

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra organické chemie



**Vliv přírodních polyfenolických látek na jaterní  
biotransformační enzymy**

*Bakalářská práce*

Autor:	Tereza Moučková
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.
Konzultant práce:	Mgr. Jiří Prokop
Akademický rok:	2017/2018

**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,

Podpis

**Poděkování:**

Ráda bych touto cestou poděkovala především mé vedoucí, paní docentce RNDr. Evě Anzenbacherové, CSc. za trpělivost, odborné vedení mé bakalářské práce a veškeré rady, které mi v průběhu vypracování práce poskytla. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Jiřímu Prokopovi a všem ostatním pracovníkům na Ústavu Lékařské chemie a biochemie, LF UPOL za pomoc a vytvoření příjemných podmínek na pracovišti. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, která mi vytvořila stabilní zázemí a poskytla podporu po celou dobu mého studia.

**Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: Tereza Moučková  
Název práce: Vliv přírodních polyfenolických látek na jaterní biotransformační enzymy  
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: 2018  
Abstrakt:

Přírodní polyfenolické látky, mezi které se řadí anthokyany, jsou pro lidský organismus nepostradatelné antioxidanty. Antioxidanty pomáhají chránit organismus před volnými radikály. Anthokyany patří mezi cizorodé látky, a proto mohou být metabolizovány biotransformačními enzymy, cytochromy P450.

Cílem této bakalářské práce je studium aktivity jaterních cytochromů P450 u potkanů krmených pšenice obohacenými o anthokyany. Analýzou těchto enzymů pomocí specifických substrátů a HPLC nebylo zjištěno významné ovlivnění aktivity anthokyany. Produkce pečiva z pšenice obohacených o anthokyany by mohla být vhodnou cestou, jak doplnit antioxidanty a chránit tak organismus před oxidačním stresem.

Klíčová slova: Cytochromy P450, polyfenoly, anthokyany, HPLC  
Počet stran: 55  
Jazyk: Čeština

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Tereza Moučková

Title: The influence of natural polyphenolic compounds on the hepatic biotransformation enzymes

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc

Advisor: Doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc

The year of presentation: 2018

Abstract: Anthocyanins, natural polyphenolic products, are irreplaceable antioxidants for human body. Antioxidants help to protect organism against reactive oxygen species. Anthocyanins are xenobiotics for our body, so they can be metabolized by biotransformation enzymes-cytochromes P450.

The aim of this bachelor thesis is to study the activity of the liver cytochromes P450. These cytochromes are obtained from rats which were fed with wheat enriched with anthocyanins. Analysis of the properties of these enzymes with specific substrates (using the HPLC) reveal no significant influence of anthocyanins on cytochrome P450 activity. The baking of bread from wheats containing anthocyanins could be a good choice to supply the antioxidants to the man, which may protect the organism against oxidative stress.

Keywords: Cytochromes P450, polyphenols, anthocyanins, HPLC

Number of pages: 55

Language: Czech

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

<b>CYP</b>	cytochromy P450
<b>GIT</b>	gastro-intestinální trakt
<b>ADME</b>	absorpce-distribuce-metabolismus-exkrece
<b>NADH</b>	redukovaný $\beta$ -nikotinamidadenindinukleotid
<b>NADPH</b>	redukovaný $\beta$ -nikotinamidadenindinukleotid fosfát
<b>ROS</b>	reactive oxygen species
<b>MEOS</b>	microsomal ethanol oxidizing system
<b>HPLC</b>	high performance liquid chromatography
<b>K<sub>D</sub></b>	distribuční konstanta
<b>IDH</b>	isocitrát dehydrogenáza
<b>ISO</b>	kyselina DL-isocitronová
<b>NADP</b>	$\beta$ -nikotinamidadenindinukleotid
<b>TRIS</b>	tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>BCA</b>	sůl kyseliny bicinchininové
<b>EDTA</b>	sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
<b>PMSF</b>	fenylmethansulfonyl chlorid
<b>HP</b>	homogenizační pufr

## Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:	16
CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE:	19
ÚVOD:	20
TEORETICKÁ ČÁST:	11
1. Biotransformace cizorodých látek:	11
1.1. I. fáze (funkcionalizace):	12
1.2. II. fáze (konjugace):	12
2. Cytochromy P450:	13
2.1. Struktura CYP:	13
2.2. Nomenklatura CYP:	14
2.3. CYP v lidském organismu:	14
2.4. Významné izoenzymy:	15
2.4.1. CYP1A:	15
2.4.2. CYP2C:	15
2.4.3. CYP2D:	16
2.4.4. CYP2E:	16
2.4.5. CYP3A:	16
3. Přírodní polyfenoly:	17
3.1. Flavonoidy:	18
3.2. Anthokyany:	18
4. HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie):	20
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST:	22
6. METODIKA:	22
6.1. Materiál:	22
6.1.1. Potkaní mikrosomální frakce:	22
6.1.2. Chemikálie:	23
6.1.3. Přístrojové vybavení:	23
6.2. Metody:	24
6.2.1. Příprava mikrosomální frakce z jater potkana:	24
6.2.2. Stanovení koncentrace CYP v mikrosomální frakci:	25
6.2.3. Stanovení celkové koncentrace proteinu:	25
6.2.4. Kalibrační křivky pro stanovení metabolitů CYP pomocí HPLC:	26
6.2.5. Stanovení aktivit CYP:	28
7. VÝSLEDKY:	38

7.1. Charakterizace mikrosomální frakce potkaního jaterního homogenátu.....	38
7.2. Kalibrace použitých analytických metod.....	38
7.2.1. Kalibrace metody pro stanovení 4'- hydroxydiklofenaku, metabolitu diklofenaku, s využitím HPLC.....	38
7.2.2. Kalibrace metody pro stanovení 6'- hydroxychlorzoxazonu, metabolitu chlorzoxazonu s využitím HPLC.....	39
7.3. Stanovení aktivit CYP.....	40
7.3.1. Stanovení aktivity CYP1A.....	40
7.3.2. Stanovení aktivity CYP2E s využitím chlorzoxazonu.....	42
7.3.3. Stanovení aktivity CYP3A s využitím testosteronu.....	42
7.3.4. Stanovení aktivity CYP2D s využitím bufuralolu.....	43
7.3.5. Stanovení aktivity CYP2C.....	44
7.3.6. Stanovení aktivity CYP2B s využitím 7- ethoxy – 4 - (trifluorometyl)kumarin (EFC) 48	
DISKUZE.....	50
ZÁVĚR.....	52



## **CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

- Seznámit se s problematikou metabolismu cizorodých látek rostlinného původu v živých organismech.
- Osvojit si práci s biologickým materiálem a seznámit se s metodami pro měření aktivity enzymů, zejména cytochromů P450.
- Provést vlastní experimenty zaměřené na měření aktivity různých forem cytochromů P450 po konzumaci anthokyanů, vyhodnotit a zpracovat získaná data.
- Zhodnotit, zdali naměřené změny aktivit cytochromů P450 po konzumaci pšenice obohacené anthokyanem mohou být klinicky významné.

## ÚVOD

Moderní civilizace se stále více odklání od přírody, což přináší lidem nepříznivé zdravotní důsledky. V naší stravě chybí dostatek zeleniny a ovoce. Tělo tak nedostává potřebné účinné látky, zejména antioxidanty, a nemůže udržovat přirozenou rovnováhu mezi volnými radikály a antioxidanty. Radikály se tak v těle hromadí a mohou negativně interagovat s molekulami ve svém okolí. Při nedostatečné konzumaci antioxidantů obsažených např. v ovoci a zelenině se naše tělo vystavuje riziku civilizačních onemocnění, ateroskleróze, onemocnění jater a mnoha dalším.

Tento nepříjemný trend se snaží napravit projekt Mendelovy Univerzity v Brně a Zemědělského výzkumného ústavu v Kroměříži, jehož cílem je pěstování pšenice s geny upravenými pro syntézu anthokyanů. Anthokyaniny (jedna ze skupiny polyfenolických látek) jsou sekundární metabolity rostlin, které způsobují zbarvení květů i ostatních částí rostlin červeně, modře a fialově. Jejich konzumace má blahodárný vliv na celkový zdravotní stav organismu, významný je jejich boj s oxidačním stresem.

Na druhou stranu je třeba připomenout, že i anthokyaniny jsou pro organismus cizorodé látky a je tedy důležité vědět, jaký je jejich osud v organismu a jakým způsobem interagují s biotransformačními enzymy. Hlavními jaterními biotransformačními enzymy jsou cytochromy P450 (CYP), které metabolizují většinu cizorodých látek (xenobiotik) v těle. Účastní se tzv. I. fáze biotransformace xenobiotik, ale metabolizují také endogenní substráty např. steroidní hormony. CYP můžeme najít hlavně v játrech ale i mozku, GIT, plicích nebo kůži.

Tato bakalářská práce se věnuje zkoumání vlivu anthokyanů na jaterní cytochromy P450.

## TEORETICKÁ ČÁST

### 1. Biotransformace cizorodých látek

Živé organismy se každým okamžikem setkávají s cizorodými (exogenními) látkami z okolí. Tyto látky, označované jako xenobiotika, se do těla dostávají především potravinami gastrointestinálním traktem, ale také v plynné formě do dýchacích cest, v menší míře se vstřebávají kůží.<sup>1</sup> Absorbované xenobiotikum je distribuováno krevním oběhem v organismu, kde představuje riziko, protože může interagovat s endogenními cíli a narušit fyziologické pochody, nebo se může v těle akumulovat (tzv. bioakumulovat).<sup>2</sup> Obecně se xenobiotikum řídí v organismu farmakokinetickými fázemi ADME (absorpce, distribuce, metabolismus a exprese). K metabolickým přeměnám cizorodých látek využívají organismy především tzv. biotransformační enzymy. Tyto enzymy mění chemickou strukturu xenobiotika s cílem omezit vstup do tkání, omezit interakce s endogenními látkami a urychlit eliminaci z organismu. Každé xenobiotikum se liší svým metabolismem v organismu a stav každého organismu může ovlivnit metabolismus xenobiotika (věk, pohlaví, onemocnění, genetické podmínky).<sup>1,3</sup>

Biotransformace se odehrává především v hepatocytech, konkrétně v endoplazmatickém retikulu, mitochondriích, lysozomech nebo cytosolu. Vliv na metabolismus xenobiotika má mnoho faktorů jako např. chemická struktura, ionizovatelnost, polarita či stereochemie látky. Zatímco ionizované a hydrofilní látky se vylučují z organismu převážně v nezměněné formě ledvinami, lipofilní látky musí být metabolizovány. V některých případech mohou být reabsorbovány z ledvin do krve přes glomerulární filtrát, metabolizovány a pak vyloučeny močí nebo procházejí enterohepatálním oběhem a mohou být vyloučeny stolicí. Samotná biotransformace může mít vliv na biologickou aktivitu látky - může ji zvýšit, nezměnit nebo snížit. Průběh biotransformace může narušit i onemocnění jater jako - hepatitida, biliární cirhóza, steatóza nebo poškození jater alkoholem.<sup>2, 3, 4</sup>

Obecně lze biotransformaci rozdělit na dvě části. Bývají označovány jako I. fáze a II. fáze. Ne každá látka však prochází oběma fázemi.

### **1.1. I.fáze (funkcionalizace)**

V této fázi dochází k vytvoření polárních funkčních skupin na metabolizované molekule látky, což umožňuje její snazší vyloučení z organismu.<sup>4</sup> Navázáním nebo odhalením funkční skupiny lze biologickou aktivitu látky zvýšit i snížit nebo může zůstat nezměněna, nejedná se tedy pouze o detoxikaci. Touto cestou mohou v organismu dokonce také vzniknout toxické metabolity jinak netoxických látek (např. paracetamol). Některé látky jsou zcela inaktivovány již v této fázi (warfarin či noradrenalin). Hlavním chemickým dějem I. fáze metabolismu cizorodých látek je oxidace, v menší míře také redukce, hydratace izomerace nebo hydrolytické reakce.<sup>4,5</sup>

Právě v této fázi hrají nejdůležitější roli cytochromy P450 metabolizující většinu léčiv. Kromě léčiv se účastní metabolických přeměn i látek těla vlastních.<sup>5</sup> Aktivita cytochromů P450 může být zvýšena indukci proteosyntézy nebo může být snížena např. inhibicí těchto enzymů. Tato skutečnost je významná při určování možné interakce léčiv na úrovni metabolismu. Pokud nějaká cizorodá látka např. z potravy inhibuje jaterní CYP, nedochází k odbourání současně podávaného léčiva a může dojít k jeho hromadění v organismu až na toxickou hodnotu. Naopak induktory cytochromů mohou zvýšenou aktivitou enzymů způsobit snížení terapeutické dávky léčiva a znehodnocení požadovaného vlivu na organismus.<sup>4,5</sup>

Mezi další významné enzymy první biotransformační fáze patří také: peroxidázy, reduktázy, hydrolázy, alkoholdehydrogenázy a aldehyddehydrogenázy, mitochondriální aminooxidázy atd.<sup>1,5</sup>

### **1.2. II. fáze (konjugace)**

V druhé fázi metabolismu cizorodých látek dochází ke konjugaci metabolitů s endogenními substráty za účasti konjugačních enzymů. Výsledné konjugáty jsou ještě polárnější a většinou méně biologicky aktivní než prvotní xenobiotikum a mohou být z těla vyloučeny (zejména močí).<sup>1, 5</sup> Reakce druhé fáze bývají rychlejší a proto je celková rychlost metabolizace určena převážně nesyntetickou první fází. Konjugační fáze vyžaduje dodání energie – endogenní látka, která vstupuje do konjugační reakce, musí být aktivována vazbou s makroergní molekulou.<sup>1</sup>

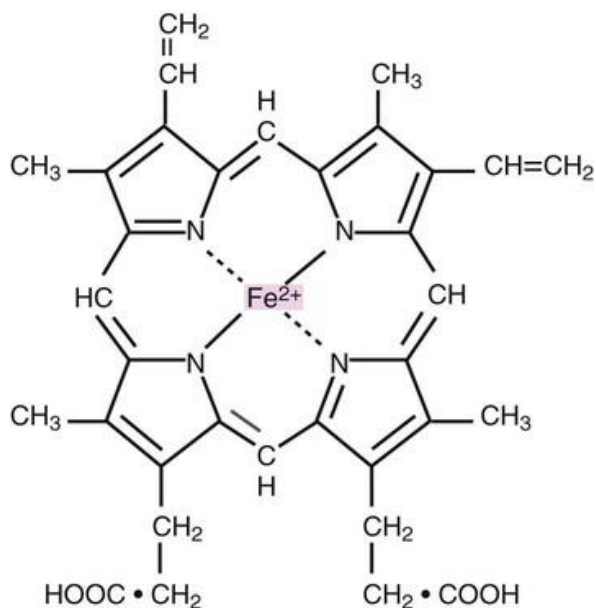
Hlavními typy konjugačních reakcí této fáze jsou: konjugace s kyselinou glukuronovou nebo sírovou, konjugace s glutathionem či s aminokyselinami, acetylace a methylace.<sup>3</sup>

## 1. Cytochromy P450

Cytochromy P450 byly objeveny v roce 1958.<sup>6</sup> Nacházejí se v buňkách, zejména v membráně endoplazmatického retikula, dále také v mitochondriích, lysozomech a cytosolu. Společně s hemoglobinem a myoglobinem patří do skupiny hemových proteinů. Cytochromy P450 se vyskytují ve všech životních formách od bakterií po rostliny, houby a živočichy. Vývojově jsou starší než výše zmíněný hemoglobin. Z jediného genu cytochromu P450 bakterií se do současné doby vyvinulo ohromné množství odlišných genů kódující cytochromy prokaryontních i eukaryotních organismů. Jejich evoluce se datuje do doby před 2-3 miliardami let, kde plnily úlohu v metabolismu endogenních substrátů. Další mezník nastal v době, kdy zvířata začala pojídat rostliny, a potřebovala si vytvořit ochranný systém proti látkám obsažených ve stravě. Podobná situace nastala, když člověk sám začal syntetizovat do té doby neexistující sloučeniny a začal je vnášet do životního prostředí. Za posledních 400 milionů let jsme zaznamenali prudký nárůst nových forem CYP, což je způsobeno především duplikací a konverzí CYP genů, která metabolizují nová xenobiotika.<sup>2</sup>

### 1.1. Struktura CYP

Tyto hemoproteiny obsahují hem b (protoporfyrin IX.), podobně jako hemoglobin nebo myoglobin. Porfyrinový skelet je v molekule částečně vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry, tedy sulfhydrylové skupiny cysteinu, která tvoří pátý ligand hemového železa. Aktivace molekulárního kyslíku spočívá v působení protilehlého, pátého ligandu hemového železa, kterým je právě thiolátová síra.<sup>4,7</sup> Toto uspořádání umožňuje výjimečné chování těchto hemoproteinů a odlišuje se tak od hemoproteinů ostatních (Obr.1).



**Obrázek 1:** Protoporfyryl IX s thiolátovou vazbou <sup>26</sup>

## 1.2. Nomenklatura CYP

Některé vlastnosti si tyto enzymy nesou již ve svém jméně. Jsou lokalizovány v buňkách - *cyto* a byly objeveny jako rostlinné pigmenty - *chromy*. Dnes se však toto pojmenování považuje za zastaralé. Díky unikátním spektrálním vlastnostem jejich komplexu redukované formy s CO je k názvu přiřazena číslice 450, značící vlnovou délku absorpčního maxima tohoto komplexu. <sup>2</sup>

CYP se vyskytují v mnoho formách (izoenzymech) <sup>12</sup>, které jsou řazeny do rodin a podrodin podle pořadí aminokyselin, tedy podle jejich primární struktury. Pokud je homologie primární struktury enzymů 40 % a víc, můžeme je zařadit do stejné rodiny značené arabskou číslicí (např. CYP1, CYP2,...). Dále se cytochromy řadí do podrodin a to na základě homologie sekvence aminokyselin 60 % a výš. Podrodiny značí velké písmeno, které následuje po arabské číslici značící rodinu (např. CYP3A, CYP2B...). Poslední arabská číslice v názvu značí konkrétní formu cytochromu (např. CYP3A4). <sup>8</sup>

## 1.3. CYP v lidském organismu

Cytochromy P450 se nacházejí hlavně v játrech, v nejvýznamnějším detoxikačním orgánu lidského těla. Dále je můžeme najít v plicích, tenkém střevě, ledvinách, kůži, mozku či nadledvinkách. <sup>4, 11</sup>

V membráně endoplazmatického retikula cytochromy P450 spolupracují při transportu elektronů s dalšími enzymy a proteiny, které jsou zde lokalizovány. Je to

především NADH-cytochrom-P450-reduktasa, cytochrom b<sub>5</sub> i další. Obecně a zjednodušeně lze tyto reakce kvantitativně vyjádřit rovnicí (1):<sup>2</sup>



Výsledkem enzymového děje, do kterého vstupuje substrát (RH), kyslík a redukovaný koenzym (NADPH+H<sup>+</sup>), je hydroxylovaná molekula substrátu (R-OH) molekula vody a oxidovaný koenzym (NADP<sup>+</sup>). Kromě hydroxylačních reakcí katalyzují cytochromy P450 i další reakce např. N-dealkylace, O-dealkylace, deaminace, sulfoxidace, N-oxidace nebo dehalogenace.<sup>2, 4, 11</sup>

## 1.4. Významné izoenzymy

### 1.4.1. CYP1A

U většiny savců, stejně jako u člověka, se podrodina 1A skládá ze dvou cytochromů P450: CYP1A1 a CYP1A2. Tyto enzymy byly poprvé izolovány z potkaních jater po indukci methylchlorantrenem.<sup>4</sup>

CYP1A1 je lokalizován extrahepatálně a v játrech se jeho hladina zvyšuje až po indukci. CYP1A2 se vyskytuje hlavně v játrech ale i jiných orgánech. Mezi léčiva, která tato skupina metabolizuje, patří např. kofein, theofylin, klozapin, melatonin<sup>9</sup>, duloxetin, imipramin, ondasteron, naproxen, terbinafin a R-warfarin.<sup>4</sup> CYP1A1 metabolizuje hlavně planární aromatické uhlovodíky, CYP1A2 preferuje spíše aromatické aminy a heterocyklické sloučeniny.<sup>10</sup>

### 1.4.2. CYP2C

Tato podrodina obsahuje u člověka významné enzymy: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19, které metabolizují léčiva jako např. diazepam, diklofenak, ibuprofen nebo R-warfarin. CYP2C9 je majoritním enzymem této skupiny a jeho hlavními substráty jsou látky kyselé povahy. Metabolizuje také endogenní substráty např. kys. arachidonovou a steroidy. CYP2C8 a CYP2C9 jsou často spojovány dohromady, protože se od sebe svou strukturou a substrátovou specifitou příliš neliší. CYP2C8 je zodpovědný za metabolismus antidiabetik rosiglitazonu a pioglitazonu, dále metabolizuje některá antiarytmika, antimalaritika a ibuprofen.<sup>2, 4, 10</sup>

### 1.4.3. CYP2D

Zástupcem této podrodiny u člověka je CYP2D6. Patří mezi nejlépe prozkoumané cytochromy P450, má širokou substrátovou specifitu a exprese tohoto enzymu se vyznačuje vůbec nejvýraznějším genetickým polymorfismem.<sup>2, 13</sup> Od genetického polymorfismu jsou odvozeny různé fenotypy oxidativního metabolismu tohoto enzymu, na jejichž základě je možné rozdělit populaci do několika skupin: pomalí metabolizátoři, intermediární metabolizátoři, extenzivní a ultrarychlí metabolizátoři. Nejvíce užívanými markerovými léčivy pro určení fenotypu CYP2D6 jsou spartein, debrisoquin a dextromethorfan. Studie ukazují, že v kavkazské populaci je okolo 7 % defektních CYP2D6 genů a v asijské populaci dokonce okolo jedné poloviny. Fenotypy s defektními alelami mohou být spojovány s Parkinsonovou nemocí avšak mohou ochraňovat před rakovinou močového měchýře. V lidském těle se CYP2D6 nachází hlavně v játrech ale i v plicích, mozku nebo gastrointestinálním traktu.<sup>4</sup> Množství substrátů metabolizovaných CYP2D6 je v porovnání s jeho minoritní expresí v játrech velký a zahrnuje okolo 15-25 % všech terapeuticky používaných léčiv - antiarytmika (př. propafenone), antidepressiva (př. vanlafaxin), antipsychotik a (př. aripiprazol),  $\beta$ - blokátory (př. bufuralol) a cytostatika.<sup>4, 10</sup>

### 1.4.4. CYP2E

U savců je z této podrodiny 2E znám pouze jeden zástupce: 2E1. CYP2E1 je velice inducibilní svými substráty, stejně tak jako endogenními hormony. Důležitou roli hraje při metabolismu ethanolu. U lidí indukce ethanolem způsobuje zvýšenou transkripci v perivenózních hepatocytech. CYP2E1 je také indukován různými patofyziologickými podmínkami jako např. diabetes, obezita, hladovění a onemocnění jater. Předpokládá se, že CYP2E1 hraje roli v onemocněních jater způsobených alkoholem.<sup>10, 14</sup> Z léčiv metabolizuje CYP2E1 chloroxazon či acetaminophen (paracetamol). Dále biotransformuje malé organické molekuly jako např. halogenované uhlovodíky, benzen, styren nebo acetaldehyd.<sup>4</sup>

### 1.4.5. CYP3A

Nejdůležitějším cytochromem P450 v biotransformaci léčiv u člověka je bezpochyby CYP3A4. Účastní se většiny metabolických přeměn těch léčiv, u kterých je známa jejich metabolická cesta. Má širokou substrátovou specifitu, která je zřejmě



dána vysokou flexibilitou aktivního místa. Spektrum léčiv, které metabolizuje CYP3A4, je široké a otevírá tak celou řadu možností pro lékové interakce. Po aplikaci dvou nebo více substrátů CYP3A4 může být vlivem kompetitivní inhibice extrémně zvýšena hladina jednoho z podaných léčiv a může se stát pro organismus toxická. Velice známým příkladem inhibice CYP3A4 je konzumace grapefruitového džusu, kdy látky přítomné v grapefruitu inhibují aktivitu CYP3A4 a je dokumentováno, že už jedna sklenice tohoto nápoje může způsobit navýšení farmakokinetických parametrů nad bezpečnou hranici. Mezi xenobiotika metabolizovaná CYP3A4 patří např. benzodiazepiny, taxol, steroidní hormony a další. CYP3A4 je lokalizován nejen v játrech, ale i dalších tkáních jako jsou ledviny, děloha, plíce, gastrointestinální trakt atd.<sup>4, 5, 10</sup>

## 2. Přírodní polyfenoly

Přírodní polyfenolické sloučeniny patří do skupiny rostlinných sekundárních metabolitů, které jsou obsaženy v ovoci, zelenině, čaji, čokoládě a v mnoha dalších zdrojích. O dietních polyfenolech je známo, že mají pozitivní vliv na mnoho biochemických pochodů a na celkový zdravotní stav organismu. Důležitá je např. jejich úloha při ochraně proti oxidačnímu stresu.<sup>15</sup> Polyfenoly jsou také známé tím, že zpomalují progres kardiovaskulárních, neurodegenerativních a nádorových onemocnění.<sup>18</sup> Do dnešního dne je popsáno více jak 8 000 polyfenolických sloučenin. Všechny polyfenolické látky jsou odvozeny od kyseliny šikimové. Polyfenoly můžeme rozdělit podle odlišných strukturních skupin, počtu fenolových kruhů a atomů, které tyto kruhy spojují.

Obecně lze polyfenolické sloučeniny rozdělit do těchto tříd:<sup>16, 17</sup>

- Fenolové kyseliny - patří mezi ně deriváty kyseliny benzoové a skořicové. Obsah hydroxybenzoových kyselin je v jedlých částech rostlin obecně velmi nízký s výjimkou červeného ovoce, černé ředkve a cibule, které mohou obsahovat až několik desítek mg/kg.<sup>31</sup> Deriváty hydroxyskořicové kyseliny jsou více časté a patří mezi ně hlavně kyselina kávová, ferulová, p-kumarová nebo sinapová. Vyskytují se v borůvkách, kiwi, švestkách, třešních nebo jablkách. Ferulová kyselina je nejhojněji obsažena v cereáliích, hlavně ve vnějších částech zrna.
- Stilbeny - obsahují dvě fenylové části spojené dvouuhlíkatým methylenovým můstkem. Mnohé stilbeny působí jako antifungicidní fytoalexiny, které jsou

syntetizované jako odpověď na infekci a poranění. Významným stilbenem je resveratrol, obsažený hlavně v grepech a červeném víně.

- Lignany - jsou difenolové sloučeniny, které obsahují 2,3- dibenzylbutanovou strukturu zformovanou ze dvou zbytků kys. skořicové. Některé lignany (např. secoisolaricresinol) jsou považovány za fytoestrogeny.
- Flavonoidy (viz níže)

## 2.1. Flavonoidy

Flavonoidy jsou velice početná skupina polyfenolických látek. Stejně jako jejich podskupina anthokyany jsou důležité jako antioxidanty pro prevenci rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění a dalších patologických stavů.<sup>21</sup> Jejich chování závisí na struktuře, stupni hydroxylace a polymerizace, ostatním substitucím a konjugacím. Obsahují ve své struktuře flavan, který se skládá ze dvou benzenových kruhů (A a B) a pyranového kruhu (C). Jednotlivé flavonoidy se od sebe liší substitucí na všech třech kruzích. Substituenty mohou být hydroxylové nebo methoxylové skupiny. Flavonoidy dělíme do několika strukturních tříd.<sup>20</sup>

Příklady nejvýznamnějších zástupců flavonoidů:<sup>19</sup>

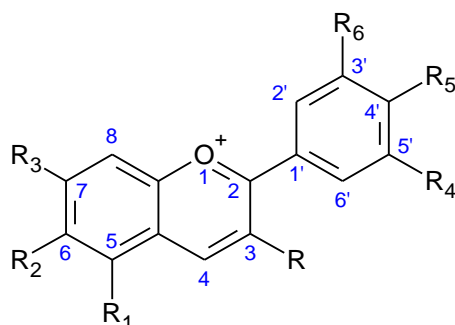
- Flavonoly (cibule, brokolice, čaj, mnohé ovoce)
- Flavony (pažitka, celer, heřmánkový čaj)
- Flavanony (v citrusech)
- Flavanololy (čaj, jablka)
- Isoflavony (sója)
- Anthokyany (viz níže)

Rozdílné modifikace molekuly ovlivňují metabolickou cestu organismem. Funkční hydroxylové skupiny flavonoidů uplatňují svůj antioxidační efekt vychytáváním ROS (nebo chelatací kovových iontů).<sup>19</sup>

## 2.2. Anthokyany

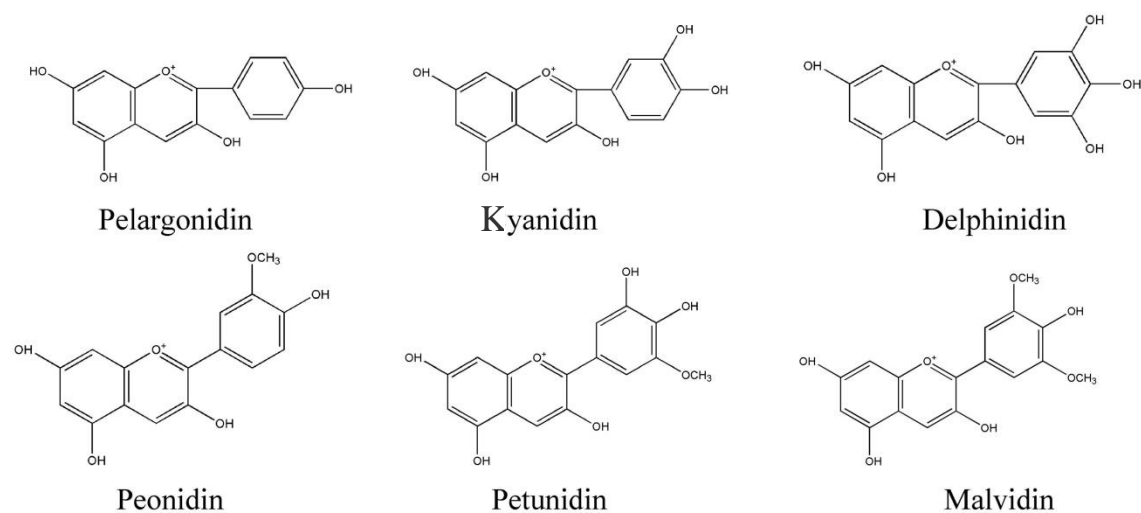
Anthokyany (z řeckého ánthos = květ, kyanos = ocelově modrý) patří spolu s anthoxantiny do skupiny flavonoidů. Tato barviva jsou zodpovědná za zabarvení

rostlinných květů a plodů do červena, fialova a modra. Základní strukturou antokyanů je aglykon nazývaný antokyanidin. (Obr.2)



**Obrázek 2:** Základní struktura anthokyanů

V přírodě se nalézá 17 různých typů antokyanidinů. Nejrozšířenější z nich jsou kyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin, pelargonidin a malvidin (Obr.3). V rostlinách se nejčastěji nacházejí v glykosylované formě. Cukerná složka je často navázána na jejich C<sub>3</sub> hydroxylovou skupinu v uhlíkatém řetězci.



**Obrázek 3:** Struktury nejčastějších anthokyanidinů <sup>24</sup>

Významnou vlastností anthokyanů je jejich kolísavá stabilita. Faktory ovlivňující stabilitu mohou být např.: struktura molekuly, pH prostředí, přítomnost kyslíku nebo teplota či světlo.

Hlavní vliv na stabilitu mají funkční skupiny navázané na aglykon (hydroxylové, methoxylové, acylové skupiny) nebo počet navázaných cukerných zbytků. Sacharidová složka např. zvyšuje stabilitu a rozpustnost antokyanů ve vodě.

Dalším významným faktorem, který ovlivňuje stabilitu anthokyanů je pH. Při pH menším než 5 je intenzita červené barvy zvýšena, ale její barevný odstín je nezměněn a při pH větším než 5 je barva fialová až modrá.

Vzdušný kyslík oxiduje anthokyaniny na nebarevné nebo hnědě zbarvené produkty. Anthokyaniny se degradují i po vystavení UV, VIS nebo ionizujícímu záření, proto se doporučuje jejich skladování v místech nepropustných pro všechna záření.<sup>30</sup>

Anthokyaniny nejsou esenciálními nutrienty, avšak jejich výskyt v potravě (borůvky, aronie, hroznové víno, víno, černý rybíz, ostružiny, jahody a červená a fialová zelenina), působí jako prevence proti kardiovaskulárním nemocem, diabetu, rakovině, oxidačnímu stresu, ateroskleróze a neuroprotektivně.<sup>25</sup> Intenzita účinku anthokyanů je omezena poměrně malým vstřebáváním. Stupeň absorpce anthokyanů v organismu je dán opět jejich strukturou (Obr.3).<sup>30</sup>

### **3. HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie)**

Poprvé byl termín chromatografie použit v roce 1903 ruským biologem Cvetem.<sup>22</sup> Obecně chromatografie patří mezi separační metody, při kterých se dělí složky vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze (nepohyblivá fáze - stacionární, pohyblivá - mobilní fáze). Vzorek se nanese na začátek stacionární fáze, vlivem pohybu mobilní fáze přes fázi stacionární dochází k rozdílnému unášení složek ve vzorku. Tyto jednotlivé složky mohou být stacionární fází zachycovány podle jejich fyzikálně chemických vlastností a tímto principem dochází k separaci.<sup>23</sup> Vzájemné interakce neutrálních molekul vzorku jsou založeny na působení slabých mezimolekulárních sil (např. Van der Waalovy síly, interakce mezi dipóly, elektrostatické interakce). Při průchodu systémem projde každá složka mnohokrát z mobilní fáze do stacionární a zase zpět. Tuto rovnováhu systému popisuje distribuční konstanta  $K_D$ . Časový záznam signálu detektoru, kterým protéká mobilní fáze za kolonou, označujeme jako chromatogram. Jednotlivé zóny složek se během cesty rozšiřují a jejich záznam má pak tvar chromatografických pík.<sup>22</sup>

Typy chromatografických metod můžeme dělit z několika hledisek:

- Podle skupenství mobilní fáze (kapalinová chromatografie, plynová chromatografie)
- Podle uspořádání stacionární fáze (kolonová, plošná, papírová, tenkovrstvá chromatografie)

- Podle povahy děje, který převládá při separaci:
  - Rozdělovací chromatografie
  - Adsorpční chromatografie
  - Iontově - výměnná chromatografie
  - Gelová chromatografie
  - Afinitní chromatografie

HPLC (neboli High Performance Liquid Chromatography) využívá k účinné separaci dostatečně velký počet zrníček sorbentu, která kladou protékající tekutině značný odpor.<sup>23</sup> Jako mobilní fáze se používá čisté rozpouštědlo nebo směs mísitelných kapalin, často se používá směs polárnějšího a méně polárního rozpouštědla, př. methanol a destilovaná voda. Pro získání optimálního rozlišení je v závislosti na analytu často potřeba gradientové složení mobilní fáze, kdy se v čase mění poměr mezi více a méně polárním rozpouštědlem.<sup>22</sup>

Soustava HPLC začíná čerpadly na mobilní fázi. Kapalina se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Čerpadla dosahují průtoku v rozsahu od mikrolitrů do desítek mililitrů při tlaku až 35 MPa. Materiál čerpadla bývá z nerezové oceli, keramiky či plastu, nesmí být poškozován mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky. Ventily bývají často zhotoveny z pryže nebo safíru. Jsou používána dvojčinná čerpadla, v sérii zapojená čerpadla a čerpadla využívající dvou či více pístů, která na rozdíl od jednočinného pístového čerpadla s kmitavým pohybem nezpůsobují rušivé tlakové rázy.

Dále postupuje mobilní fáze do směšovacího zařízení, které s využitím různých zásobníků může připravovat směs kapalin stálého složení (izokratická eluce) nebo řídit změny ve složení výsledné mobilní fáze (gradientová eluce) v průběhu separace.

Analyzovaný vzorek na kolonu aplikuje dávkovací zařízení. Dnes již překonané dávkování injekční stříkačkou přinášelo nevýhody z hlediska těsnosti, udržení tlaku či kontaminace z materiálu v injekční stříkačce. V současné době bývají injekční systémy nahrazeny automatickým dávkovacím zařízením.

Pro většinu analýz se používají kolony z nerezové oceli naplněné příslušným sorbentem o definovaném průměru a velikosti pórů. Na částicích je pak navázána funkční skupina, udávající charakter stacionární fáze. Jinou alternativou jsou monolitické kolony.

Jako ochrana hlavní kolony jsou využívány speciální filtry a předkolony, které se umísťují před kolonu. Způsobují jen malé rozšíření pásů a chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály.

Na konci systému je umístěn detektor. Jako základ detektoru se používá průtočná cela o minimálním objemu a měřicí systém, jehož signál závisí na složení protékajícího eluentu. Nejčastějšími detektory jsou spektrofotometrický, fluorimetrický, amperometrický nebo konduktometrický. Další možností identifikace látek je použití specifických detektorů, jakými jsou např. NMR nebo MS detektor. <sup>22, 23</sup>

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 6. METODIKA

#### 6.1. Materiál

##### 6.1.1. Potkaní mikrosomální frakce

Potkaní mikrosomy se připravily frakční centrifugací na Ústavu lékařské chemie a biochemie, LF UP. Jednotlivé mikrosomální frakce získané z experimentálních zvířat se liší dietou (pšenicí), která jim byla v průběhu experimentu podávána. Použité pšenice:

**Bohemia** - běžná pšenice, kontrolní a isogenní k UC66049 a Scorpion

**UC66049** - jarní pšenice, barva zrna modrá

**Skorpion** - barva zrna modrá, aleuron

**Novosibirskaja** - běžná pšenice, kontrolní a isogenní k ANK-28A, ANK-28B a Aoi-Yu, barva zrna bílá

**ANK-28A** - isogenní pšenice s geny kódující pouze anthokyany, červená barva zrna

**ANK-28B** - isogenní pšenice s geny kódující pouze anthokyany, červená barva zrna

**Aoi-Yu** - pšenice obohacená o geny kódující modré anthokyany, barva zrna modrá

#### **Celková koncentrace proteinů a koncentrace CYP v jednotlivých použitých mikrosomálních frakcích :**

Potkaní krmení pšenicí Bohemia:  $c_{cyp450}=31,315 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $c_{prot}= 33,83 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Potkaní krmení pšenicí UC66049:  $c_{cyp450}= 30,505 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $c_{prot}= 32,98 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Potkaní krmení pšenicí Skorpion:  $c_{cyp450}= 36,155 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $c_{prot}= 39,65 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Potkani krmení pšenicí Novosibirskaja:  $c_{\text{cyp450}}=24,285 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $c_{\text{prot}}=26,24 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Potkani krmení pšenicí ANK-28A:  $c_{\text{cyp450}}=21,87 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $c_{\text{prot}}=26,15 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Potkani krmení pšenicí ANK-28B:  $c_{\text{cyp450}}=2,64 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $c_{\text{prot}}=29,62 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Potkani krmení pšenicí Aoi-Yu:  $c_{\text{cyp450}}=25,935 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $c_{\text{prot}}=39,93 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Potkani byly používány v souladu s pokyny pro péči a používání laboratorních zvířat (Ochrana zvířat proti zneužití, zákon č. 246/92, CZ).

### 6.1.2. Chemikálie

Chemikálie byly p.a. čistoty a vhodné pro experimenty s biologickým materiálem a pro enzymatická stanovení. Chemikálie dodaly:

**Sigma Aldrich (Praha, CZ):** isocitrátdehydrogenasa (IDH), kyselina DL-isocitronová (ISO),  $\beta$ -nikotinamidadenindinukleotid (NADP<sup>\*</sup>), Trizma base (TRIS), warfarin, fenacetin, kumarin, diklofenak, diazepam, bufuralol, chlorzoxazon, testosteron, 7'-hydroxywarfarin, 7'-hydroxykumarin, desmethyldiazepam, temazepam, 6'-hydroxychlorzoxazon, testovací souprava pro stanovení proteinů pomocí BCA

**Lach-Ner (Neratovice, CZ):** dihydrogenfosforečnan draselný, dichlormethan, dimethylsulfoxid, chlorid draselný, kyselina ethylendiaminetraoctová dihydrát, kyselina chloristá, kyselina octová, sacharóza, síran hořečnatý heptahydrát

**Merck (Praha, CZ):** acetonitril, methanol

**Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA):** 4'-hydroxydiklofenak, 6 $\beta$ -hydroxytestosteron

**BD Genstest (Woburn, MA, USA):** 1'-hydroxybufuralol

**Linde Technoplyn (Praha, CZ):** dusík, oxid uhelnatý

### 6.1.3. Přístrojové vybavení

Analytické váhy GR (Schoeller Instruments, Praha, CZ)

HPLC, Řídící jednotka (Shimadzu systém controller SCL-10AVP, Shimadzu, Kyoto, Japonsko), kolona LichroCART 250-4, s náplní LiChrosper 100 RP-18, velikost částic 5  $\mu\text{m}$  (Merck, Praha, CZ), vyhřívání kolony (Shimadzu column oven CTO - 10AC, Japonsko), UV/VIS detektor (Shimadzu, UV-VIS detector SPD - 10A, Japonsko), fluorimetrický detektor (Shimadzu diode array detector SPD - 10A, Japonsko), autosampler se smyčkou 50  $\mu\text{l}$  (Shimadzu autoinjektor SIL - 10ADVP, Japonsko),

odplyňovač mobilní fáze (Shimadzu degasser DGU - 20A5, Japonsko), pumpa (Shimadzu liquid chromatograph LC - 10AT, Japonsko)

Chlazená centrifuga Mikro 22R, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Německo)

Chlazená centrifuga Rotina 38R, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Německo)

Membránové filtry *Pall Corporation, hydrophilic polypropylene membrane filters 100 IPK*

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

Spektrofotometr UV - 2401PC, Shimadzu (Kyoto, Japonsko)

Termomixer Comfort, Eppendorf (Hamburg, Německo)

Třepačka typu „vortex“ reax top, Heidolph Instruments (Schwabach, Německo)

Ultrazvuková lázeň UCC4, Notus-Powersonic (Vráble, Slovensko)

UV-VIS spektrofotometr TECAN Infinite M200, Schoeller Instruments (Praha, CZ)

Ultracentrifuga Beckman Optima™ LE - 80K, Beckman (Ramsey, MN, USA)

## **6.2. Metody**

### **6.2.1. Příprava mikrosomální frakce z jater potkana**

Mikrosomální frakci z jater potkana se získá frakční centrifugací jaterního homogenátu. Práce s játry je celou dobu prováděna na ledu a v chladicím boxu. Všechny potřebné nástroje, včetně přístrojů musí být předem vychlazeny.

Játra se zváží a nastříhají nůžkami v homogenizačním pufru (HP, 0,25 mol·l<sup>-1</sup> sacharosa, 1 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA, pH 7,4) s přídavkem 0,2 mol·l<sup>-1</sup> PMSF v isopropanolu (inhibitor proteáz). Játra se slíjí přes gázu a ještě dvakrát promyjí HP. Po posledním promytí se k játrům přidá trojnásobné množství HP a homogenizují se ponorným dispergačním homogenizátorem třikrát max. 10 s. Tento homogenát se nalije do 50 ml plastových zkumavek, po okraj doplní HP, vyváží a nechá centrifugovat při 4 000 x g 10 minut při 4 °C v centrifuze Rotina 38R. Vzniklý supernatant se opět nalije do 50 ml zkumavek, opět vyváží a tentokrát centrifuguje při 11 400 x g 25 minut 4 °C na centrifuze Rotina 38R. Takto získaný supernatant se nalije do ultracentrifugačních zkumavek (Beckman Coulter® Brea, Kanada), po okraj se doplní HP, důkladně zkontroluje, zda nejsou přítomny bublinky vzduchu a dá se do centrifugy na otáčky 126 000 x g na 1 hodinu při 4 °C. Po ultracentrifugaci se odstraní supernatant a sediment se resuspenduje v promývacím pufru (50 mmol·l<sup>-1</sup> TRIS, 0,15 mol·l<sup>-1</sup> KCl,



0,2 mmol·l<sup>-1</sup> PMSF) v objemu odpovídajícímu objemu ultracentrifugačních zkušev. Vzniklá směs se homogenizuje v homogenizátoru podle Pottera a Elvehjema s teflonovým pístem. Následuje další ultracentrifugace při 126 000 x g 1 hodinu při 4 °C. K získanému sedimentu se přilije rehomogenizační pufr (20 mmol·l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA, 20% glycerol, pH 7,4) tak, aby byl celkový objem 0,2 násobkem váhy jater. Takto připravené mikrosomy se přepipetují do 1,5 ml plastových zkušev a ihned zamrazí na - 80 °C.

### 6.2.2. Stanovení koncentrace CYP v mikrosomální frakci

Koncentrace CYP v mikrosomální frakci se určuje spektrofotometrickým stanovením po redukci dithioničitanem sodným a po navázání oxidu uhelnatého.

Získaná potkaní mikrosomální frakce se 20x naředí fosfátovým pufr (100 mmol·l<sup>-1</sup>, pH 7,4) a CYP se zredukuje přidáním dithioničitanu sodného. Tato suspenze se rozdělí do dvou kyvet a ty se pak vloží do dvoupaprskového spektrofotometru a změní se baseline mezi 500 až 400 nm. Vzorková kyveta se probublává slabým proudem CO po dobu 1 minuty. Po vytvoření komplexu s CO se opět provede spektrofotometrické měření. Díky naměřené absorbanci se vypočítá celková koncentrace CYP v mikrosomální frakci podle vzorce:

$$C_{P450} = \frac{A_{450} - A_{490}}{0,091} * 20 \text{ (ředění)}$$

A<sub>450</sub>... absorbance při 450 nm

A<sub>490</sub> ...absorbance při 490 nm

C<sub>P450</sub>...koncentrace cytochromů P450

0,091 ...hodnota molárního absorpčního koeficientu pro CYP [l · mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>]

### 6.2.3. Stanovení celkové koncentrace proteinu

K stanovení celkové koncentrace proteinu v mikrosomální frakci se používá kit firmy Pierce (Rockford, USA) s využitím soli bicinchoninové kyseliny (BCA). Princip metody spočívá v alkalické redukci Cu<sup>2+</sup> na Cu<sup>1+</sup> proteinem a chelatací Cu<sup>1+</sup> BCA za vzniku fialového produktu.

Vzorek se naředí fosfátovým pufr (100 mmol·l<sup>-1</sup>, pH 7) 50x. Následně se přidá činidlo A (BCA a vlnan sodný v alkalickém roztoku uhličitanu a hydrogenuhličitanu sodného) a B (4% roztok pentahydrátu síranu měďného) v poměru

50:1. Vzorok se inkubují 30 minut při 37 °C a následně se ochladí na laboratorní teplotu. Absorbance se měří při 562 nm a celková koncentrace proteinů ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) se následně stanoví z kalibrační křivky závislosti absorbance na koncentraci BSA.

#### **6.2.4. Kalibrační křivky pro stanovení metabolitů CYP pomocí HPLC**

Pro kvantitativní stanovení metabolitů vzniklých při enzymových reakcích se používá metoda kalibrační křivky. Konkrétně závislost plochy píků na koncentraci produktu reakce. Při vytvoření kalibrační křivky se dodrží stejné reakční podmínky jako při stanovení aktivit CYP. Pro stanovení aktivit jednotlivých CYP s použitím různých substrátů (kap. 6.2.5.) musí být použita příslušná kalibrační křivka. Jednotlivé body kalibrační křivky se měří v tripletech a jejich hodnota je průměrem tří výsledků. V této bakalářské práci se měřily kalibrační křivky pouze u metod využívající jako substrát diklofenak a chlorzoxazon. Kalibrace ostatních metod se získaly od kolegů na pracovišti.

**6.2.4.1. Kalibrace metody pro stanovení 4'-hydroxydiklofenaku, metabolitu diklofenaku, s využitím HPLC**

**Tab.1:** Podmínky pro přípravu vzorků kalibrace 4'-hydroxydiklofenaku v jaterních mikrozomech

CYP2C11(CYP2C6)	
<b>Objem reakční směsi:</b>	100 µl
<b>Pufr:</b>	100 mM fosfátový pufr, pH 7,4
<b>Mikrosomální frakce:</b>	35 pmol
<b>Metabolit:</b>	0,4 mM 4'-hydroxydiklofenak
<b>NADPH generující systém:</b>	0,5 mM NADP, 4 mM ISO, 5 mM MgSO <sub>4</sub> a 0,2 U/ml IDH
<b>Inkubace:</b>	15 minut, 37°C, 250 rpm
<b>Stop systém:</b>	Acetonitril a kys. octová, 94:6
<b>Mobilní fáze:</b>	A: 30% acetonitril a 2mM HClO <sub>4</sub> v poměru 30:7 B: 100% methanol
Připraví se koncentrace 4'-hydroxydiklofenaku 0,9; 0,6; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05 nmol v 250 µl reakční směsi, do reakční směsi se pipetuje první stop systém, místo substrátu se přidávají jednotlivé koncentrace metabolitu, po centrifugaci 10 minut při 24 100 x g, 4 °C se odpipetuje 200 µl supernatantu do vialek, analýza HPLC, nástřik 50 µl, průtok MF 1ml/min, detekce UV při 280 nm.	

#### 6.2.4.2. Kalibrace metody pro stanovení 6'-hydroxychlorzoxazonu, metabolitu chlorzoxazonu, s využitím HPLC

**Tab.2:** Podmínky pro přípravu vzorků kalibrace 6'-hydroxychlorzoxazon v jaterních mikrozomech

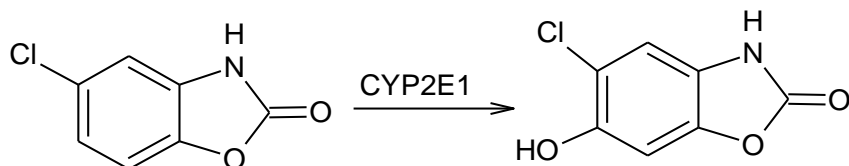
CYP2E	
<b>Objem reakční směsi:</b>	1000 µl
<b>Pufr:</b>	100 mM fosfátový pufr, pH 7,4
<b>Mikrosomální frakce:</b>	160 pmol
<b>Substrát:</b>	2,5 mM chlorzoxazon
<b>NADPH generující systém:</b>	0,5 mM NADP, 4 mM ISO, 5 mM MgSO <sub>4</sub> a 0,2 U/ml IDH
<b>Inkubace:</b>	20 minut, 37 °C, 250 rpm
<b>Stop systém:</b>	42,5% kys. fosforečná
<b>Mobilní fáze:</b>	0,5 % kys. octová a acetonitril, 3:1
Připraví se koncentrace 6'-hydroxychlorzoxazonu 0,2; 0,8; 1,6; 2,0; 04,0 nmol v 1 000 µl reakční směsi, do reakční směsi se pipetuje první stop systém, místo substrátu se přidávají jednotlivé koncentrace metabolitu. Extrakce do 2 ml isopropanolu/chloroformu (18:85), vířivá extrakce 20 s na vortexu, centrifugace při 717 x g, 1 ml spodní organické vrstvy se odpipetuje, vysuší dusíkem, odparek se rozpustí v 200 µl MF, 150 µl rozpuštěného odparu se odpipetuje do vialek, HPLC, nástřík 50 µl, průtok MF 1ml/min, detekce UV při 287 nm.	

#### 6.2.5. Stanovení aktivit CYP

Aktivita CYP se stanoví pomocí specifických substrátů, které CYP metabolizují, podle níže uvedených metod s detekcí HPLC. Vliv anthokyanů obsažených ve pšenících na metabolismus byl studován u CYP2E1, CYP1A, CYP2D, CYP3A, CYP2C a CYP2B. Porovnáním plochy píku v HPLC analýze kontrolní skupiny (100% aktivita) s ostatními skupinami se získá změna aktivity v procentech. U všech stanovení HPLC je použita UV nebo fluorescenční detekce.

**Tab.3:** Substráty vhodné k měření aktivity CYP

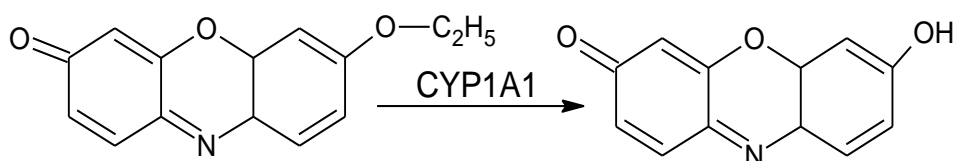
CYP	Substrát	Metabolit	Typ reakce
CYP2E1	Chloroxazon	6'-hydroxychloroxazon	6'-hydroxylacechloroxazonu
CYP1A	Ethoxyresorufin	Resorufin	O - deethylace ethoxyresorufinu
	Fenacetin	Paracetamol	O - deethylace fenacetinu
CYP2D	Bufuralol	1'-hydroxybufuralol	1'-hydroxylace bufuralolu
CYP3A	Testosteron	6β'-hydroxytestosteron	6β'-hydroxylace testosteronu
CYP 2C	Diklofenak	4'-hydroxydiklofenak	4'-hydroxylace diklofenaku
	Warfarin	7'hydroxywarfarin	7'hydroxylace warfarinu
	Diazepam	Temazepam, Desmethyldiazepam	N - methylace diazepamu Demethylace diazepamu
CYP2B	EFC	7 - HFC	7'-hydroxylace EFC

**6.2.5.1. Stanovení aktivity CYP2E1 pomocí chloroxazonu****Obrázek 4:** Hydroxylace chloroxazonu za účasti CYP2E1**Tab.4:** Reakční podmínky pro stanovení aktivity CYP2E1

CYP2E	
<b>Objem reakční směsi:</b>	1000 µl
<b>Pufr:</b>	100 mM fosfátový pufr, pH 7,4
<b>Mikrosomální frakce:</b>	160 pmol
<b>Substrát:</b>	2,5mM chloroxazon
<b>NADPH generující systém:</b>	0,5 mM NADP, 4 mM ISO, 5 mM MgSO <sub>4</sub> a 0,2 U/ml IDH
<b>Inkubace:</b>	20 minut, 37 °C, 250 rpm
<b>Stop systém:</b>	42,5% kys. fosforečná
<b>Mobilní fáze:</b>	0,5 % kys. octová a acetonitril, 3:1
Extrakce do 2 ml isopropanolu/chloroformu (18:85), vířivá extrakce 20 s na vortexu, centrifugace při 717 x g, 1 ml spodní organické vrstvy se odpipetuje, vysuší dusíkem, odparek se rozpustí v 200 µl MF, 150 µl rozpuštěného odparku se odpipetuje do vialek, HPLC, nástřik 50 µl, průtok MF 1ml/min, detekce UV při 287 nm.	

### 6.2.6.2. Stanovení aktivity CYP1A

- *Stanovení aktivity CYP1A1 pomocí ethoxyresorufinu*

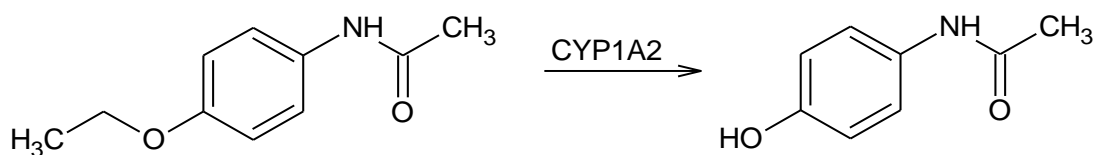


**Obrázek 5:** O-deetylace ethoxyresorufinu za účasti CYP1A1

**Tab.5:** Reakční podmínky pro stanovení aktivity CYP1A1

CYP1A	
<b>Objem reakční směsi:</b>	100 $\mu$ l
<b>Pufr:</b>	100 mM fosfátový pufr, pH 7,4
<b>Mikrosomální frakce:</b>	35 pmol
<b>Substrát:</b>	10 $\mu$ M ethoxyresorufin
<b>NADPH generující systém:</b>	0,5 mM NADP, 4 mM ISO, 10 mM MgSO <sub>4</sub> a 0,2 U/ml IDH
<b>Inkubace:</b>	25 minut, 37 °C, 250 rpm
<b>Stop systém:</b>	100% methanol
<b>Mobilní fáze:</b>	25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> a 100% methanol v poměru 58:42
Sraženina vzorku se centrifuguje při 24 100 x g, 10 minut při 4 °C, 200 $\mu$ l supernatantu se odpipetuje do vialek, analýza HPLC, nástřík 10 $\mu$ l, průtok MF 1ml/min, fluorescenční detekce 535/585 (excitační vlnová délka, emisní vlnová délka).	

- **Stanovení aktivity CYP1A2 pomocí fenacetinu**

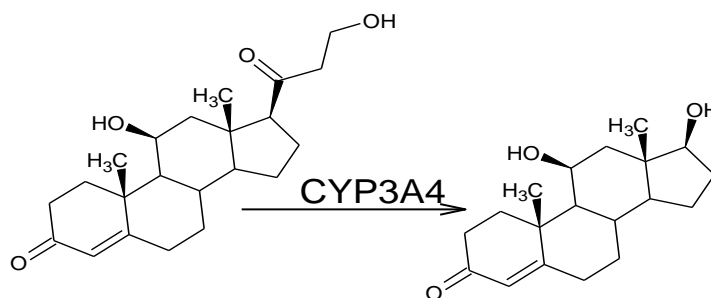


**Obrázek 6:** O - deethylace phenacetinu za účasti CYP1A2

**Tab.6:** Reakční podmínky pro stanovení aktivity CYP1A2

CYP1A	
<b>Objem reakční směsi:</b>	200 µl
<b>Pufr:</b>	100 mM fosfátový pufr, pH 7,4
<b>Mikrosomální frakce:</b>	70 pmol
<b>Substrát:</b>	1,67 mM fenacetinu
<b>NADPH generující systém:</b>	0,5 mM NADP, 4 mM ISO, 10 mM MgSO <sub>4</sub> a 0,2 U/ml IDH
<b>Inkubace:</b>	20 minut, 37 °C, 250 rpm
<b>Stop systém:</b>	70% HClO <sub>4</sub>
<b>Mobilní fáze:</b>	A: 20% methanol, pH 2,9 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )+ 80% H <sub>2</sub> O B: 100 % methanol
Sraženina vzorku se centrifuguje při 24 100 x g, 10 minut při 4 °C, 200 µl supernatantu se odpipetuje do vialek, analýza HPLC, nástřik 50 µl, průtok MF 1ml/min, detekce UV při 258 nm.	

### 6.2.6.3. Stanovení aktivity CYP3A pomocí testosteronu



Obrázek 7: 6β - hydroxylace testosteronu za účasti CYP3A4

Tab.7: Reakční podmínky pro stanovení aktivity CYP3A4

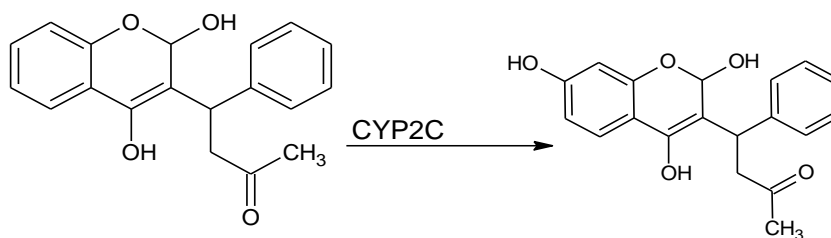
CYP3A	
<b>Objem reakční směsi:</b>	500 μl
<b>Pufr:</b>	100 mM fosfátový pufr, pH 7,4
<b>Mikrosomální frakce:</b>	100 pmol
<b>Substrát:</b>	500 μM testosteron
<b>NADPH generující systém:</b>	0,5 mM NADP, 4 mM ISO, 5 mM MgSO <sub>4</sub> a 0,2 U/ml IDH
<b>Inkubace:</b>	20 minut, 37 °C, 250 rpm
<b>Stop systém:</b>	1M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 2M NaCl
<b>Mobilní fáze:</b>	64 % methanol

Vzorek se extrahuje do 2 ml dichlormethanu, vířivá extrakce 20 s na vortexu, centrifugace při 1 609 x g, 1 ml spodní vrstvy se přepipetuje do čistých zkumavek, vysuší se dusíkem, odparek se rozpustí v 200 μl MF, 150 μl rozpuštěného odparku se odpipetuje do vialek, analýza HPLC, nástřík 50 μl, průtok MF 1ml/min, detekce UV při 245 nm.



#### 6.2.6.4. Stanovení aktivity CYP2C

- Stanovení aktivity CYP2C pomocí warfarinu

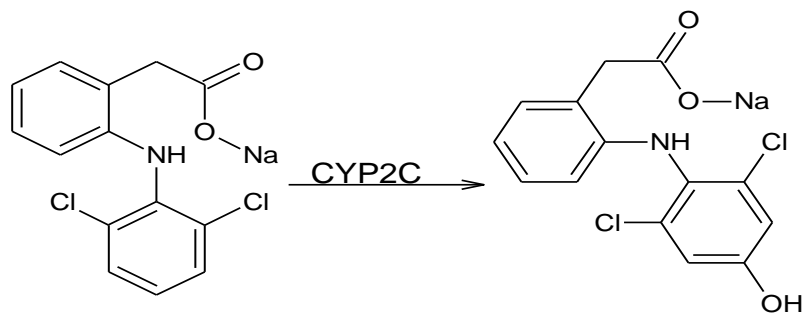


Obrázek 8: Hydroxylace warfarinu za účasti CYP2C

Tab.8: Reakční podmínky pro stanovení aktivity CYP2C

CYP2C	
<b>Objem reakční směsi:</b>	250 $\mu$ l
<b>Pufr:</b>	100 mM fosfátový pufr, pH 7,4
<b>Mikrosomální frakce:</b>	250 pmol
<b>Substrát:</b>	2 mM warfarinu
<b>NADPH generující systém:</b>	0,5 mM NADP, 4 mM ISO, 5 mM MgSO <sub>4</sub> a 0,2 U/ml IDH
<b>Inkubace:</b>	20 minut, 37 °C, 250 rpm
<b>Stop systém:</b>	70 % HClO <sub>4</sub>
<b>Mobilní fáze:</b>	K/PO <sub>4</sub> , pH 3 (52 %) : methanol (32 %) : acetonitril (16 %)
Sraženina vzorku se centrifugace 10 minut při 24 100 x g, 4 °C, 200 $\mu$ l supernatantu se odpipetuje do vialek, analýza HPLC, nástřík 50 $\mu$ l, průtok MF 1ml/min, fluorescenční detekce 320/410 (excitační vlnová délka, emisní vlnová délka).	

- **Stanovení aktivity CYP2C11 (CYP2C6) pomocí diklofenaku**

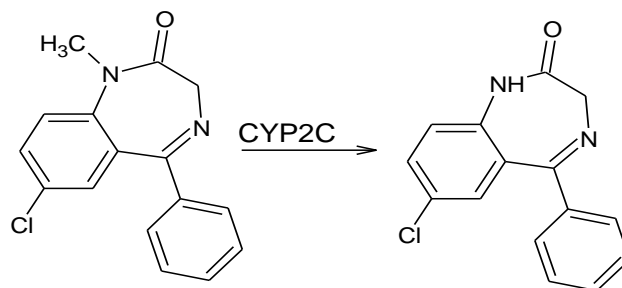


**Obrázek 9:** Hydroxylace diklofenaku za účasti CYP2C

**Tab.9:** Reakční podmínky pro stanovení aktivity CYP2C pomocí diklofenaku

CYP2C	
<b>Objem reakční směsi:</b>	100 µl
<b>Pufr:</b>	100 mM fosfátový pufr, pH 7,4
<b>Mikrosomální frakce:</b>	35 pmol
<b>Substrát:</b>	0,4 mM diklofenaku
<b>NADPH generující systém:</b>	0,5 mM NADP, 4 mM ISO, 5 mM MgSO <sub>4</sub> a 0,2 U/ml IDH
<b>Inkubace:</b>	15 minut, 37 °C, 250 rpm
<b>Stop systém:</b>	Acetonitril a kys. octová, 94:6
<b>Mobilní fáze:</b>	30% acetonitril a 2mM HClO <sub>4</sub> v poměru 30:7
Vzorek se centrifuguje 10 minut při 24 100 x g, 4 °C, 200 µl supernatantu se odpipetuje do vialek, analýza HPLC, nástřik 50 µl, průtok MF 1ml/min, detekce UV při 280 nm.	

- *Stanovení aktivity CYP2C pomocí diazepamu*

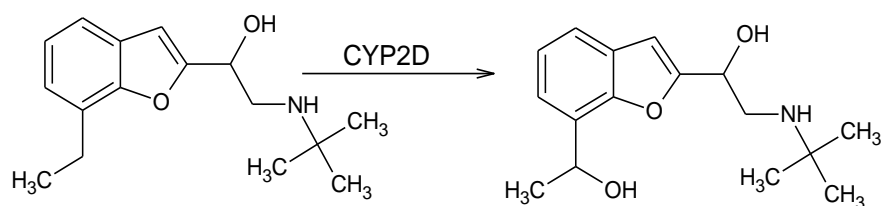


**Obrázek 10:** N - demethylace diazepamu za účasti CYP2C

**Tab.10:** Reakční podmínky pro stanovení aktivity CYP2C

CYP2C	
<b>Objem reakční směsi:</b>	200 $\mu$ l
<b>Pufr:</b>	100 mM fosfátový pufr, pH 7,4
<b>Mikrosomální frakce:</b>	70 pmol
<b>Substrát:</b>	400 $\mu$ M diazepam
<b>NADPH generující systém:</b>	0,5 mM NADP, 4 mM ISO, 5 mM MgSO <sub>4</sub> a 0,2 U/ml IDH
<b>Inkubace:</b>	15 minut, 37 °C, 250 rpm
<b>Stop systém:</b>	Acetonitril
<b>Mobilní fáze:</b>	50 mM K/PO <sub>4</sub> pH 2,4 a acetonitril v poměru 55:45
Sraženina se centrifuguje 10 minut při 24 100 x g, 4 °C, 200 $\mu$ l supernatantu se odpipetuje do vialek, analýza HPLC, nástřik 5 $\mu$ l, průtok MF 1ml/min, detekce UV při 236 nm.	

### 6.2.6.5. Stanovení aktivity CYP 2D pomocí bufuralolu

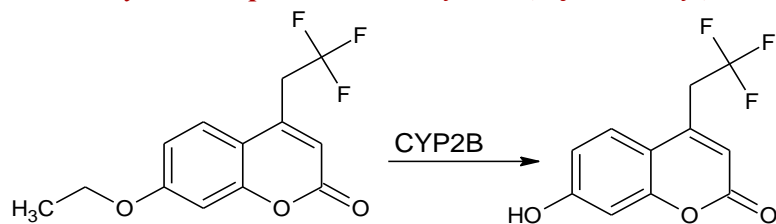


**Obrázek 11:** Hydroxylace bufuralolu za účasti CYP2D

**Tab.11:** Reakční podmínky pro stanovení aktivity CYP2D

CYP2D	
<b>Objem reakční směsi:</b>	200 $\mu$ l
<b>Pufr:</b>	100 mM fosfátový pufr, pH 7,4
<b>Mikrosomální frakce:</b>	67,3 pmol
<b>Substrát:</b>	1 mM bufuralolu
<b>NADPH generující systém:</b>	0,5 mM NADP, 4 mM ISO, 5 mM MgSO <sub>4</sub> a 0,2 U/ml IDH
<b>Inkubace:</b>	20 minut, 37 °C, 250 rpm
<b>Stop systém:</b>	70 % HClO <sub>4</sub>
<b>Mobilní fáze:</b>	30 % acetonitril a 70 % 2 mM HClO <sub>4</sub>
Centrifugace vysráženého vzorku 10 minut při 24 100 x g, 4 °C, 200 $\mu$ l supernatantu se odpipetuje do vialek, analýza HPLC, nástřik 50 $\mu$ l, průtok MF 1ml/min, fluorescenční detekce 252/302 (excitační vlnová délka/emisní vlnová délka)	

**6.2.6.6. Stanovení aktivity CYP 2B pomocí 7-ethoxy – 4 - (trifluorometyl)kumarin (EFC)**



**Obrázek 12:** O - deethylace EFC za účasti CYP2B1

**Tab.12:** Reakční podmínky pro stanovení aktivity CYP2B1

CYP2B	
<b>Objem reakční směsi:</b>	100 $\mu$ l
<b>Pufr:</b>	100 mM fosfátový pufr, pH 7,4
<b>Mikrosomální frakce:</b>	35 pmol
<b>Substrát:</b>	60 $\mu$ M EFC
<b>NADPH generující systém:</b>	0,5 mM NADP, 4 mM ISO, 10 mM MgSO <sub>4</sub> a 0,2 U/ml IDH
<b>Inkubace:</b>	15 minut, 37 °C, 250 rpm
<b>Stop systém:</b>	100% methanol
<b>Mobilní fáze:</b>	46% (20 mM Na/PO <sub>4</sub> pH 7,5) : 54% (100% methanol)
Centrifugace vysráženého vzorku 10 minut při 24 100 x g, 4 °C, 200 $\mu$ l supernatantu se odpipetuje do vialek, analýza HPLC, nástřik 15 $\mu$ l, průtok MF 1ml/min, fluorescenční detekce 410/510 (excitační vlnová délka, emisní vlnová délka).	

## 7. VÝSLEDKY

### 7.1. Charakterizace mikrosomální frakce potkaního jaterního homogenátu

Centrifugací získaná jaterní mikrosomální frakce jednotlivých skupin potkanů je charakterizována stanovením koncentrace CYP, která se naměřila spektrofotometricky a vypočítala se pomocí Lambert-Beerova zákona, koncentrací celkového proteinu a specifickým obsahem CYP vyjádřeným jako poměr koncentrace CYP a koncentrace proteinu. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č.13.

**Tab.13:** Charakterizace jaterních mikrosomálních frakcí získaných z experimentálních zvířat krměných dietami s obsahem jednotlivých testovaných pšenic

Potkani krmění pšenicemi:	Koncentrace CYP ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Koncentrace proteinů ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Specifický poměr CYP a celkového proteinu
Skupina Bohemia	31,31	33,83	0,925
Skupina UC66049	30,50	32,98	0,925
Skupina Skorpion	36,15	38,65	0,935
Skupina Novosibirskaja	24,28	26,24	0,683
Skupina ANK-28A	21,87	26,15	0,730
Skupina ANK-28B	22,64	29,62	0,874
Skupina Aoi-Yu	25,935	39,93	0,659

### 7.2. Kalibrace použitých analytických metod

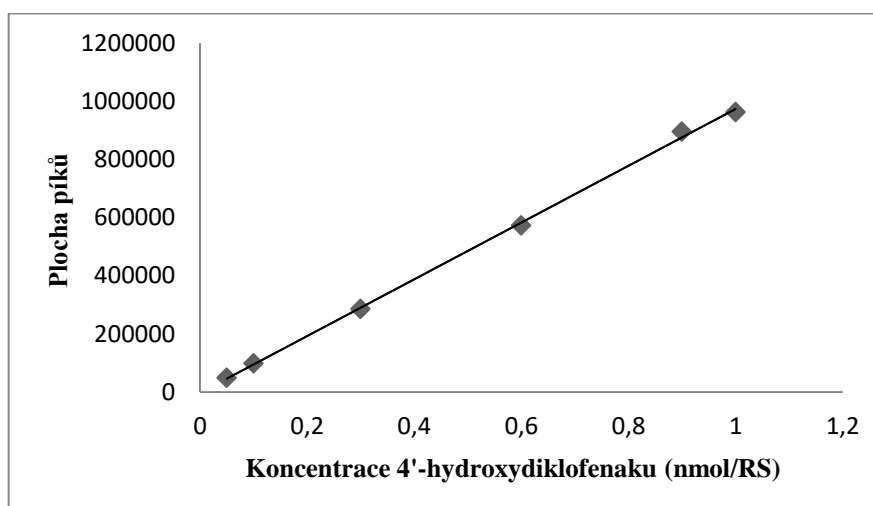
#### 7.2.1. Kalibrace metody pro stanovení 4'-hydroxydiklofenaku, metabolitu diklofenaku, s využitím HPLC

Podmínky pro optimalizaci a kalibraci metody pro stanovení aktivity CYP2C9 pomocí diklofenaku byly zvoleny na základě předchozích experimentů tak, jak je

uvedeno v popisu metod. Kalibrační závislosti plochy píků na nanomolech 4'-hydroxydiklofenaku při UV detekci jsou průměrem tří měřených vzorků následujících koncentrací 0,1; 0,3; 0,6; 0,9; 1,0; 1,2 nmol v 250 µl reakční směsi. Výsledky kalibrační závislosti jsou uvedeny na Obr. 13.

Rovnice regrese:  $y = 1,06334 \cdot 10^5 x - 0,0269243$

$R^2: 0,99952$



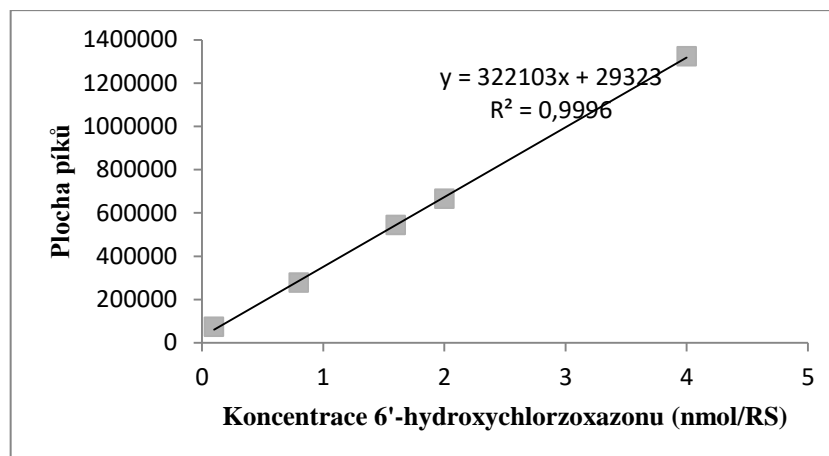
**Obrázek 13:** Kalibrační závislost pro HPLC stanovení 4'-hydroxydiklofenaku. Na ose x jsou koncentrace metabolitu 4'-hydroxydiklofenaku (0,1 0,3 0,6 0,9 1,0 1,2 nmol v 250 µl reakční směsi) a na ose y naměřená plocha píků.

### 7.2.2. Kalibrace metody pro stanovení 6'-hydroxychlorzoxazonu, metabolitu chlorzoxazonu s využitím HPLC

Podmínky pro optimalizaci a kalibraci metody pro stanovení aktivity CYP2E1 pomocí chlorzoxazonu se vybraly podle výsledků předchozích experimentů tak, jak je uvedeno v popisu metod. Kalibrační závislosti metabolitu 6'-hydroxychlorzoxazonu při UV detekci jsou průměrem tří měřených vzorků od každé koncentrace 0,2; 0,8; 1,6; 2,0; 4,0 nmol v 1 ml reakční směsi. (Obr. 14)

Rovnice regrese:  $322103x + 29323$

$R^2: 0,9999$



**Obrázek 14:** Kalibrační závislost pro HPLC stanovení 6'-hydroxychlorzoxazonu. Na ose x jsou koncentrace metabolitu 6'-hydroxychlorzoxazonu (0,2; 0,8; 1,6; 2,0; 4,0 nmol v 1 ml reakční směsi) a na ose y naměřená plocha píků.

### 7.3. Stanovení aktivit CYP

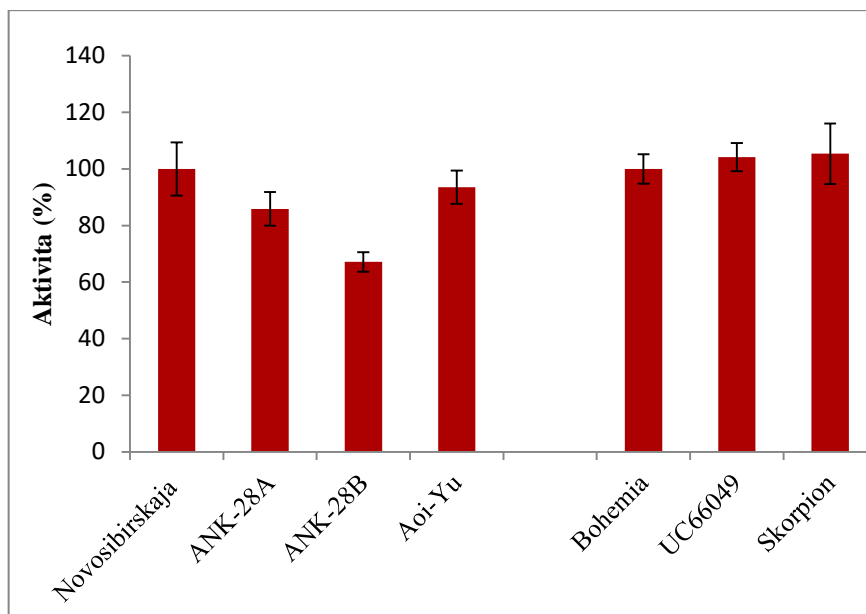
U jednotlivých jaterních mikrosomálních frakcí získaných z experimentálních zvířat konzumujících dietu se zvýšeným obsahem barevných pšenic a také z kontrolních zvířat se změřily aktivity vybraných cytochromů P450. Pro měření byly vybrány ty enzymy, které mají význam pro metabolismus cizorodých látek. Výsledky všech naměřených aktivit cytochromů P450 jsou na Obr. 15-27. Výsledky jsou vyjádřeny tak, že aktivita enzymů u experimentálních skupin je vztahována k aktivitě kontrolní skupiny, která neměla dietu obohacenou o anthokyany a je brána jako 100 %. Výsledky experimentů v obrázcích jsou rozděleny do dvou sad výsledků, Vlevo je sada s kontrolní pšenicí Novosibirskaaja a se pšenicemi ANK-28A, ANK-28B a Aoi-Yu, které obsahují zvýšené množství anthokyanů a jsou isogenní s pšenicí Novosibirskaaja. Pro druhou sadu měření (v obrázcích napravo) je kontrolní skupina potkanů krmena pšenicí Bohemia a experimentální skupiny krmené pšenicemi UC66049 a Skorpion. Všechna měření byla prováděna v tripletech.

#### 7.3.1. Stanovení aktivity CYP1A

##### 7.3.1.1. Stanovení aktivity CYP1A1 s využitím ethoxyresorufinu

Stanovení aktivity CYP1A1 s využitím substrátu ethoxyresorufinu (stanovuje se metabolit resorufin) neukázalo výrazné ovlivnění aktivity. U skupiny ANK-28A se ukázala mírná inhibice na 85,8 % a u skupiny ANK-28B výraznější inhibice na 67,1 %. (Obr. 15)

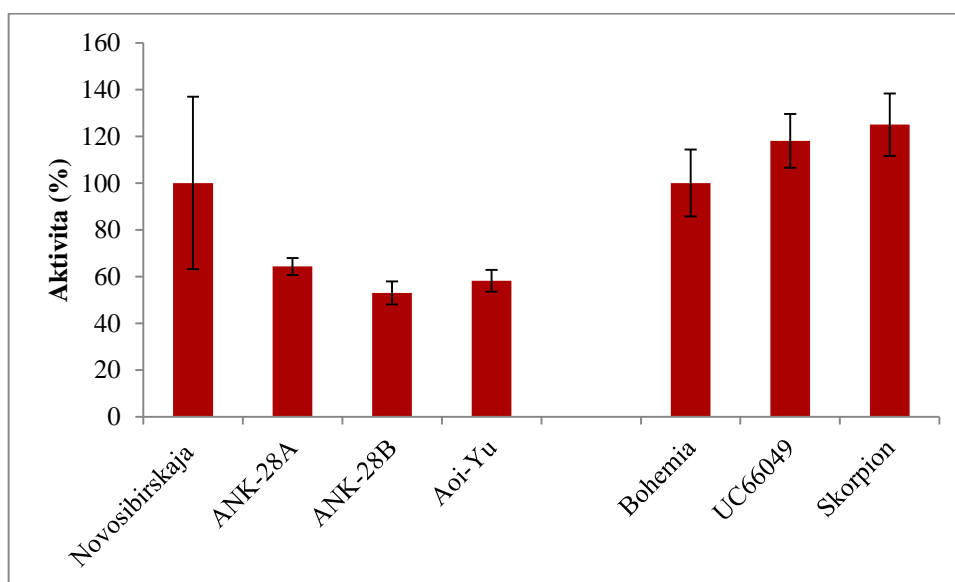




**Obrázek 15:** Stanovení aktivity CYP1A1 s využitím ethoxyresorufinu

### 7.3.1.2. Stanovení aktivity CYP1A2 s využitím fenacetinu

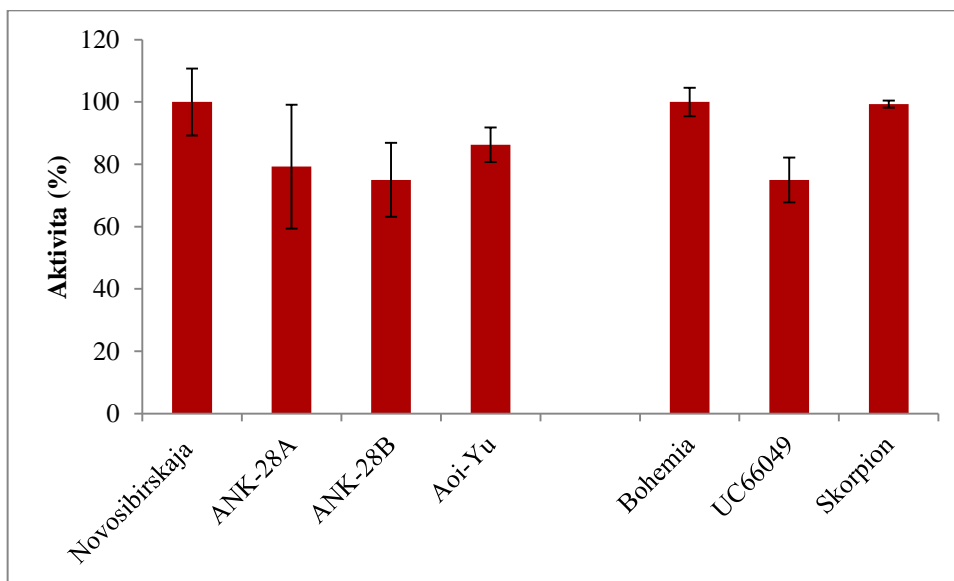
Stanovení aktivity CYP1A2 pomocí substrátu fenacetinu (stanovuje se metabolit paracetamol) ukázalo mírné zvýšení aktivity u skupiny UC66049 (o 18%) a Skorpion (o 25%). Naopak u skupin ANK-28A, ANK-28B a Aoi-Yu se projevila výraznější inhibice. V případě skupiny ANK-28A na 64,2 %, ANK-28B na 54,9 % a Aoi-Yu na 58,1 %. (Obr. 16)



**Obrázek 16:** Stanovení aktivity CYP1A2 s využitím phenacetinu

### 7.3.2. Stanovení aktivity CYP2E s využitím chlorzoxazonu

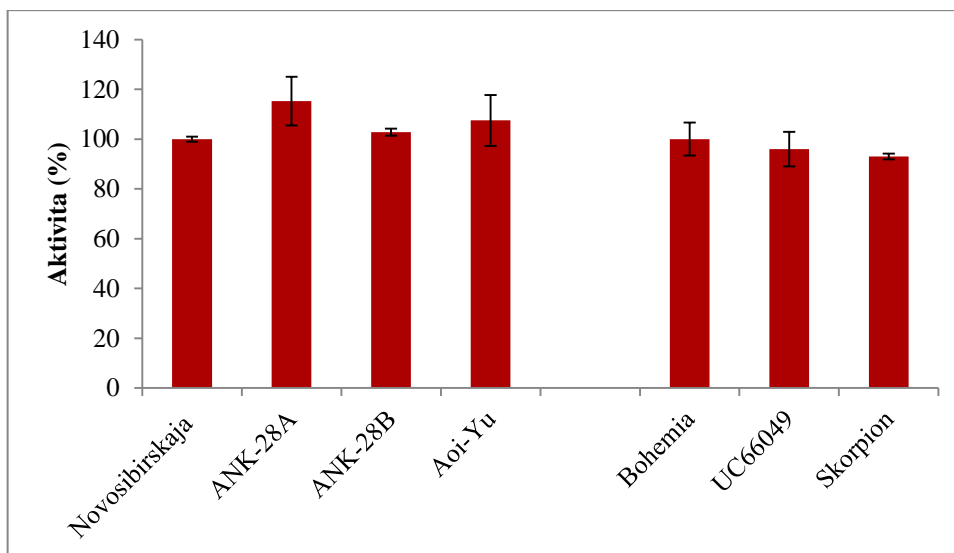
Stanovení aktivity CYP2E1 s využitím substrátu chlorzoxazonu (stanovuje se metabolit 6'-hydroxychlorzoxazon) (Obr. 17) ukázalo mírnou inhibici aktivity CYP u všech skupin potkanů. Ani u jedné skupiny však inhibice nedosáhla více jak 25 %.



**Obrázek 17:** Stanovení aktivity CYP2E1 s využitím chlorzoxazonu

### 7.3.3. Stanovení aktivity CYP3A s využitím testosteronu

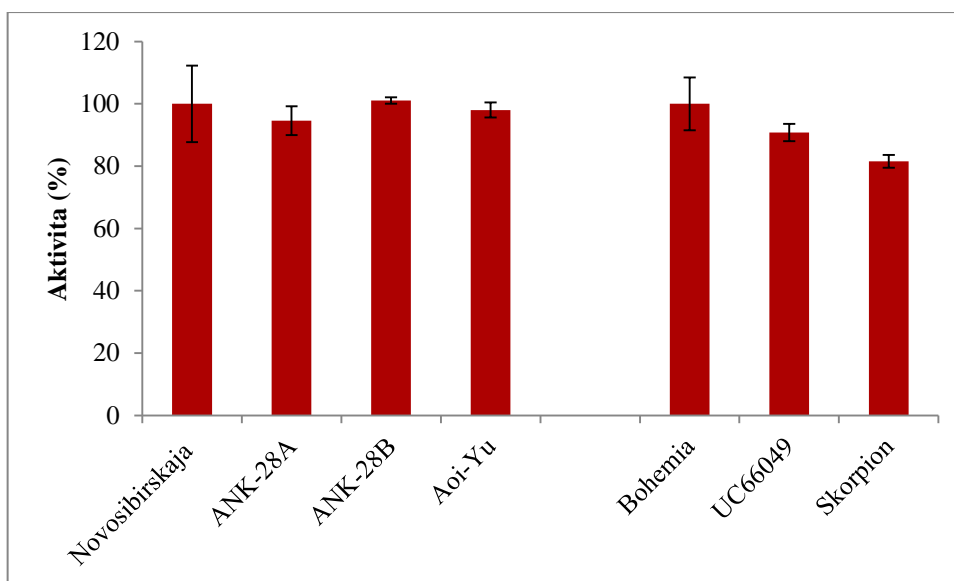
U první sady měření CYP3A4 s využitím substrátu testosteronu (stanovuje se metabolit 6'-hydroxytestosteron) byla zjištěna mírně zvýšená aktivita u skupiny krmené pšenicí ANK-28A o 15 %. Ostatní skupiny nevykazují výraznější změnu aktivit. (Obr. 18).



**Obrázek 18:** Stanovení aktivity CYP3A4 s využitím testosteronu

#### 7.3.4. Stanovení aktivity CYP2D s využitím bufuralolu

Při měření aktivity CYP2D s využitím substrátu bufuralolu (stanovuje se metabolit 1'-hydroxybufuralol) se zjistila mírná inhibice o 19 % pouze u skupiny Skorpion. U ostatních skupin se nezjistila významná změna aktivity. (Obr. 19)



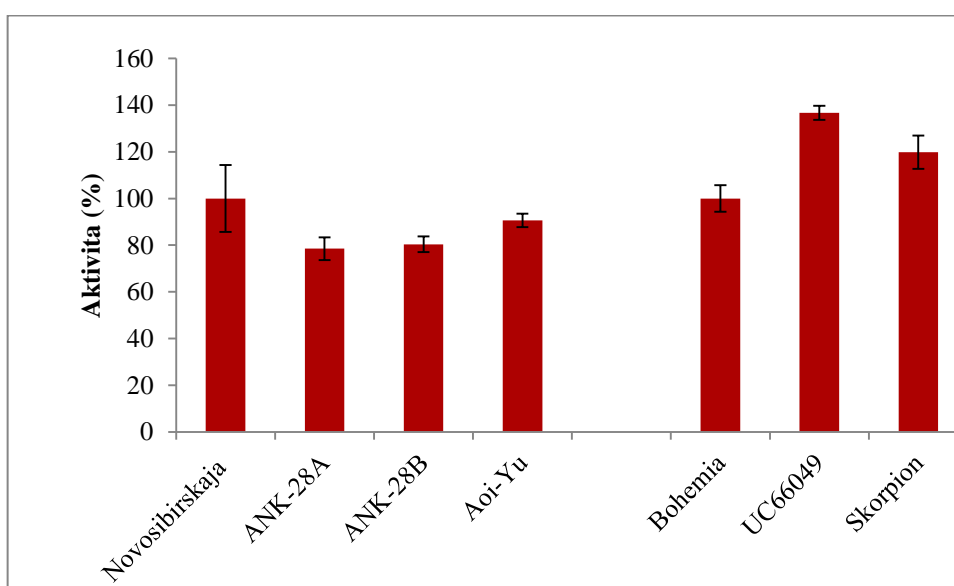
**Obrázek 19:** Stanovení aktivity CYP2D s využitím bufuralolu

### 7.3.5. Stanovení aktivity CYP2C

#### 7.3.5. 1. Stanovení aktivity CYP2C s využitím diazepamu

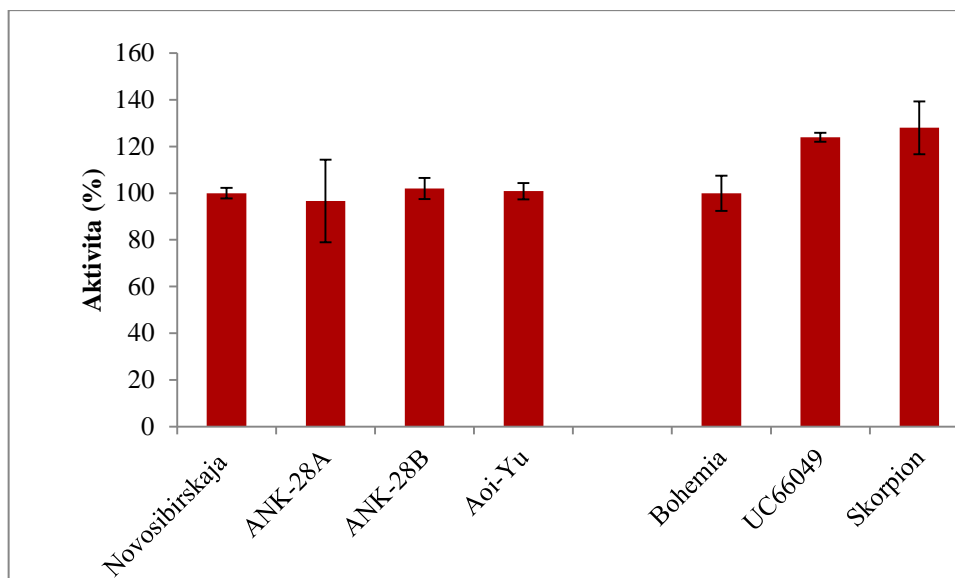
Při měření aktivity cytochromů 2C s využitím diazepamu lze stanovit dva metabolity:

- Desmethyl Diazepam, který u lidí vzniká za účasti CYP2C11 při využití diazepamu jako substrátu v našem experimentu došlo ke snížení produkce desmethyl Diazepam u skupin ANK-28A, ANK-28B a Aoi-Yu, pouze u skupiny UC66049 se aktivita zvýšila na 136 % (Obr. 20)



**Obrázek 20:** Stanovení aktivity CYP2C11 s využitím diazepamu, metabolit desmethyl Diazepam

- Druhým metabolitem diazepam je temazepam, který u člověka vzniká zejména za účasti CYP3A v našem experimentu aktivity CYP spojená se vznikem temazepam se nezměnila u skupin ANK-28A, ANK-28B a Aoi-Yu, mírně zvýšená aktivita (o 20 %) se zjistila u skupin UC66049 a Skorpion. (Obr. 21)

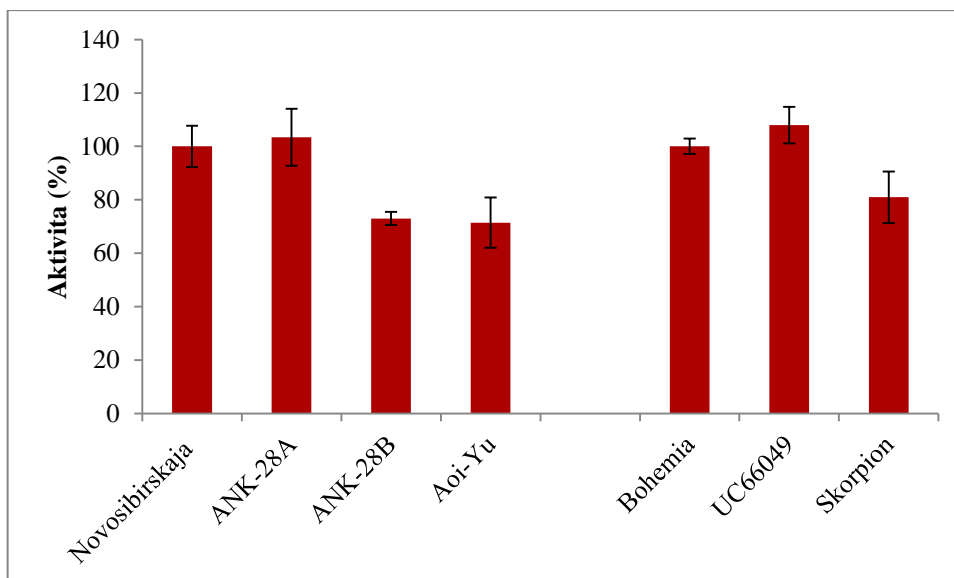


**Obrázek 21:** Stanovení aktivity CYP3A s využitím diazepam, metabolit temazepam

#### **7.3.5.2. Stanovení aktivity CYP2C s využitím warfarinu**

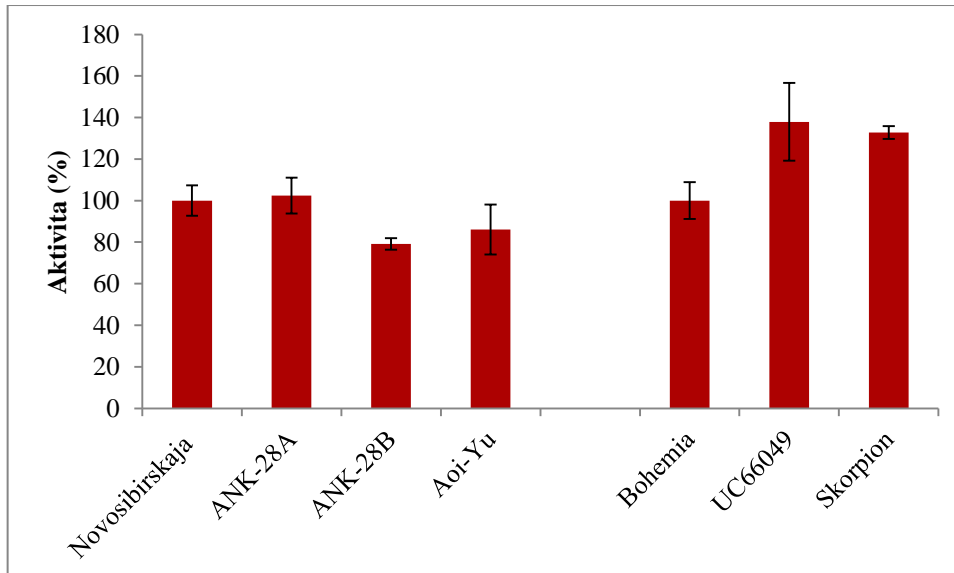
Warfarin je metabolizován různými cytochromy P450 za vzniku několika metabolitů: 7'-hydroxywarfarin je produktem CYP2C6, 6'-hydroxywarfarin je produktem CYP2C11 a CYP1A1, 4'-hydroxywarfarin vzniká působením CYP2C11 a CYP2B1. 10'-hydroxywarfarin vzniká u potkanů za účasti CYP3A2.

- 7'-hydroxywarfarin – obdobně jako u metabolitu 10'-hydroxywarfarin se zjistila inhibice na 70 % původní hodnoty u skupin ANK-28A , ANK-28B a na 80 % u skupiny Skorpion (Obr. 22)



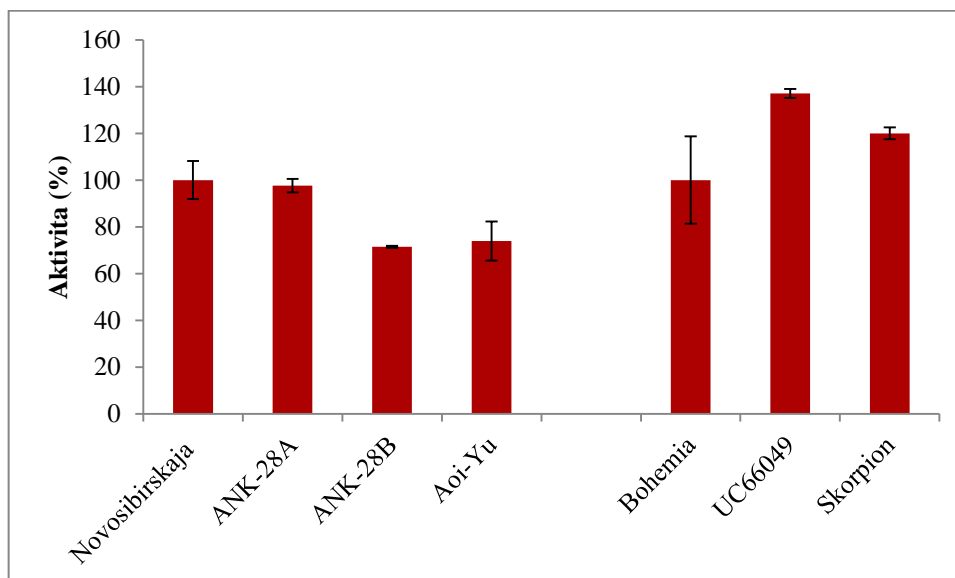
**Obrázek 22:** Stanovení aktivity CYP2C6 s využitím warfarinu, metabolit 7'hydroxywarfarin

- 6'hydroxywarfarin – skupiny ANK-28B a Aoi-Yu vykazovaly inhibici aktivity CYP2C11 a CYP1A1 na 80 % a 86 % původní hodnoty (Obr. 23)



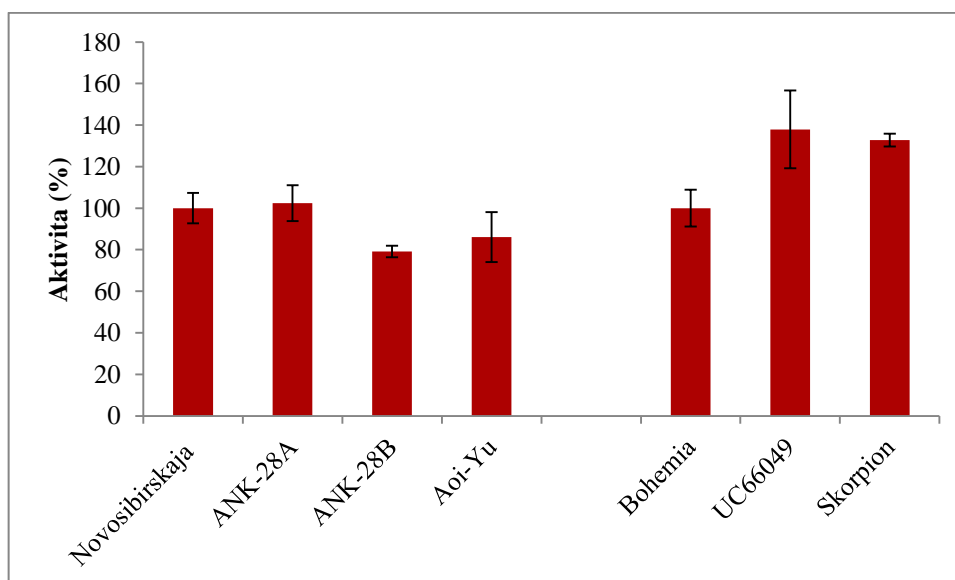
**Obrázek 23:** Stanovení aktivity CYP2C11 a CYP1A1 s využitím warfarinu, metabolit 6'hydroxywarfarinu

- 4'hydroxywarfarin – u skupin ANK-28B a Aoi-Yu se zjistila inhibice na 71 % a 74 % původní hodnoty, zvýšení aktivity o 37 % jsme naopak pozorovali u skupin UC66049 a o 20 % u skupiny Skorpion (Obr. 24)



**Obrázek 24:** Stanovení aktivity CYP2C9 s využitím warfarinu, metabolit 4'hydroxywarfarin

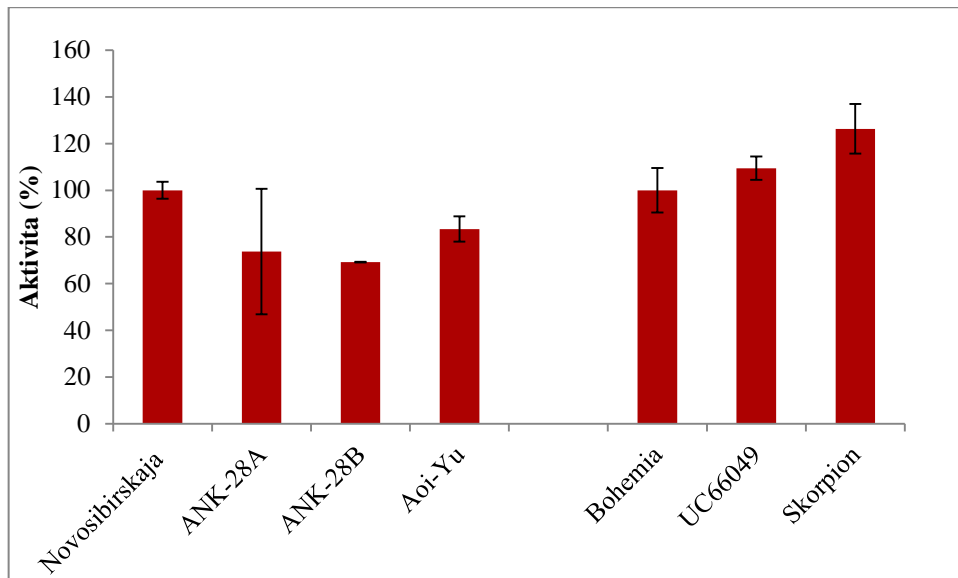
- 10'hydroxywarfarin – stanovením tohoto metabolitu se zjistila mírná inhibice aktivity okolo 15 % u skupin ANK-28A a ANK-28B, skupiny UC66049 a Skorpion vykazovaly zvýšení aktivity až o 37 % (Obr. 25)



**Obrázek 25:** Stanovení aktivity CYP3A2 s využitím warfarinu, metabolit 10'hydroxywarfarin

### 7.3.5.3. Stanovení aktivity CYP2C11 (CYP2C6) s využitím diklofenaku

Měření aktivity CYP2C9 s využitím diklofenaku (stanovuje se metabolit 5'-hydroxydiklofenak) ukázalo inhibici u skupiny ANK-28A na 73,7 % a ANK-28B na 69 %. K zvýšení aktivity (o 26 %) došlo pouze u skupiny Skorpion. (Obr. 26).

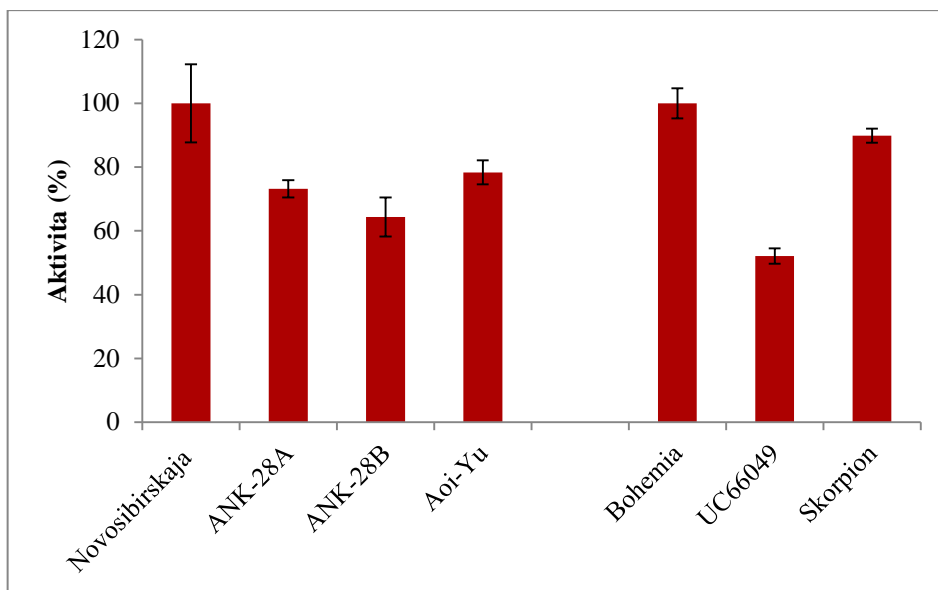


**Obrázek 26:** Stanovení aktivity CYP2C11/6 s využitím diklofenaku

### 7.3.6. Stanovení aktivity CYP2B s využitím 7-ethoxy – 4 - (trifluorometyl)kumarin (EFC)

Měření aktivity CYP2B1 s využitím substrátu EFC (stanovuje se metabolit HFC) ukázalo inhibici tohoto enzymu u skupin ANK-28A na 73 %, ANK-28B na 64 % i u Aoi-Yu na 78 %. Po konzumaci pšenice UC66049 se aktivita CYP2B1 snížila na 52 %. (Obr. 27)





**Obrázek 27:** Stanovení aktivity CYP2B1 s využitím EFC

## DISKUZE

Hlavním cílem této bakalářské práce je studium aktivity jaterních biotransformačních enzymů - cytochromů P450 po konzumaci diety bohaté na přírodní polyfenolické látky. Anthokyany jsou podskupina flavonoidů, odpovídající za modré a červené zbarvení plodů rostlin. Z klinického hlediska jsou významné svými antioxidačními schopnostmi. Odstraňují z organismu nadbytek volných radikálů, které mohou interagovat s endogenními strukturami a způsobit tak závažná onemocnění (např. ateroskleróza, Alzheimerova choroba či nádorová bujení). Zvýšení konzumace potravin, obsahující anthokyany se jeví jako vhodná cesta k prevenci nemocí, které se v naší populaci vyskytují čím dál častěji.<sup>27, 28</sup>

Tato bakalářská práce se zabývá studiem aktivity CYP v potkaní mikrosomální frakci. Potkani byli krmeni pšenicemi obohacenými o anthokyany a kontrolními pšenicemi bez anthokyanů. Z výsledků vyplývá, že v případě isogenních pšenic se projevuje mírný inhibiční vliv u skupin krmených pšenicemi obohacenými anthokyany s výjimkou CYP3A (substrát testosteron i diazepam) a CYP2D (substrát bufuralol). Jelikož u člověka CYP2D6 metabolizuje 15 - 20 % všech klinicky používaných léčiv a CYP3A4 až 30 %.<sup>5, 10</sup> Neovlivnění jejich aktivity anthokyany může být pozitivním výsledkem. Inhibice o více jak 25 % se u isogenních pšenic projevila u CYP2B stanoveného pomocí EFC (skupiny ANK-28A na 73,1 %, ANK-28B na 64,3 % CYP2C11 a CYP1A1, metabolit 6'-hydroxywarfarin (skupiny ANK-28B na 60,9 % a Aoi-Yu na 54,2 %) a CYP1A stanoveného pomocí ethoxyresorufinu (skupina ANK-28B na 67,1 %) i fenacetinu (skupina ANK-28A na 64,2 %, ANK-28B na 54,9 % a Aoi-Yu na 58,1 %).

U skupiny experimentálních zvířat, která konzumovala pšenici UC66049, Skorpion a kontrolní pšenici Bohemia se projevilo častěji trend zvyšující se aktivity. Zvýšenou aktivitu lze pozorovat u rodiny CYP2C, konkrétně při stanovení aktivity CYP2C11 s využitím diazepam (skupina potkanů krmená pšenicí UC66049) o 36 %, stanovení aktivity CYP2C11 s využitím warfarinu (skupina UC66049) o 37 %, stanovení aktivity CYP2C11/6 se substrátem diklofenakem (skupina Skorpion) o 26 %. U rodiny CYP3A - byla zvýšená aktivita při stanovení s využitím warfarinu (skupina UC66049 a Skorpion) až o 37 %. Aktivita CYP1A2 byla zvýšena až o 25 % (skupina Skorpion). Snížení aktivity cytochromů P450 bylo zaznamenáno pouze u CYP2E1 (skupina UC66049) o 24 %, u CYP2D a CYP2C6 (skupina Skorpion) o 20 % a CYP

2B (skupina UC66049) o 48 %. Studie zabývající se problematikou ovlivnění aktivity CYP anthokyany, ukazují stejný trend, tedy že anthokyany mají malý, pokud vůbec nějaký, vliv na vzniku interakce potravin - lék.<sup>28,32</sup>

Provedené experimenty ukazují, že konzumace potravin obohacených o anthokyany nevykazuje klinicky významné ovlivnění aktivity biotransformačních enzymů. Ze získaných výsledků vyplývá, že anthokyany mají mírný potenciál při interakci lék - potravin.<sup>28</sup> Naopak inhibice některých enzymů např. CYP2E1 anthokyany může působit pozitivně na snížení tvorby ROS (např. při metabolismu ethanolu).<sup>29</sup> Produkce pečiva z mouky obohacené o anthokyany může být tedy vhodnou cestou pro doplnění antioxidantů do organismu.

## ZÁVĚR

Tato bakalářská práce studuje vliv přírodních polyfenolických látek na jaterní biotransformační enzymy, konkrétně cytochromy P450, u experimentálních zvířat. Enzymové aktivity byly měřeny v mikrosomální frakci jaterního homogenátu pomocí specifických substrátů pro jednotlivé CYP.

Majoritní část práce se věnuje stanovení aktivity cytochromů P450 významných pro metabolismus xenobiotik: CYP1A s využitím ethoxyresorufinu a phenacetinu, CYP2E s využitím chlorzoxazonu, CYP2C s využitím diazepam, CYP2D6 s využitím bufuralolu, CYP2C, CYP3A2, CYP1A1 a CYP3A s využitím warfarinu, CYP2C s využitím diklofenaku a CYP2B s využitím EFC. Měření neukázalo žádné klinicky významné ovlivnění aktivity studovaných enzymů po konzumaci pšeníc obohacených o anthokyany.

CITACE:

- (1) Vodrážka, Z. *Biochemie*, 2.vydání; 2002.
- (2) Stiborová. Význam Cytochromů P450 pro Lidský Organismus. *Chem. List.* **1999**, 55 (5).
- (3) Lenka Skálová, I. B. *Metabolismus Léčivých a Jiných Xenobiotik*, 1.vydání; Karolinum: Praha, **2011**.
- (4) Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E. Cytochromes P450 and Metabolism of Xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, 58 (5–6), 737–747.
- (5) Eybl, V. *Vybrané Kapitoly Z Obecné Farmakologie*, 2.; Karolinum: Praha, 2010.
- (6) Ram P. Gupta, M. B. A.-D. Cytochrome P450 Enzymes in Chicken: Characteristics and Induction by Xenobiotics. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* **1998**, 121 (1-3), 73–83.
- (7) Voet, D. *Biochemie*; Victoria Publishing, **2002**
- (8) Nebert, D. W.; Nelson, D. R.; Kamataki, T.; Waxman, D. J.; Guengerich, F. P.; Estabrook, R. W.; Feyereisen, R.; Gonzalez, F. J.; Coon, M. J.; Gunsalus, I. C.; Gotoh, O.; Okuda, K. The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names of Enzymes, and Nomenclature. *DNA Cell Biol.* **1993**, 12 (13), 1–51.
- (9) Walsh, A. A.; Szklarz, G. D.; Scott, E. E. Human Cytochrome P450 1A1 Structure and Utility in Understanding Drug and Xenobiotic Metabolism. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288 (18), 12932–12943.
- (10) 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
- (11) Gonzalez, F. J. Role of Cytochromes P450 in Chemical Toxicity and Oxidative Stress: Studies with CYP2E1. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2005**, 569 (1–2), 101–110.
- (12) Cavallari, L. H.; Jeong, H.; Bress, A. Role of Cytochrome P450 Genotype in the Steps toward Personalized Drug Therapy. *Pharmacogenomics. Pers. Med.* **2011**, 4 (1), 123–136.
- (13) Tydén, E.; Tjälve, H.; Larsson, P. Gene and Protein Expression and Cellular Localisation of Cytochrome P450 Enzymes of the Intestine and Liver. **2014**, 1–8.
- (14) Linhart, K.; Bartsch, H.; Seitz, H. K. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS)

and Cytochrome P-450 2E1 in the Generation of Carcinogenic Etheno-DNA Adducts. *Redox Biol.* **2014**, *3*, 56–62.

(15) Macholán, L. *SEKUNDÁRNÍ METABOLITY*; Masarykova Univerzita: Brno, **2003**

(16) Pandey, K. B.; Rizvi, S. I. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2009**, *2* (5), 270–278.(1)

(17) Spencer, J. P. E.; Abd El Mohsen, M. M.; Minihane, A.-M.; Mathers, J. C. Biomarkers of the Intake of Dietary Polyphenols: Strengths, Limitations and Application in Nutrition Research. *Br. J. Nutr.* **2008**, *99* (1), 12–22 DOI: 10.1017/S0007114507798938.

(18) Gorzynik-Debicka, M.; Przychodzen, P.; Cappello, F.; Kuban-Jankowska, A.; Marino Gammazza, A.; Knap, N.; Wozniak, M.; Gorska-Ponikowska, M. Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (3), 686.

(19) Kumar, S.; Pandey, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* **2013**, *2013* (February 2014).

(20) Yao, L. H.; Jiang, Y. M.; Shi, J.; Tomas-Barberan, F. a; Datta, N.; Singanusong, R.; Chen, S. S. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2004**, *59* (3), 113–122.

(21) Mozaffarian, D.; Wu, J. H. Y. Flavonoids, Dairy Foods, and Cardiovascular and Metabolic Health. *Circ. Res.* **2018**, *122* (2), 369–384.

(22) Kamil Záruba. *Analytická Chemie 1. Díl*, 1. vydání.; VŠCH Praha: Praha, 2016.

(23) Pavel Klouda. *Moderní Analytické Metody*; Ostrava, 2003.

(24) EXTRSSYNTHESE: Anthocyanin standart reference materiál [online]. [cit. 25.3.2018]. Dostupné z: <https://www.extrasynthese.com/anthocyanin.html>

(25) Fang, J. Bioavailability of Anthocyanins. *Drug Metab. Rev.* **2014**, *46* (4), 508–520.

(26) Fastest Oncology and Hematology Insight Engine: Hemoglobine Metabolism [online]. [cit. 30.3.2018] Dostupné z: <https://www.ecosia.org/images?q=protoporfyrin+IX+thiolate+bond>

(27) Janšáková, K.; Bábíčková, J.; Havrlentová, M.; Hodosy, J.; Kraic, J.; Celec, P.; Tóthová, Ľ. The Effects of Anthocyanin-Rich Wheat Diet on the Oxidative Status and Behavior of Rats. *Croat. Med. J.* **2016**, *57* (2), 119–129.

(28) Kamenickova A., Anzenbacherova A., Pavek P, Soshilov A. A., D. M. S. Effects of Anthocyanins on the AhR-CYP1A1 Signaling Pathway in Human Hepatocytes and Human Cancer Cell Lines. *Toxicol lett* **2013**, *31* (9), 1713–1723.

- (29) Khoo, H. E.; Azlan, A.; Ismail, A.; Abas, F.; Hamid, M. Inhibition of Oxidative Stress and Lipid Peroxidation by Anthocyanins from Defatted *Canarium Odontophyllum* Pericarp and Peel Using in Vitro Bioassays. *PLoS One* **2014**, *9* (1), 1–9.
- (30) Lachman, J.; Hamouz, K.; Čepl, J.; Pivec, V.; Šulc, M.; Dvořák, P. Vliv Vybraných Faktorů Na Obsah Polyfenolů a Antioxidační Aktivitu Hlíz Brambor. *Chem. List.* **2006**, *100* (7), 522–527.
- (31) Claudine Manach, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, and L. J. Polyphenols - Food Sources and Bioavailability.pdf. *Am J Clin Nutr* **2004**, *79* (5), 727–47.
- (32) 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.