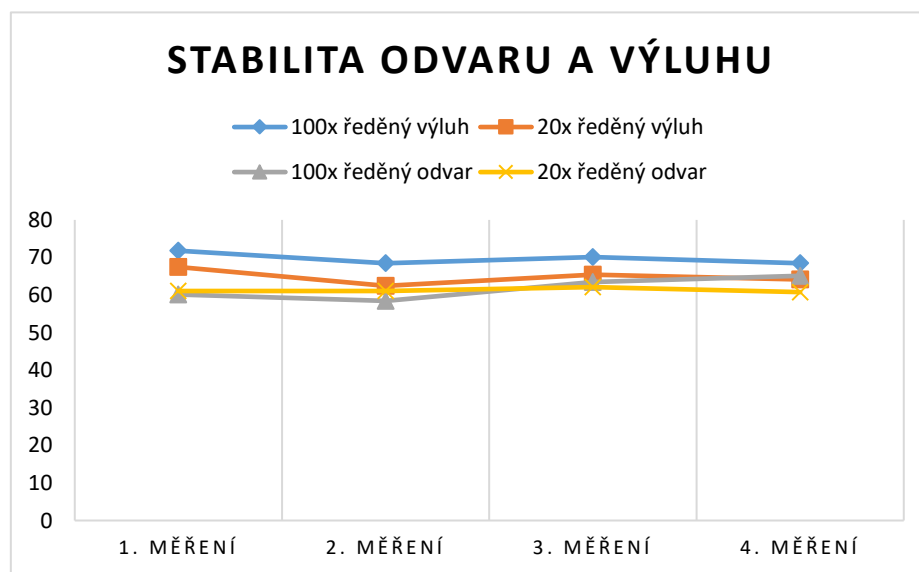
Výluh A = 0,041; c = 68,465428 mg/l

Odvar A = 0,039; c = 65,125651 mg/l

20x ředěné

Výluh A = 0,192; c = 64,123717 mg/l

Odvar A = 0,182; c = 60,783941 mg/l



Obrázek 17. Stabilita odvaru a výluhu v závislosti na opakovaném cyklu zmražení-rozmražení

Z našeho měření vyplývá, že změny v obsahu anthokyanů v odvaru a výluhu z květů ibišku súdánského při opakovaném zamrazování se výrazně nemění a obsah anthokyanů je stabilní, tato stabilita je patrná i po měsíci zamražení (obrázek 17).

Při stanovení obsahu anthokynů, při opakované přípravě odvaru a výluhu, jsme zjistili nižší koncentraci u vývaru o 4,65 % při ředění 100x a o 4,95 % při ředění 20x než při 1. měření a vyšší koncentraci u odvaru o 8,33 % při ředění 100x a nižší o 0,55 % při ředění 20x než při 1. měření.

5.3.2 Měření koncentrace monomerních anthokyanů v kandovaném ibišku

	pH pufru	vlnová délka abs. maxima (nm)	Absorbance 500 nm	Absorbance při 700 nm
1 hodina	1,0	502	0,227	-0,003
	4,5	500	0,384	-0,002
24 hodin	1,0	nedetekovatelné	nedetekovatelné	0,002
	4,5	498,69	0,409	0,002

Tabulka 5. Výsledky měření monomerních anthokyanů v kandovaném květu ibišku

Hodnoty absorbance při měření koncentrace monomerních anthokyanů v kandovaném ibišku, byly na hraně detekovatelnosti a vlnová délka absorpčního maxima se posunula k 500 nm. Z naměřených hodnot jsme nemohli získat správné koncentrace přítomných anthokyanů.

Při analýze vzorku, který extrahovaný 24 hodin, byl vzorek rozpuštěný v pufru o pH 1,0 nedetekovatelný, a proto nebyl získán výsledek.

Je pravděpodobné, že anthokyanů v kandovaném ibišku jsou rozloženy metodou přípravy této pochutiny. Analýzu anthokyanů mohou také ovlivňovat přidané látky v kandovaném ibišku, jako jsou cukry nebo barviva pro dobarvení.

5.3.3 Stanovení anthokyanů a anthokyanidinů pomocí HPLC

Nejdříve bylo nutné stanovit pomocí příslušných standardů retenční časy jednotlivých anthokyanů, které se v ibišku nacházejí. Dále byla provedena kalibrační závislost pro každý analyzovaný anthokyan. Následně byly vzorky odvaru a výluhu identifikovány a kvantifikovány na základě kalibrační závislosti.

	Anthokyan	Retenční čas	Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)
Odvar	Delfinidin – galaktosid (gala)	18,890	34,7114
	Delfinidin – glukosid (gluko)	19,406	1,9704
	Petunidin – gala	20,359	42,7735
	Petunidin – gluko	21,388	1,4533
	Malvidin – gala	22,208	0,1735
	Malvidin - gluko	22,786	0,4136

Tabulka 6. Koncentrace a retenční časy anthokyanů v odvaru ibiškového čaje

	Anthokyan	Retenční čas	Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)
Výluh	Delfinidin – galaktosid (gala)	18,901	36,2944
	Delfinidin – glukosid (gluko)	19,421	2,4730
	Petunidin – gala	20,366	53,1589
	Petunidin – gluko	21,427	1,7820
	Malvidin – gala	22,210	0,2685
	Malvidin - gluko	22,803	0,6926

Tabulka 7. Koncentrace a retenční časy anthokyanů ve výluhu ibiškového čaje

Na chromatogramu nebyl patrný pík odpovídající anthokyanu s kyanidinovou necukernou složkou. Při měření mohlo dojít k překryvu dvou píků a proto tento anthokyan nebyl identifikován.

Při analýze anthokyanidinů byly nejdříve stanoveny retenční časy jednotlivých anthokyanidinů podle standardů. Anthokyanidiny byly pak identifikovány podle retenčních časů. Ukázalo se výhodné zahuštění vzorku odpařením pod dusíkem a následným rozpuštěním

v malém objemu mobilní fáze. Na chromatogramu jsme dostali mnohem větší plochy píků a snáze se jednotlivé anthokyanidiny identifikovaly.

		Anthokyanidin	Retenční čas	Plocha píku
Odvar	Odpaření dusíkem	Delphinidin	18,144	11390996
		Kyanidin	22,091	8408815
	Pouze hydrolyzovatelné	Delphinidin	18,380	868888
		Kyanidin		neidentifikován

Tabulka 8. Anthokyanidiny nalezené v odvaru ibiškového čaje

		Anthokyanidin	Retenční čas	Plocha píku
Výluh	Odpaření dusíkem	Delphinidin	18,136	16430546
		Kyanidin	22,105	10024206
	Pouze hydrolyzovatelné	Delphinidin	18,439	961564
		Kyanidin	22,327	558463

Tabulka 9. Anthokyanidiny nalezené ve výluhu ibiškového čaje

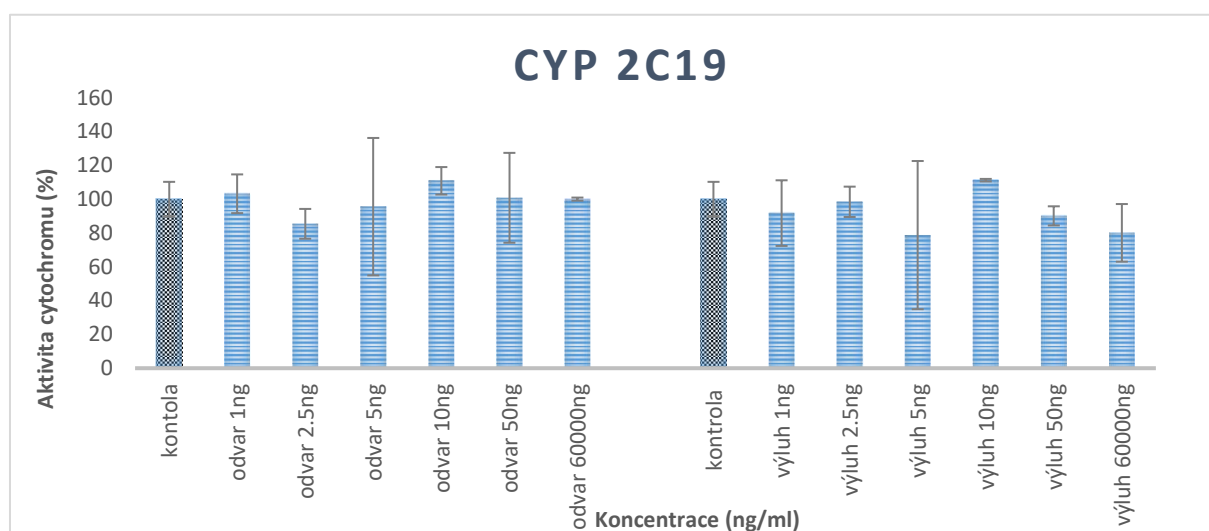
U vzorků odvaru a výluhu byly pouhou hydrolyzou nebo s využitím zahuštění vzorku nalezeny dva anthokyanidiny a to dephinidin a kyanidin. Kyanidin u hydrolyzovaného vzorku odvaru nebylo možné identifikovat, jelikož pravděpodobně došlo k rozpadu píku na dvě části. Petunidin a malvidin nebyly ve vzorcích identifikovány.

5.3.4 Stanovení inhibice aktivit jaterních cytochromů P450

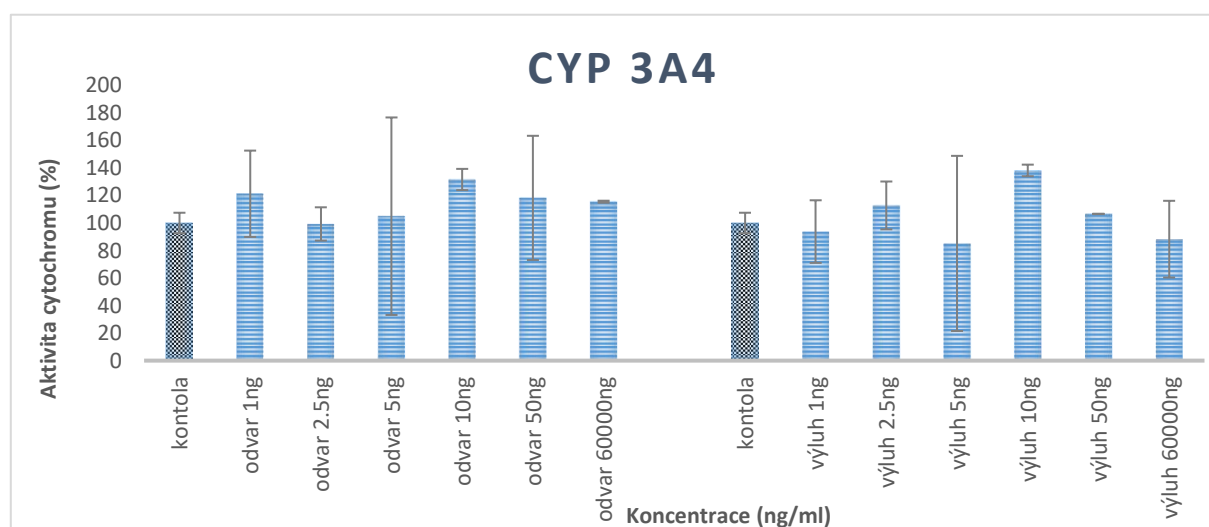
Všechny výsledky inhibicí aktivit vybraných cytochromů P450 jsou uvedeny v tabulkách 18-24. Všechna data jsou vztažena ke kontrolní aktivitě tzn. k reakčnímu systému bez přídavku odvaru a výluhu, který má hodnotu 100 %.

5.3.4.1 Inhibice aktivity CYP2C19 a CYP3A4 při metabolismu diazepamu

Měření vlivu odvaru a výluhu na aktivitu cytochromu P450 2C19 i 3A4 při použití diazepamu jako substrátu ukazuje, že inhibice aktivit enzymů byla velmi nepatrná. Inhibice se pohybuje okolo 80 % původní hodnoty. To dokazuje, že anthokyany nejsou specifickými inhibitory CYP2C19 a CYP 3A4.



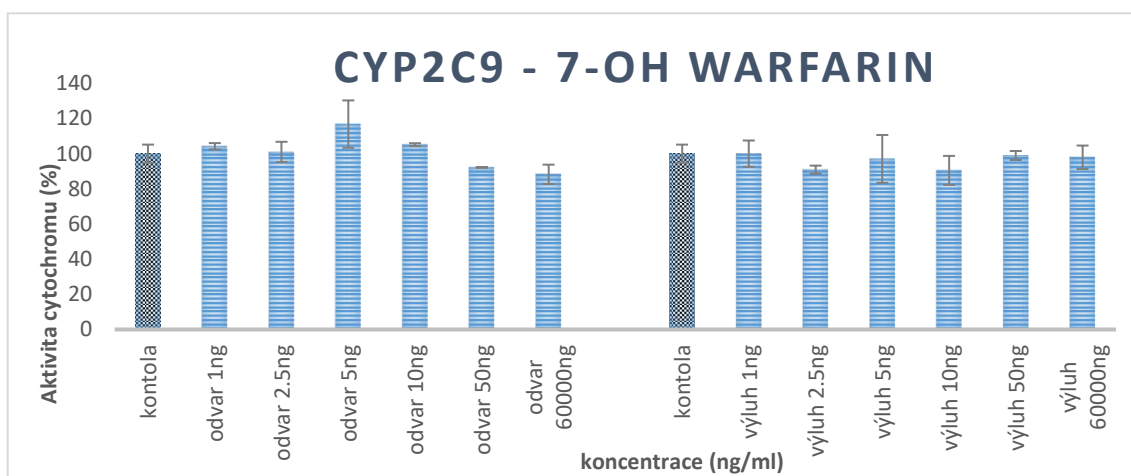
Obrázek 18. Inhibice aktivity CYP2C19



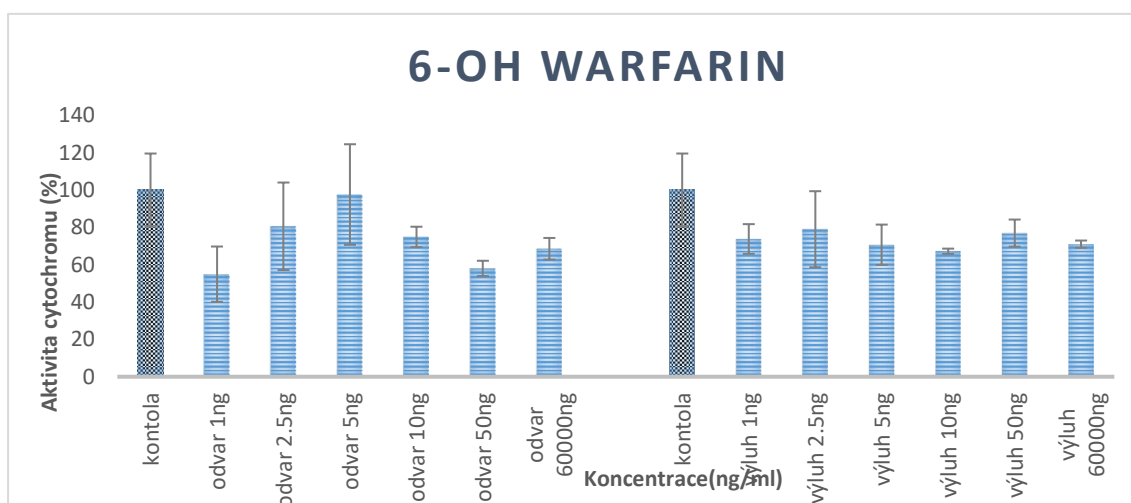
Obrázek 19. Inhibice aktivity CYP3A4

5.3.4.2 Inhibice aktivity CYP při metabolismu warfarinu

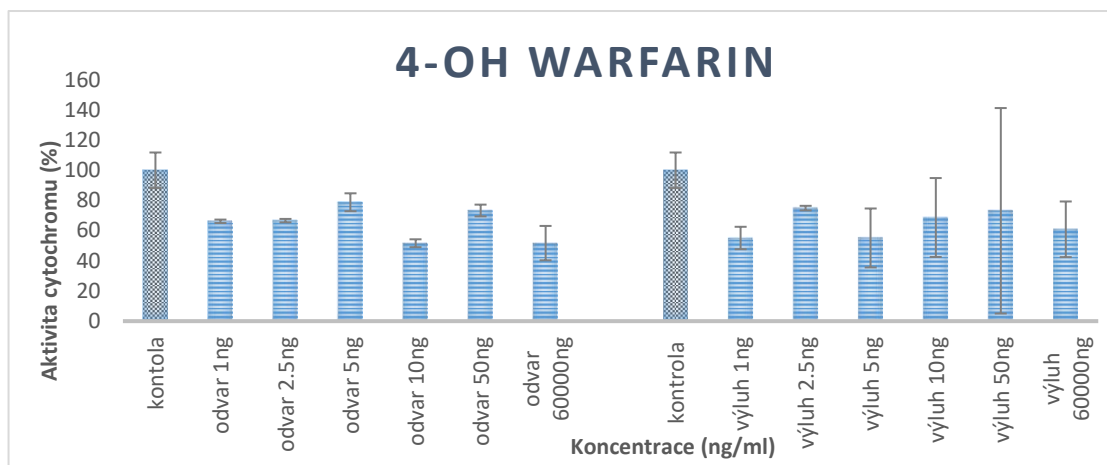
Po měření aktivity všech forem cytochromů P450, které metabolizují warfarin bylo zjištěno, že došlo jen k menší inhibici těchto enzymů. Efekt na nejvýznamnější enzym metabolismu warfarinu, CYP2C9, je na obrázku 20. U dalších metabolitů warfarinu, kde specifita warfarinu pro jednotlivé formy cytochromu P450 není tak výrazná jsou uvedeny výsledky na obrázcích 21-23. U metabolitu 6-OH warfarinu došlo k největší inhibici u odvaru o 50 % při koncentraci 1 ng/ml, další inhibice nejsou koncentračně závislé. U metabolitu 4-OH warfarinu došlo k největší inhibici u odvaru o 55 % při koncentraci 10 ng/ml, u metabolitu 10-OH warfarinu došlo k největší inhibici u odvaru o 65 % při koncentraci 60 000 ng/ml. U metabolitů 6-OH, 4-OH a 10-OH warfarinu bylo stanovení zatíženo velkou chybou, protože velikost píků byla na hraně detekovatelnosti.



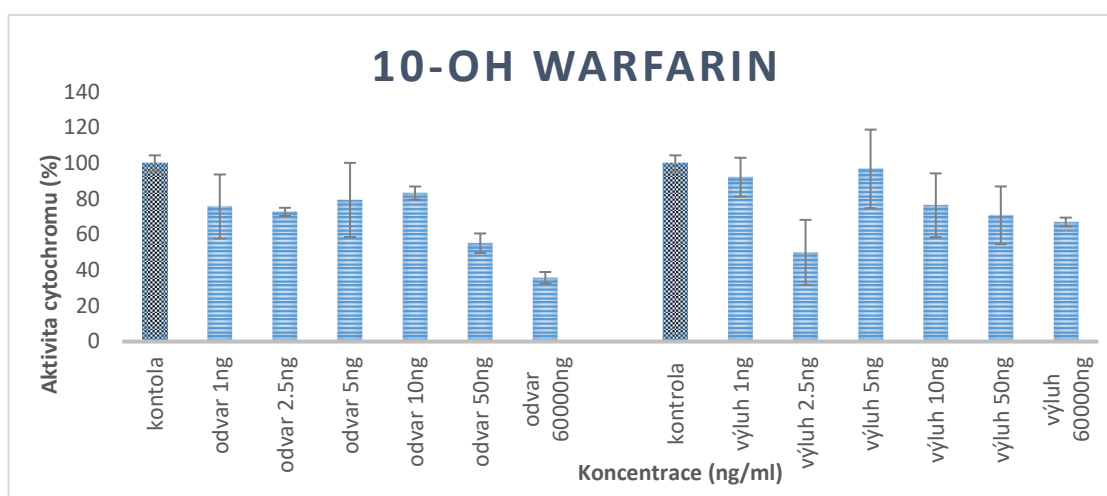
Obrázek 20. Inhibice aktivity CYP2C9



Obrázek 21. Inhibice aktivity



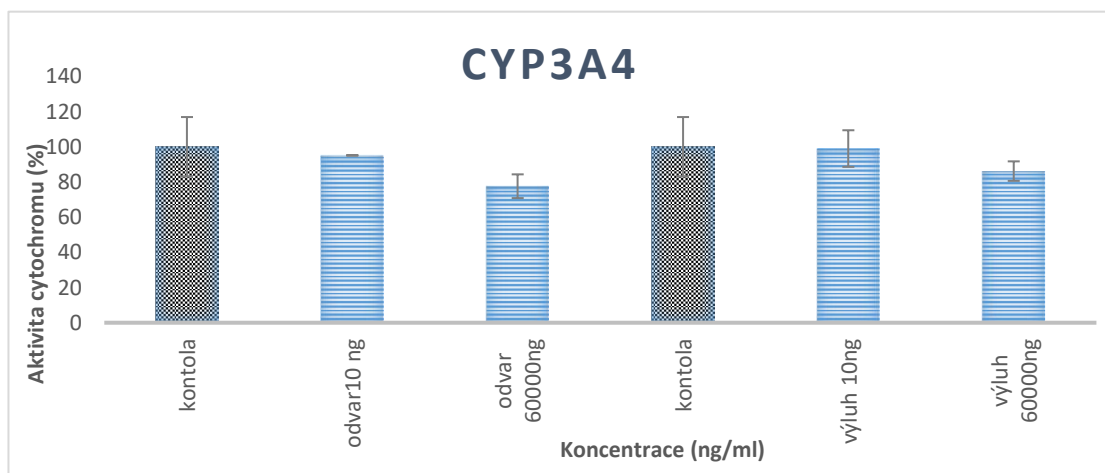
Obrázek 22. Inhibice aktivity



Obrázek 23. Inhibice aktivity

5.3.4.3 Inhibice aktivity CYP3A4 při metabolismu testosteronu

Naším měřením bylo zjištěno, že anthokyany výrazně neinhibují aktivitu CYP3A4 se substrátem testosteronem. Jejich inhibice se pohybuje okolo 20 % vůči kontrolní hodnotě u odvaru při koncentraci 60 000 ng/ml.



Obrázek 24. Inhibice aktivity CYP3A4

6 Diskuse

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda účinné látky, které se nacházejí v odvaru a výluhu sušeného květu ibišku súdánského, mají vliv na aktivitu vybraných cytochromů P450. Těmito účinnými látkami jsou především rostlinné flavonoidy a jejich deriváty anthokyaniny, které jsou čím dál častěji konzumovány jako běžná strava nebo pochutiny a jsou také využívány jako součást doplňků stravy nebo i jako barviva. Odvar z ibišku se v současné době používá také např. při přípravě domácích osvěžujících nápojů nebo i jako lék na různá onemocnění. V tomto smyslu je možné zmínit jeho diuretický a antihypertenzní efekt. Působení látek obsažených v ibišku na cytochromy P450 by mohl ovlivňovat metabolismus některých léčiv.

Naše studie se zabývala vlivem odvaru a výluhu z ibišku súdánského na aktivitu cytochromů P450 přítomných v mikrosomální fraksi lidských hepatocytů. Z výsledků je patrný významný inhibiční vliv na aktivitu CYP3A4 při použití warfarinu jako substrátu. V tomto případě odvar z ibišku snížil koncentraci metabolitu 10-OH warfarinu až o 65%. Při použití testosteronu jako specifického substrátu pro lidský CYP3A4, však došlo k inhibici jen při nejvyšší použité koncentraci odvaru (60 000 ng/ml), a to o 20 %. U dalších metabolitů warfarinu 4-OH warfarinu a 6-OH warfarinu došlo také ke snížení koncentrace (až o 60%), ale zde nebylo snížení koncentračně závislé. Ani při sledování změn koncentrace metabolitů diazepamů, kde za metabolické přeměny jsou zodpovědné CYP2C19 a CYP3A4, nebyly zjištěny výrazné inhibice. Při srovnání s publikovanými daty je nutné zmínit studii, kde byly použity potkani Wistar v „*in vivo*“ experimentu. Zde byl sledován efekt dávkové závislosti vodného extraktu z ibišku súdánského na vybrané CYP. V této studii bylo zjištěno, že ani jedna použitá koncentrace neovlivnila jak celkový obsah CYP, tak aktivity studovaných forem cytochromu P450. Důvod odlišnosti výsledků aktivit je pravděpodobně rozdíl mezi experimenty *in vivo* a *in vitro*. U *in vivo* experimentů musíme počítat s velmi nízkou biodostupností přírodních polyfenolů [26].

Naše výsledky naznačují, že současné podávání vodných roztoků odvaru či výluhu z ibišku súdánského a léčiv metabolizovaných zejména CYP3A4, by teoreticky mohlo ovlivnit metabolismus daného léčiva.

7 Závěr

Předkládaná bakalářská práce se zabývá vlivem účinných látek přítomných v květu ibišku súdánského na aktivitu vybraných cytochromů P450 (CYP3A4, CYP2C18/19, CYP2C8/9, CYP1A1/2).

Z výsledků experimentů vyplývá:

V odvaru a výluhu z ibišku súdánského bylo nalezeno 7 antokyanů (DEL-glu, DEL-gala, DEL-ara, KYA-gala, KYA-ara, PET-glu, PET-gala) a nejméně 2 antokyanidiny (DEL, KYA).

Při sledování stability anthokyanů v připraveném odvaru a výluhu bylo zjištěno, že opakované zmražení a rozmražení nemá vliv na koncentraci těchto látek.

U CYP3A4 a CYP2C8/9/18/19, s využitím warfarinu jako substrátu pro cytochromy P450, došlo v mikrosomální frakci jaterního homogenátu k inhibici těchto forem CYP. Přesto, vzhledem k nízké biodostupnosti polyfenolických látek, lze předpokládat, že užívání odvaru a výluhu z ibišku súdánského nemá signifikantní vliv na metabolismus warfarinu *in vivo*.

Cíle práce byly splněny.

Seznam použité literatury

- [1] KNEJZLÍK Z., KÁŠ J., RUML T. *Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace*. **1999**. Chemické Listy 94, 913 n 918
- [2] DOSTÁLEK M., JANOŠTÍKOVÁ E., JUŘICA J., ZAHRADNÍKOVÁ L., aj. *Farmakokinetika*. **2006**. Praha: Grada Publishing, a.s. 220 s. ISBN 80-247-1464-7
- [3] STIBOROVÁ M., HUDEČEK J., HODEK P., FREI E. *Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví*. **1999**. Chemické listy 93, 229 - 237
- [4] ANZENBACHER P., ANZENBACHEROVÁ E. *Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics*. **2001**. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, Volume 58, Issue 5, pp 737–747
- [5] ZANGER M. U., SCHWAB M. *Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation*. **2013**. Pharmacology & Therapeutics 138, 103–141
- [6] KOUSALOVÁ L., BARANOVÁ J., ANZENBACHER P. *Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – část I. Interakce na úrovni CYP3A4*. **2003**. Klin Farmakol Farm 17, 151 – 157
- [7] LINHARD I., KOČÍ R., ŘEZÁČOVÁ K., KLIMEŠOVÁ B. *TOXIKOLOGIE, Interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projev a důsledky*. **2012**. Vysoká škola chemicko-technologická Praha. 376 s. ISBN 978-80-7080-806-1
- [8] JOVEN J., MERIENDEZ J. BELTRÁN-DEBÓN R., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A. *Direct characterization of aqueous extract of Hibiscus sabdariffa using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS*. October 2009 Journal of separation science, 32, 3441 – 3448
- [9] DA-COSTA-ROCHA I., BONNLEANDER B., SIEVERS H., PISCHEL I., HEINRICH M. *Hibiscus sabdariffa L. – a phytochemical and pharmacological review*. **2014**. Food chemistry 165, 424-443
- [10] OJEDA D., JIMÉNEZ-FERRER E., ZAMILPA A., HERRERA-ARELLANO A., TORTORIELLO J., ALVAREZA L. *Inhibition of angiotensin convertin enzyme*

- (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. **2010**. Journal of Ethnopharmacology 127, 7–10
- [11] PIETTA P. G. *Flavonoids as antioxidant*. **1999**. J. Nat. Prod. 63, 1035-1042
- [12] GUARDIA T., ROTELLI E. A., JUAREZ O. A., PELZER E. L. *Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat*. **2001**. Il Farmaco 56, 683-687
- [13] DLUGOŠOV K., PŠENÁKOVÁ I. *Oxidačné účinky vybraných sekundárnych metabolitov*. 2004. Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave
- [14] FORMICA J.V., REGELSON W. *Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids*. **1995**. Food Chem Toxicol. 33(12), 1061-80.
- [15] CHABINOVÁ J., ZÍTKA O., HÚSKA D., KLEJDUS B., KRIZEK R. *Optimization chromatographic isolation of anthocyanins*. **2011**. MendelNet, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno
- [16] KOUAKOU TH., KONKON NG., AYILIÉ K., OBOUAYEBA APOD., ABEDA ZH., KONÉ M. *Anthocyanin production in calyx and callus of Roselle (Hibiscus Sabdariffa) and its impact on antioxidant activity*. **2015**. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 4(3), 09-15
- [17] KOMONPATANA K., GIUSTI M. M., ET. *Susceptibility of anthocyanins to ex vivo degradation in human saliva*. 2013, Nov 15. Food chemistry, volume 135, issue 2, pages 738 - 747
- [18] ATALAYS M., BAGCHI D., SEN C. K., BAGCHI M. *Anti-angiogenic, Antioxidant, and Anti-carcinogenic Properties of a Novel Anthocyanin-Rich Berry Extract Formula*. 2003, April 30. Biochemistry (Moscow), Vol. 69, No. 1, 2004, pp. 75-80
- [19] JAYAPRAKASAM B., VAREED S. K., ET. *Insulin Secretion by Bioactive Anthocyanins and Anthocyanidins Present in Fruits*. 2005. Food Chemistry 53 (1), pp 28–31
- [20] XU, Jianteng. *Identificatin and stability of acylated anthocyanins in purplefleshed sweetpotato p40*. **2013**. Master of science. Kancas state university

- [21] MA T., HU N., DING C., ZBANG Q., LI W., SUO Y., WANG H., BAI B., DING C. *In vitro and in vivo biological activities of anthocyanins*. **2016**. Nitraria tangutorun Bobr. fruits. Food chemistry, 194, 296-303.
- [22] HU Y., DENG L., CHEN J., ZHOU S., LIU S., FUMY., YANG C., LIAO Z., CHEN M. *An analytical pipeline to compare and characterise the anthocyanin antioxidant activities of purple sweet potato cultivars*. **2016**. Food chemistry, 194, 46-54.
- [23] DURST R. W., WROLSTAD, R. E. *Separation and characterization of anthocyanins by HPLC*. **2001**. Current Protocols in Food Analytical Chemistry.
- [24] SLÍVA J. *Centrální myorelaxancia ve světle „evidence based medicine“*. **2008**. Ústavy farmakologie 2. a 3. LF UK, Praha
- [25] BULTAS J. *Úskalí při léčbě warfarinem – jak je řešit?*. **2017**. Farmakologický ústav 3. LF UK, Praha
- [26] PROMMETTA P. P-nL., CHAICHANTIPYUTH CH., NIWATTISAIWONG N., LAWANPRASERT S. *Aqueous extract of the calyces of Hibiscus subdariffa Linn.: effects on hepatic cytochrome P450 and subacute toxicity in rats*. **2006**. Thai J Pharm Sci, 30, 8-18
- [27] SHARAM R.J., GUPTA R.C., SINGH S., BANSAL A.K., SINGH I.P. *Stability of anthocyanins- and anthocyanidins-enriched extracts, and formulations of fruit of Eugenia jabolana („jamun“)*. **2016**. Food chemistry, 190, 308-817