

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

---



**STUDIUM METABOLICKÝCH INTERAKCÍ**  
**SLOŽEK DOPLŇKŮ STRAVY**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

Olomouc 2017

Mgr. Veronika Tománková

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

---



Mgr. Veronika Tománková

**STUDIUM METABOLICKÝCH INTERAKCÍ**  
**SLOŽEK DOPLŇKŮ STRAVY**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitelka: Doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.

Obor: Lékařská chemie a klinická biochemie

Disertační práce byla vypracována během prezenční formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2012 – únor 2017.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury, kterou cituji. Spoluautoři souhlasí s použitím publikovaných výsledků.

V Olomouci dne

.....  
Mgr. Veronika Tománková

V první řadě bych velmi ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Evě Anzenbacherové, CSc. za její odborné a velice laskavé vedení a za cenné rady, které mi poskytla během mého postgraduálního studia a při sepsání této disertační práce. Velmi děkuji také za její trpělivost. Současně děkuji prof. RNDr. Pavlovi Anzenbacherovi, DrSc. za jeho cenné rady, připomínky a předané zkušenosti.

Mé poděkování patří také prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc., přednostce Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP za možnost vypracovat svou disertační práci na tomto pracovišti a za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Děkuji také Mgr. Lence Jourové z Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP, kolegyním z Ústavu farmakologie LF UP a Mgr. Barboře Liškové, Ph.D. z Ústavu molekulární a translační medicíny LF UP za jejich pomoc při experimentálním měření, získávání dat a také za jejich podporu. Dále děkuji prof. Mgr. Martinovi Modrianskému, Ph.D. a Ing. Evě Gabrielové, Ph.D. za izolaci lidských hepatocytů.

V neposlední řadě bych velmi ráda poděkovala svému manželovi Kamilovi Tománkovi za neskutečnou podporu a trpělivost po celou dobu mého postgraduálního studia. Za podporu děkuji také svým rodičům a celé své rodině.

Tato práce byla vypracována v rámci řešení projektu Grantové agentury České republiky (grant č. P303/12/G163) a vnitřních studentských grantů Univerzity Palackého v Olomouci (LF\_2013\_008, LF\_2014\_014, LF\_2015\_007 a LF\_2016\_012).

## SOUHRN

Předkládaná disertační práce se zabývá vlivem přírodních látek, které jsou velmi často přítomny v komerčně dostupných doplňcích stravy, na vlastnosti nejdůležitějších enzymů I. fáze biotransformace xenobiotik, konkrétně cytochromů P450 (CYP), a to za podmínek *in vitro* a *in vivo*. Dalším předmětem této práce je vliv celosvětově závažné metabolické poruchy, jakou je obezita, na vlastnosti CYP za podmínek *in vivo*.

První část disertační práce je zaměřena na vliv přírodních látek (ve vzorcích ze zlatobýlu obecného, *Solidago virgaurea*; brusnice borůvky, *Vaccinium myrtillus* a ibišku súdánského, *Hibiscus sabdariffa*) na aktivitu a expresi proteinů CYP za podmínek *in vitro*. Tyto studie byly u zmíněných přírodních látek provedeny v lidské jaterní mikrosomální frakci; u zlatobýlu obecného také v primárních kulturách lidských hepatocytů. Z těchto tří zmiňovaných přírodních látek měla nejvýraznější vliv na aktivitu enzymů CYP brusnice borůvka; konkrétně byla pozorována inhibice aktivity CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4. Inhibice aktivity CYP3A4 byla zaznamenána také v odvaru a výluhu z ibišku súdánského.

V další části disertační práce byl sledován vliv extraktu z brusinky a zeleného čaje u normálních a obézních myší na aktivitu, expresi proteinů a mRNA CYP za podmínek *in vivo*. Experimenty byly prováděny v myší mikrosomální frakci jater a střev. Extrakt z brusinky ovlivnil biotransformační enzymy I. fáze pouze u normálních myší, avšak zelený čaj ovlivnil vlastnosti některých biotransformačních enzymů I. fáze jak u normálních, tak u obézních myší.

Poslední část disertační práce se zabývá vlivem samotné obezity na aktivitu, mRNA expresi a expresi proteinů CYP za podmínek *in vivo*. Studie byla provedena v myší mikrosomální frakci jater a střev. Nejvýznamnější výstup z této studie bylo zjištění, že u obézních myší byl pozorován signifikantní nárůst aktivity a exprese CYP2A5 v játrech (ortolog lidského CYP2A6).

Klíčová slova: přírodní látky, cytochrom P450, biotransformace, glutamát sodný, mikrosomální frakce, primární kultury lidských hepatocytů

## SUMMARY

The presented dissertation work deals with the influence of natural substances which are often present in commercially available dietary supplements on properties of the most important phase I biotransformation enzymes, namely cytochromes P450 (CYP), under *in vitro* and *in vivo* conditions. Another object of this work is the influence of worldwide serious metabolic disorder such as obesity on properties of CYP enzymes under *in vivo* conditions.

The first part of the thesis focuses on the influence of natural substances (samples from goldenrod, *Solidago virgaurea*; bilberry, *Vaccinium myrtillus*; and hibiscus, *Hibiscus sabdariffa*) on activity and protein expression of CYP under *in vitro* conditions. These studies in the above mentioned natural substances were performed in human liver microsomal fraction; also in primary cultures of human hepatocytes for experiment with goldenrod. The most significant effect on enzyme activity was observed with bilberry; specifically inhibition of CYP1A2, CYP2C9 and CYP3A4 were seen. Inhibition of the CYP3A4 activity was also observed in decoction and leachate of hibiscus.

In the next part of this work, the effect of cranberry and green tea extract on activity and mRNA and protein expression of CYP enzymes in normal and obese mice under *in vivo* conditions was examined. The experiments were performed in mouse microsomal fraction of liver and intestines. Cranberry extract affected enzymes phase I biotransformation only in normal mice, however green tea extract affected the properties of some enzymes phase I biotransformation in both normal and obese mice.

The last part of the dissertation work deals with the influence of obesity itself on activity, mRNA and protein expression of CYP enzymes under *in vivo* conditions. The study was performed in mouse microsomal fraction of liver and intestine. The most significant output of this study was the finding that a significant increase in activity and expression of CYP2A5 (the ortholog of human CYP2A6) in liver of obese mice was observed.

Keywords: natural substances, cytochrome P450, biotransformation, sodium glutamate, microsomal fraction, primary cultures of human hepatocytes

# OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY .....	3
2.1	DOPLŇKY STRAVY .....	3
2.2	FLAVONOIDY .....	5
2.2.1	Klasifikace a vlastnosti flavonoidů.....	5
2.2.2	Biologická dostupnost flavonoidů .....	8
2.2.3	Přírodní produkty s obsahem flavonoidů.....	9
2.2.3.1	Klikva velkoplodá ( <i>Vaccinium macrocarpon</i> ).....	9
2.2.3.2	Zelený čaj ( <i>Camellia sinensis</i> ).....	10
2.2.3.3	Brusnice borůvka ( <i>Vaccinium myrtillus</i> ).....	11
2.2.3.4	Ibišek súdánský ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> ).....	12
2.2.3.5	Zlatobýl obecný ( <i>Solidago virgaurea</i> ).....	13
2.3	METABOLISMUS CIZORODÝCH LÁTEK (XENOBIOTIK) .....	14
2.3.1	Úvod do metabolismu xenobiotik.....	14
2.3.2	CYP v metabolismu xenobiotik (I. fáze detoxikace).....	15
2.3.3	Nomenklatura CYP .....	19
2.3.4	Přehled forem CYP důležitých pro metabolismus xenobiotik včetně léčiv u člověka .....	19
2.3.4.1	Podrodina CYP1A.....	20
2.3.4.2	Podrodina CYP2A.....	20
2.3.4.3	Podrodina CYP2B .....	20
2.3.4.4	Podrodina CYP2C .....	21
2.3.4.5	Podrodina CYP2D.....	21
2.3.4.6	Podrodina CYP2E .....	21
2.3.4.7	Podrodina CYP3A.....	22

2.3.5	Mezidruhové srovnání jednotlivých forem CYP se zaměřením na člověka, myš a potkana .....	22
2.3.5.1	Podrodina CYP1A .....	23
2.3.5.2	Podrodina CYP1B.....	23
2.3.5.3	Podrodina CYP2A .....	23
2.3.5.4	Podrodina CYP2B.....	24
2.3.5.5	Podrodina CYP2C.....	24
2.3.5.6	Podrodina CYP2D .....	25
2.3.5.7	Podrodina CYP2E.....	25
2.3.5.8	Podrodina CYP3A .....	26
2.3.6	Lékové interakce .....	27
2.4	OBEZITA A ZMĚNA AKTIVITY ENZYMŮ CYP .....	29
2.4.1	Obezita a s ní spojené zdravotní problémy .....	29
2.4.2	Modely obezity.....	29
2.4.2.1	Genetické modely – monogenní .....	30
2.4.2.2	Genetické modely – polygenní .....	31
2.4.2.3	Negenetické modely.....	32
2.4.3	Změny exprese a aktivity enzymů CYP u různých modelů obezity .....	32
3	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE .....	34
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	35
4.1	Materiál.....	35
4.1.1	Roztoky, chemikálie a studované látky.....	35
4.1.2	Použité <i>in vitro</i> modely .....	38
4.1.3	Použité <i>in vivo</i> modely .....	38
4.2	Přístroje.....	39
4.3	Metody.....	40
4.3.1	Příprava vzorků přírodních látek pro <i>in vitro</i> experimenty.....	40



4.3.1.1	Zlatobýl obecný ( <i>Solidago virgaurea</i> ).....	40
4.3.1.2	Brusnice borůvka ( <i>Vaccinium myrtillus</i> ).....	41
4.3.1.3	Ibišek súdánský ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> ).....	41
4.3.2	Standardizace vzorků zlatobýlu obecného na fenolický diglukosid – leiokarposid .....	41
4.3.3	Spektrofotometrické stanovení obsahu celkových antokyanů.....	42
4.3.4	Stanovení antokyanů a antokyanidinů metodou HPLC.....	42
4.3.5	Příprava experimentálních zvířat pro <i>in vivo</i> experiment.....	44
4.3.6	Příprava mikrosomální subcelulární frakce.....	45
4.3.7	HPLC analýza polyfenonu 60.....	45
4.3.8	HPLC analýza extraktu z brusinek .....	46
4.3.9	Stanovení enzymových aktivit vybraných forem CYP .....	47
4.3.10	Stanovení exprese proteinů vybraných forem CYP .....	59
4.3.11	Izolace RNA a kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR).....	60
4.3.12	Statistická analýza .....	60
5	VÝSLEDKY .....	61
5.1	Vliv přípravků ze zlatobýlu obecného na aktivitu CYP v lidské jaterní mikrosomální frakci.....	61
5.2	Vliv přípravků ze zlatobýlu obecného na enzymovou aktivitu a expresi proteinů CYP v primárních kulturách lidských hepatocytů.....	62
5.3	Vliv brusnice borůvky na aktivitu CYP v lidské jaterní mikrosomální frakci .....	64
5.4	Vliv ibišku súdánského na aktivitu CYP v lidské jaterní mikrosomální frakci....	68
5.5	Vliv extraktu z brusinky na vlastnosti CYP v jaterní a střevní mikrosomální frakci <i>in vivo</i> .....	71
5.5.1	Stanovení enzymových aktivit, exprese proteinů a mRNA jednotlivých forem CYP v jaterní mikrosomální frakci u normálních a obézních myší .....	71
5.5.2	Stanovení exprese proteinů a mRNA jednotlivých forem CYP ve střevní mikrosomální frakci u normálních a obézních myší .....	73

5.6	Vliv extraktu ze zeleného čaje (polyfenonu 60 – P) na vlastnosti CYP v jaterní a střevní mikrosomální frakci <i>in vivo</i> .....	74
5.6.1	Stanovení enzymových aktivit, exprese proteinů a mRNA jednotlivých forem CYP v jaterní mikrosomální frakci u normálních myší – vliv P.....	74
5.6.2	Stanovení enzymových aktivit, exprese proteinů a mRNA jednotlivých forem CYP ve střevní mikrosomální frakci u normálních myší – vliv P .....	77
5.6.3	Stanovení enzymových aktivit a exprese mRNA jednotlivých forem CYP v jaterní mikrosomální frakci u obézních myší – vliv P .....	78
5.6.4	Stanovení enzymových aktivit a exprese mRNA jednotlivých forem CYP ve střevní mikrosomální frakci u obézních myší – vliv P.....	80
5.7	Vliv samotné obezity na vlastnosti CYP v jaterní a střevní mikrosomální frakci <i>in vivo</i> .....	81
5.7.1	Stanovení enzymových aktivit jednotlivých forem CYP v myší jaterní mikrosomální frakci .....	81
5.7.2	Srovnání exprese proteinů CYP a odpovídající mRNA v myší jaterní mikrosomální frakci u normálních a obézních myší.....	83
5.7.3	Změny exprese vybraných CYP v mikrosomální frakci tenkého a tlustého střeva u myší .....	84
6	DISKUZE .....	86
7	ZÁVĚRY .....	94
8	SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI .....	96
9	REFERENCE.....	101

## SEZNAM ZKRATEK

18S rRNA	Srovnávací gen <i>eucaryotic 18S ribosomal RNA</i>
ABC	Transportní protein <i>adenosine triphosphate-binding cassette</i>
ACN	Acetonitril
AhR	Aryluhlovodíkový receptor
ARC	Obloukovité jádro ( <i>arcuate nucleus</i> )
ATP	Adenosintrifosfát
BCA	Kyselina bicinchoninová
BMI	Index tělesné hmotnosti
C	Katechin
CAR	Konstitutivní androstanový receptor
CBG	Cytosolická $\beta$ -glukosidasa
CYP	Cytochrom P450
DEDTC	<i>N,N</i> -dietyldithiokarbamát
DEL	Delfinidin chlorid
DEL-ara	Delfinidin-3- <i>O</i> -arabinosid chlorid
DEL-gala	Delfinidin-3- <i>O</i> -galaktosid chlorid
DEL-glu	Delfinidin-3- <i>O</i> -glukosid chlorid
DIO	Obezita vyvolaná stravou ( <i>diet-induced obesity</i> )
DMEM/F12	Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem s přidavkem F12
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EC	Epikatechin
ECG	Epikatechin-3-galát
EGC	Epigalokatechin
EGCG	Epigalokatechin-3-galát
EGTA	Kyselina ethylenglykol-O,O'-bis(2-aminoethyl) <i>N,N,N',N'</i> -tetraoctová
FBS	Fetální bovinní sérum
GS	Glutamát sodný
HEPES	Kyselina <i>N</i> -(2-hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -ethansulfonová
HFD	Nutričně vyvolaná obezita ( <i>high fat diet</i> )

HNF4 $\alpha$	Transkripční faktor <i>hepatocyte nuclear factor 4<math>\alpha</math></i>
hnRNP A1	Transkripční faktor <i>heterologous nuclear ribonucleoprotein A1</i>
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPRT1	Srovnávací gen <i>hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1</i>
IDH	Isocitrátdehydrogenáza
ISOM	Isomovo médium pro kultivaci hepatocytů
KYA	Kyanidin chlorid
KYA-ara	Kyanidin-3- <i>O</i> -arabinosid chlorid
KYA-gala	Kyanidin-3- <i>O</i> -galaktosid chlorid
LFH	Laktasa-florizin hydrolasa
MAL	Malvidin chlorid
MAL-gala	Malvidin-3- <i>O</i> -galaktosid chlorid
MAL-glu	Malvidin-3- <i>O</i> -glukosid chlorid
MRP2	Protein spojený s mnohočetnou lékovou rezistencí
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid)
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
NDP28	Nízká dávka Polyfenonu 60 po dobu 28 dní
Nrf2	Transkripční faktor <i>nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2</i>
OAT	Transportní protein <i>organic anion transporters</i>
OATP	Transportní protein <i>organic anion transport protein</i>
OCT	Transportní protein <i>organic cation transporters</i>
P	Polyfenon 60
P-gp	P-glykoprotein
PBS	Fosfátový pufr
PenStrep	Roztok penicilinu se streptomycinem
PEO	Peonidin chlorid
PEO-glu	Peonidin-3- <i>O</i> -glukosid chlorid
PET	Petunidin chlorid
PET-gala	Petunidin-3- <i>O</i> -galaktosid chlorid
PET-glu	Petunidin-3- <i>O</i> -glukosid chlorid
PM	Pomalý metabolizátor
PXR	Pregnanový X receptor
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RM	Rychlý metabolizátor

SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného
SGLT1	Glukosový transportér závislý na sodíku
SLC	Transportní protein <i>solute carriers</i>
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindifosfát
UM	Ultrarychlý metabolizátor
VDP28	Vysoká dávka Polyfenonu 60 po dobu 28 dní
VDP3	Vysoká dávka Polyfenonu 60 po dobu 3 dní
WHO	Světová zdravotnická organizace
WME	Williamsovo médium E
ZDF	Zuckerovy obézní diabetičtí ( <i>Zucker diabetic fatty</i> ) potkani



# 1 ÚVOD

V dnešní době je lidský organismus vystaven různým nepříznivým civilizačním vlivům, jako jsou znečištěné životní prostředí, nevědomý příjem toxických látek ze stravy, nadměrné užívání léků či stresové životní situace. Tyto, ale i další negativní faktory ovlivňují zdraví lidského jedince. Většinu negativních vlivů může zmírnit člověk sám; může toho dosáhnout například konzumací doplňků stravy. Užívání různých doplňků stravy je velmi rozšířené nejen v České republice, ale i po celém světě<sup>1</sup>. Doplňky stravy představují zajímavou alternativu k tradiční léčbě, zejména kvůli snadné přístupnosti pro širokou veřejnost<sup>2</sup>.

Je známo, že strava a její složky interferují s mnoha procesy v organismu. Tyto interakce mohou mít buď prospěšné účinky na lidský organismus, ale může dojít také k účinkům škodlivým, a to v závislosti na tom, kde daná interakce probíhá, a také v závislosti na povaze a principu této interakce. Vzájemné působení léků a některých složek potravin může vést ke změnám ve farmakokinetických a farmakodynamických parametrech léčiv, např. může dojít ke snížení nebo zvýšení biologické dostupnosti léčiva. Tyto interakce proto mohou snižovat nebo zvyšovat požadovaný terapeutický účinek léčiva<sup>3</sup>. Interakce, které probíhají na úrovni metabolismu léčiv, se většinou vyskytují tehdy, pokud určitá potravinová složka změní aktivitu enzymů metabolizujících léčiva, zejména cytochromů P450 (CYP)<sup>4,5,6</sup>. Účinně měnit aktivitu CYP mohou např. ovoce, zelenina, alkoholické nápoje, čaje a bylinky, které obsahují složité směsi biologicky aktivních látek<sup>7</sup>. Známým příkladem takové interakce, která vede ke změněnému metabolismu léčiv, je inhibiční vliv grepového džusu obsahujícího furanokumariny na CYP3A4 (nejdůležitější formu CYP pro metabolismus léčiv u lidí)<sup>8,9</sup>.

Stravovací návyky a trendy ve vývoji lidské výživy mají dopad například na životní prostředí, ale také na sociální chování a zdraví lidského jedince. V současné době lidská populace velmi často bojuje s onemocněními, jako jsou např. obezita, osteoporóza, různé druhy rakoviny, cukrovka, různé druhy alergií nebo problémy se zuby. Ekonomicky rozvinuté země se také potýkají s problémy souvisejícími se stárnutím obyvatelstva, s vysokoenergetickými potravinami a nevyváženou stravou<sup>10</sup>. Velmi závažnou metabolickou poruchou, která je rozšířená v těchto zemích a stává se velkým zdravotním problémem, je již zmíněná obezita. Předpokládá se, že obezita způsobuje značnou zátěž pro financování zdravotní péče, a to v důsledku zvýšení množství přidružených chorob, jako jsou diabetes, kardiovaskulární onemocnění a některé druhy rakoviny<sup>11</sup>. Současná pandemie

nadváhy, obezity a s nimi souvisejících onemocnění vede při léčebných postupech k využití kromě různých intervenčních přístupů, jako je farmakoterapie nebo chirurgie, také k užívání již zmíněných doplňků stravy<sup>2</sup>.

Cílem této disertační práce bylo zjistit, zda přírodní látky, které jsou součástí doplňků stravy, mohou ovlivňovat vlastnosti (enzymovou aktivitu, proteinovou expresi a genovou expresi) CYP za podmínek *in vitro* a u experimentálních zvířat, u kterých byla navozena obezita.



## 2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

### 2.1 DOPLŇKY STRAVY

Pod pojmem „doplňek stravy“ si můžeme podle § 2 odst. (1) písm. g) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů představit „potravinu, jejímž účelem je doplňovat běžnou stravu a která je koncentrovaným zdrojem vitaminů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, obsažených v potravine samostatně nebo v kombinaci, určenou k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích“<sup>12</sup>.

V současné době užívání doplňků stravy rapidně roste, a to zejména díky úspěšným marketingovým strategiím či reklamním a internetovým informačním zdrojům<sup>13</sup>. Zajímavostí je, že v České republice se podle České asociace pro speciální potraviny utratilo v roce 2012 téměř 5,5 miliard korun za nákup doplňků stravy; především za doplňky stravy s obsahem vitaminů a minerálů, ale také kloubní a probiotické preparáty<sup>14</sup>.

Doplňky stravy jsou v některých případech podobné léčivým přípravkům (lékům), a to lékovou formou, ale také svým složením. I když mají doplňky stravy a léky podobné složení, liší se v množství účinné látky a také v jeho používání. V tabulce 1 jsou uvedeny základní rozdíly mezi doplňkem stravy a léčivým přípravkem.

**Tabulka 1** – Rozdíly mezi doplňkem stravy a léčivým přípravkem. Modifikováno z encyklopedie SÚKL<sup>15</sup>.

	<b>Doplňěk stravy</b>	<b>Léčivý přípravek</b>
<b>Účel použití</b>	doplnění běžné stravy – koncentrovaný zdroj živin nebo jiných látek	léčebné či preventivní vlastnosti látky nebo kombinace látek
<b>Schvalovací proces</b>	nejsou schvalovány – důležitá pouze informační povinnost vůči Ministerstvu zdravotnictví ČR	nutnost schvalovacího řízení – hodnotí se účinnost, jakost a bezpečnost přípravku
<b>Způsob prodeje</b>	bez lékařského předpisu	většinou na lékařský předpis
<b>Povinné označení na obalu</b>	označení slovy: „doplňěk stravy“	označení registračním číslem SÚKL

Forem, ve kterých mohou být doplňky stravy, ale i léčivé přípravky požívány, je celá řada. Rozlišují se tři kategorie: tuhé, polotuhé a tekuté. Mezi tuhé formy můžeme zařadit kapsle, tablety, tobolky, granuláty a jiné. Do kategorie polotuhých forem spadají masti, pasty, čípky či gely. Poslední kategorií jsou formy tekuté, které zahrnují především roztoky, kapky, tinktury, sirupy apod.

Problematiku doplňků stravy upravuje vyhláška č. 352/2009 Sb., kterou se mění vyhláška č. 225/2008 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin (dále jen vyhláška č. 225/2008 Sb.). Tato vyhláška obsahuje v příloze č. 1 seznam vitaminů a minerálních látek; v příloze č. 2 seznam povolených forem vitaminů a minerálních látek, které je možné použít pro výrobu doplňků stravy. Na druhou stranu vyhláška č. 225/2008 Sb. stanovuje látky, které v žádném případě nelze pro výrobu doplňků stravy použít.

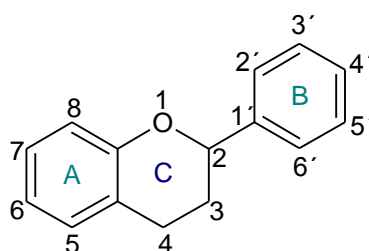
Vzhledem k variabilnímu množství účinných látek přítomných v jednotlivých preparátech přírodního původu může při současné konzumaci doplňků stravy a léčiv dojít k potenciálním interakcím, a tím k možným nežádoucím účinkům, což může představovat významné riziko pro zdraví pacientů<sup>13</sup>.

Přírodní látky obsažené v různých přírodních produktech vykazují potenciální pozitivní účinky na lidský organismus. Z chemického hlediska patří především do skupiny polyfenolických látek. Rozsáhlou skupinou polyfenolických látek přítomných ve většině potravin rostlinného původu jsou flavonoidy, a právě těm bude věnována pozornost v následujících odstavcích.

## 2.2 FLAVONOIDY

### 2.2.1 Klasifikace a vlastnosti flavonoidů

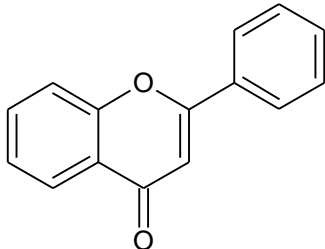
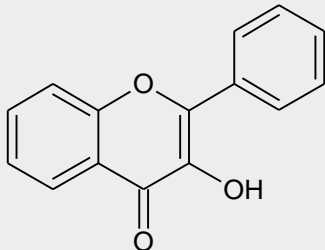
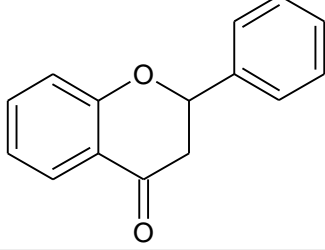
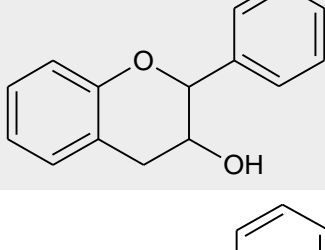
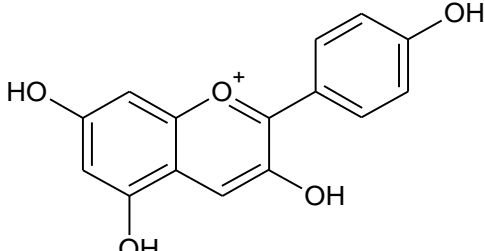
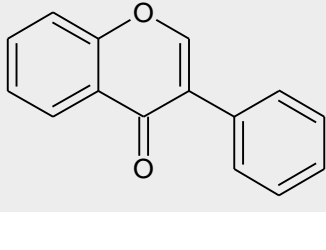
Flavonoidy, jak bylo zmíněno výše, patří do skupiny polyfenolických sloučenin, které se vyskytují téměř ve všech potravinách rostlinného původu, zejména v ovoci, zelenině, čaji nebo víně<sup>16</sup>. Základní chemická struktura flavonoidů (obrázek 1) se skládá ze dvou benzenových kruhů (A a B) spojených přes heterocyklický pyranový kruh (C)<sup>17</sup> a obsahuje 15 atomů uhlíku<sup>18</sup>.



**Obrázek 1** – Základní chemická struktura flavonoidů. Překresleno z *Kumar a kol., 2013*<sup>19</sup>.

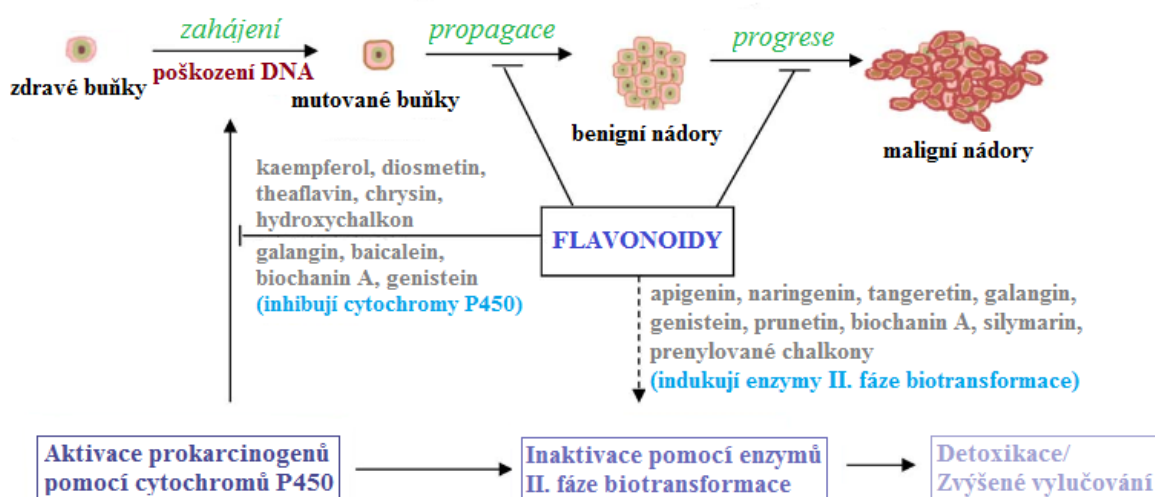
Podle své chemické struktury jsou flavonoidy rozděleny do šesti hlavních tříd (flavony, flavonoly, flavanony, flavanoly, antokyany a isoflavony)<sup>16</sup>. Třídy flavonoidů a jejich základní charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 2.

**Tabulka 2** – Hlavní třídy flavonoidů, chemická struktura, jednotliví zástupci a potravní zdroj. Modifikováno z *Nijveldt a kol.*<sup>16</sup>.

<b>Třída</b>	<b>Chemická struktura</b>	<b>Zástupce</b>	<b>Zdroj potravy</b>
<b>Flavony</b>		Apigenin Chrysin Luteolin	Brusinky Celer Hrozny Ovocná kůra Petržel
<b>Flavonoly</b>		Galangin Kaempferol Kvercetin Myricetin	Cibule Jablka Kapusta Pór
<b>Flavanony</b>		Hesperetin Naringenin Narigin	Citrusová kůra Citrusy
<b>Flavanoly</b>		Epikatechin Katechin	Černý čaj Červené víno Čokoláda Zelený čaj
<b>Antokyany</b>		Delfinidin Kyanidin Malvidin Pelargonidin Peonidin Petunidin	Borůvky Ostružiny Maliny Červené víno Jahody Čaj
<b>Isoflavony</b>		Genistein Daidzein Glycitein	Sójové mléko Sójová mouka Sójové boby

Pro charakterizaci jednotlivých tříd a jednotlivých flavonoidů je důležitý počet hydroxylových skupin a jejich umístění na základním flavonoidovém skeletu. Hydroxylové funkční skupiny, které se nachází na některém z kruhů A, B nebo C jsou místy, kde může docházet k navázání sacharidů, nebo zde může docházet k metylaci. V rostlinách a ve většině potravin se flavonoidy nachází ve formě glykosidů, ale i jiných konjugátů (s výjimkou flavanolů)<sup>20</sup>. Pokud dochází k tvorbě glykosidů, je glykosidická vazba umístěna nejčastěji na uhlíku 3 kruhu C nebo na uhlíku 5 či 7 kruhu A. Mezi sacharidy, které mohou být připojeny na strukturu flavonoidu, patří např. D-glukosa, L-rhamnosa, D-galaktosa, D-xylosa nebo L-arabinosa<sup>19</sup>.

Se strukturou flavonoidů, zejména se substitucí na kruhu C je spojená antioxidační aktivita těchto molekul. Flavonoly s plně substituovaným kruhem C mají výrazně vyšší antioxidační aktivitu než ostatní flavonoidy<sup>21</sup>. Kromě antioxidačních vlastností byly prokázány také vlastnosti protizánětlivé, antialergické, antikarcinogenní (obrázek 2) a antivirotické<sup>22</sup>. Flavonoidy, např. kaempferol, theaflavin nebo genistein mohou ovlivnit (zpomalit) přeměnu prokarcinogenů na karcinogeny tím, že inhibují enzymy I. fáze biotransformace, především enzymy CYP. Při inhibici jejich enzymové aktivity je tvořeno méně reaktivních molekul, které mohou interagovat s DNA. Flavonoidy jako jsou např. apigenin, galangin nebo směs flavonoidů obsažená v silymarinu mohou aktivovat (indukovat) enzymy II. fáze biotransformace a tímto způsobem může být usnadněna eliminace karcinogenů z těla<sup>23</sup>.



**Obrázek 2** – Některé látky ze skupiny flavonoidů, které blokují nebo potlačují karcinogenezi. Převzato z Moon a kol., 2006<sup>23</sup>.

## 2.2.2 Biologická dostupnost flavonoidů

Biologická dostupnost neboli biodostupnost může být definována jako zlomek přijaté živiny nebo sloučeniny, která se dostane do systémové cirkulace a dále do cílových orgánů, kde může uplatnit svůj biologický účinek. Jinými slovy to znamená, jak velká část přijatého množství, obecně polyfenolových sloučenin, je schopna uplatnit své pozitivní účinky v cílových tkáních<sup>24</sup>. Osud polyfenolických sloučenin po jejich požití je názorně zobrazen na obrázku 3.

Metabolické reakce, které zajišťují biologickou dostupnost flavonoidů, začínají již v ústní dutině<sup>25</sup>. Žvýkání hraje důležitou roli v transformaci potravin, protože mechanické působení narušuje strukturu potravin, tím umožňuje částečné uvolnění složek a zvyšuje plochu povrchu pro působení trávicích enzymů ve slinách<sup>25,26</sup>. Bylo zjištěno, že žvýkání a působení slin zvyšuje následně biodostupnost i v tenkém střevě<sup>27</sup>.

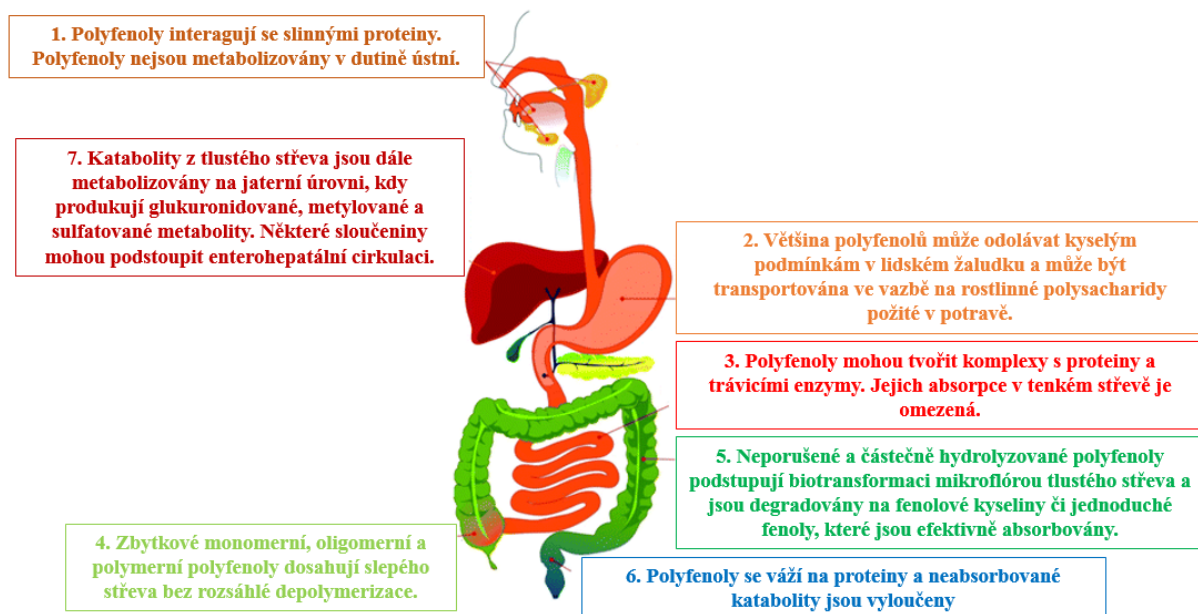
Absorpce flavonoidů z potravy závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech, jako jsou např. velikost molekuly, lipofilita nebo rozpustnost<sup>19</sup>. Způsob absorpce závisí zejména na struktuře flavonoidů; tj. zda jsou ve formě aglykonů nebo glykosidů. Aglykony mohou být absorbovány přímo v tenkém střevě bez předchozích chemických modifikací. Nicméně většina polyfenolických sloučenin je v potravinách přítomna ve formě glykosidů<sup>28,29</sup>. Glykosidy, které jsou hydrofilnější než odpovídající aglykony, nemohou procházet přímo buněčnou membránou enterocytů pasivní difúzí<sup>26</sup>.

U lidí je hydrolýza glykosidů zprostředkována enzymy, jako jsou laktasa-florizin hydrolasa (LFH) a cytosolická  $\beta$ -glukosidasa (CBG). LFH je enzym, který je přítomen v lumen tenkého střeva a je velmi reaktivní vůči flavonoidům-*O*- $\beta$ -D-glykosidům. CBG je enzym, který se nachází v epiteliálních buňkách<sup>24</sup>.

Po hydrolýze glykosidů dochází k pasivní difúzi výsledného aglykonu přes epiteliální buňky, což je podpořeno zvýšenou hydrofobicitou. Nicméně některé glykosylované flavonoidy, jako je např. quercetin-4'-*O*-glukosid, mohou být aktivně transportovány do epiteliálních buněk přes aktivní glukosový transportér závislý na sodíku (SGLT1)<sup>24,30</sup>.

Na transcelulárním průchodu mnoha sloučenin, včetně flavonoidů z potravy střevní stěnou, se podílí membránově vázané transportní proteiny rodiny ABC („adenosine triphosphate-binding cassette“). Tato skupina proteinů je tedy zapojena do effluxu bioaktivních látek buď přes bazolaterální membránu do krevního řečiště, který usnadňuje absorpci, nebo jsou tyto látky transportovány zpět do střevního lumen, čímž se snižuje jejich biologická dostupnost<sup>31</sup>.

Absorbované flavonoidy jsou vázány na plazmové proteiny (např. albumin) a následně transportovány do jater portální žilou, kde podstupují rozsáhlou metabolickou přeměnu za tvorby různých konjugovaných forem, jako jsou glukuronidy, sulfáty nebo metylované deriváty<sup>32</sup>. Neabsorbované flavonoidy pronikají do tlustého střeva, kde mohou být značně degradovány prostřednictvím enzymů střevní mikroflory<sup>33</sup>.



**Obrázek 3** – Osud polyfenolických látek po požití potravy. Převzato ze *Zanotti a kol., 2014*<sup>34</sup>.

## 2.2.3 Přírodní produkty s obsahem flavonoidů

### 2.2.3.1 Klikva velkoplodá (*Vaccinium macrocarpon*)

Klikva velkoplodá neboli americká brusinka (*Vaccinium macrocarpon*), ale také evropská brusinka (*Vaccinium oxycoccos*) patří mezi dva hlavní druhy brusinky z čeledi *Ericaceae*. Klikva velkoplodá (*Vaccinium macrocarpon*), nesprávně brusinka, je původním druhem Severní Ameriky patřící do čeledi *Ericaceae* (obrázek 4), která je bohatým zdrojem fenolických kyselin (např. kyseliny benzoové, hydroxyskořicové a elagové) a flavonoidů (antokyanů, flavonolů a flavanolů); je složena z 88 % vodou a obsahuje ve vysokém množství vitamín C (200 mg/kg čerstvého ovoce)<sup>35,36</sup>. Brusinka (angl. „cranberry“) je název, který pochází z angl. „crane berry“ (jeřábí bobule). Je to z důvodu toho, že se malé růžové květy objevující se na jaře podobají hlavě a krku jeřába kanadského, který se často živí

bobulemi této rostliny<sup>36,37</sup>. *Vaccinium macrocarpon* byla již v historii používána severoamerickými indiány k léčbě infekcí dolních cest močových<sup>36</sup>. V současné době se stala také velmi populární jako doplněk stravy, a to z důvodu jeho potenciálních pozitivních účinků na zdraví pacienta. Bobulky brusinek se také využívají v alternativní medicíně, například jako antipyretikum. Dále je známo, že brusinkový džus je neúčinnější při snižování adheze *Escherichia coli* a *Enterococcus faecalis*, které jsou zodpovědné za více než 85 % infekcí močových cest<sup>38,39</sup>. Brusinky jsou rovněž používány v prevenci kardiovaskulárních onemocnění, jejich pozitivní efekt byl popsán i při léčbě různých druhů rakoviny nebo při léčbě žaludečních vředů vyvolaných *Helicobacter pylori*<sup>35</sup>. Nedávný výzkum prokázal, že konzumace brusinek působí dokonce i proti rozvoji obezity<sup>40</sup>.



**Obrázek 4** – Plody klikvy velkoplodé (*Vaccinium macrocarpon*).

#### 2.2.3.2 Zelený čaj (*Camellia sinensis*)

Zelený čaj (*Camellia sinensis*) z čeledi *Theaceae* je jeden z nejkonsumovanějších nápojů na světě (obrázek 5). Konzumace čaje je spojována s nízkým výskytem různých chronických patologických stavů nebo rakoviny<sup>41</sup>. Převládající složkou zeleného čaje jsou polyfenoly, které zahrnují flavonoly, flavony a flavanoly (neboli flavan-3-oly). Z těchto polyfenolů zaujímají 60–80 % flavan-3-oly, nazývané též katechiny. Nejvýznamnějším katechinem v zeleném čaji je epigalokatechin-3-galát (EGCG), který představuje 50–80 % celkového obsahu katechinů. EGCG je také považován za nejvíce biologicky aktivní složku zeleného čaje. Mezi minoritní katechiny v zeleném čaji patří epikatechin-3-galát (ECG), epigalokatechin (EGC), epikatechin (EC) a katechin (C)<sup>42</sup>. Katechiny jsou syntetizovány během dne v čajových listech; s teplotou se rychlost syntézy zvyšuje. Při průmyslovém zpracování s cílem izolovat účinné látky jsou z listů zeleného čaje katechiny čištěny nejprve vodou a poté etylacetátem; následuje sloupcová chromatografie, která využívá vodu/alkohol



k eluování katechinů. Výsledný prášek katechinů, nazývaný Polyfenon® E, který obsahuje okolo 90 % celkového obsahu katechinů, je složen z EGCG > 65 %, EC < 10 %, ECG < 10 %, EGC < 10 % a dalších stopových derivátů katechinů. Polyfenon® E je ochrannou známkou Mitsui Norin Co., Ltd.<sup>43</sup>. Bylo prokázáno, že čaj nebo katechiny v něm obsažené modulují různé enzymy metabolizující xenobiotika jak ve studiích *in vitro*, tak *in vivo*<sup>41,44</sup>.



**Obrázek 5** – Listy zeleného čaje (*Camellia sinensis*).

#### 2.2.3.3 Brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*)

Brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*) je přizemní keř z čeledi *Ericaceae* (obrázek 6), který je původním evropským druhem. Je to příbuzný, avšak odlišný druh od odrůdy severoamerické borůvky (*Vaccinium corymbosum*). Borůvky obsahují řadu fenolických sloučenin, které zahrnují flavonoly (kvercetin, katechiny), třísloviny, fenolové kyseliny. Nejvýznamnější pozitivní efekt se však připisuje antokyanům<sup>45</sup>. Ve srovnání s jinými typy bobulovitých plodů, jako jsou jahody, brusinky, bezinky, višně a maliny, mají borůvky mnohem vyšší obsah těchto flavonoidů<sup>46-48</sup>. Antokyaniny dávají borůvce svou modrou barvu a jsou považovány za klíčové bioaktivní látky zodpovědné za mnoho pozitivních účinků na zdraví člověka. Bylo zjištěno, že borůvky mají příznivé účinky na kardiovaskulární systém<sup>49</sup>, používají se také při léčbě průjmů, menstruačních bolestí či křečových žil<sup>50</sup>. Konzumují se čerstvé, mražené i sušené, ale také ve formě zavařenin, džemů, džusů nebo doplňků stravy (v tekuté nebo práškové formě)<sup>51</sup>.



**Obrázek 6** – Plody brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus*).

#### 2.2.3.4 Ibišek súdánský (*Hibiscus sabdariffa*)

Ibišek súdánský (*Hibiscus sabdariffa*) z čeledi *Malvaceae* je jednoletá bylina původem z tropické Afriky a dosahuje výšky až dvou metrů. Tato rostlina je známá nejen pro přípravu nápojů nebo jako okrasná květina, ale také pro své léčivé vlastnosti<sup>52</sup>. Vysušené květy obsahují flavonoid gosypetin, hibiscetin a sabdaretin. Je zde ale přítomno i malé množství antokyanů (delfinidin-3-*O*-glukosidu a kyanidin-3-*O*-glukosidu) a antokyanidinu delfinidinu<sup>53</sup>. Antokyany v ibišku mají antioxidační, hypocholesterolemické a hepatoprotektivní vlastnosti<sup>54</sup>. Odvary z ibišku jsou velmi populární, při již zmíněné přípravě domácích osvěžujících nápojů, známých jako „Rosselle“ v Mexiku, „Zobo“ v Nigérii a „Karkade“ v Německu; používají se také v lidovém léčitelství jako projímadlo. Zvláště pozoruhodné jsou vědecké poznatky o diuretickém a antihypertenzním potenciálu<sup>54,55</sup>. U pacientů, kteří se léčí antihypertenzivy, není neobvyklé, že souběžně používají nápoje z ibišku súdánského pro větší podporu léčby. Avšak netuší možné interakce léčiva spolu s touto bylinou.

Mladé listy a stonky se přidávají buď syrové, nebo vařené do salátů, ale také do kari koření. Tyto části rostliny mají kyselou příchuť podobnou chuti rebarbory. Čerstvý květ ibišku (obrázek 7) se používá syrový do salátů nebo se vaří a přidává se jako příchuť do koláčů. Květ je bohatý na kyselinu citronovou a pektin, a proto je využíván i při výrobě želé, marmelád apod. Pro svou červenou barvu a chuť je přidáván do bylinných čajů<sup>52</sup>.



**Obrázek – 7** Květ ibišku súdánského (*Hibiscus sabdariffa*).

#### 2.2.3.5 Zlatobýl obecný (*Solidago virgaurea*)

Léčivou rostlinou, která je zajímavá nejen z pohledu biologických účinků, je zlatobýl obecný (také celík zlatobýl, *Solidago virgaurea*) z čeledi *Asteraceae*, který se jako jediný druh vyskytuje v České republice<sup>56-58</sup>. Rod *Solidago* obsahuje flavonoidy, fenolové kyseliny a jejich glykosidy, polysacharidy a další sloučeniny. Sekundární metabolity, zejména flavonoidy a fenolický diglukosid – leiokarposid mají pozitivní vliv na diurézu<sup>59</sup>. Rostliny tohoto druhu mají kromě diuretických účinků také choleretické, antiseptické a hojící se účinky<sup>58</sup>. Tato rostlina se používala jako léčivo již ve starověku<sup>56,57</sup>. Nať zlatobýlu obecného (*Solidaginis virgaureae herba*) se využívala zejména při onemocnění močových cest, chorobách prostaty a nefrolitiáze; květy a listy ze zlatobýlu (obrázek 8) naopak jako přírodní žluté barvivo<sup>58</sup>. *Solidaginis virgaureae herba* je známá tím, že vykazuje nejen protizánětlivé a diuretické účinky, ale i nově popsané účinky antimikrobiální, protinádorové, sedativní a hypotenzní<sup>56,57</sup>.



**Obrázek 8** – Květy zlatobýlu obecného (*Solidago virgaurea*).

## 2.3 METABOLISMUS CIZORODÝCH LÁTEK (XENOBIOTIK)

### 2.3.1 Úvod do metabolismu xenobiotik

Pojem xenobiotikum je odvozeno z řeckého slova „*xenos*“ (cizí) a „*bios*“ (život)<sup>60</sup>. Cizorodé látky (xenobiotika) jsou chemické látky, které se mohou dostat do organismu buď náhodně, nebo cíleně. Mezi látky, které se dostávají do organismu cíleně, patří zejména léčiva. Cizorodé látky, které jsou přítomny v životním prostředí např. produkty průmyslové výroby, látky přítomné ve výfukových plynech automobilů, pesticidy, sekundární rostlinné metabolity či mykotoxiny, konzumujeme většinou nezávisle na naší vůli<sup>61</sup>. Při cíleném podávání xenobiotika-léčiva je cesta vstupu zvolena na základě klinického stavu pacienta, v závislosti na cílové tkáni nebo orgánu a také na chemické povaze daného léčiva. Například molekuly, které jsou vysoce ionizované, nepronikají snadno přes gastrointestinální trakt, a proto by měly být podávány parenterálně<sup>62</sup>. Xenobiotika, jejichž hlavním procesem absorpce je pasivní difúze přes cytoplazmatickou membránu, jsou obecně rozpustné v tucích, a proto se z organismu nevyučují snadno<sup>60</sup>. Lze říci, že vylučování xenobiotik závisí na jejich polaritě. Důležitá je tedy přeměna látek nepolárních na látky ve vodě rozpustné procesem známým pod pojmem biotransformace.

Biotransformace xenobiotik je hlavním mechanismem pro udržení homeostázy organismu během expozice cizorodým látkám. Tento proces je katalyzován především jaterními enzymy, ale i enzymy jiných tkání. Obecně platí, že biotransformace xenobiotik se účastní omezený počet enzymů se širokou substrátovou specifitou. Z tohoto důvodu mohou enzymy metabolizující xenobiotika metabolizovat také velké množství endogenních látek (např. aceton, bilirubin, mastné kyseliny, žlučové kyseliny, steroidní hormony, ale i některé vitamíny)<sup>61</sup>.

Přítomnost xenobiotika v organismu může mít na biologické systémy pozitivní i negativní vliv. Konečný efekt je závislý na chemických i fyzikálně-chemických vlastnostech daného xenobiotika. Některá xenobiotika po chemické přeměně projeví svůj toxický nebo kancerogenní účinek. To znamená, že pokud by chemické látky nebyly převedeny na reaktivní metabolity pomocí enzymů metabolizující cizorodé látky, byly by podstatně méně toxické. Ve většině případů však biotransformace sníží toxicitu xenobiotika, v případě léčiv ukončí farmakologické účinky.

Biotransformační proces zahrnuje reakce I. fáze katalyzované především formami CYP a reakce II. fáze katalyzované mimo jiné glutathion S-transferasami a UDP-glukuronosyltransferasami. Pomocí těchto dvou fází vzniká nejčastěji stabilnější a ve vodě rozpustný metabolit, který je následně vhodným substrátem pro transportní proteiny, které hrají významnou roli v influxu a effluxu cizorodých látek na buněčné úrovni. Tento proces je nazýván také jako III. fáze biotransformace<sup>63</sup>. Transportní proteiny hrají klíčovou roli ve farmakokinetice, a to z toho důvodu, že umožňují migraci hydrofilních molekul, které nemohou proniknout do buněčných membrán. Jsou známy dvě hlavní rodiny transportních proteinů: ABC a SLC (z angl. „solute carriers“)<sup>64</sup>.

Mezi transportní proteiny patřící do rodiny ABC můžeme zařadit zejména P-glykoprotein (P-gp), kde P značí permeabilitu a protein spojený s mnohočetnou lékovou rezistencí (MRP2). Oba tyto proteiny využívají energii z hydrolýzy adenosintrifosfátu (ATP) potřebnou k přenosu různých substrátů přes buněčnou membránu<sup>65,66</sup>. Transportéry rodiny ABC patří do jedné z největších superrodin proteinů, které buď importují, nebo exportují širokou škálu substrátů, jako jsou např. aminokyseliny, ionty, cukry, lipidy a různá xenobiotika<sup>65</sup>.

Transportní proteiny rodiny SLC jsou velmi důležité při přenosu iontů a organických látek přes biologické membrány. Mezi transportéry rodiny SLC patří především transportní proteiny známé jako OAT, což jsou menší proteiny, které přenáší více hydrofilní organické anionty; OATP představují velké polypeptidové transportéry organických aniontů a OCT jsou proteiny, které transportují malé organické kationty<sup>67,68</sup>.

### 2.3.2 CYP v metabolismu xenobiotik (I. fáze detoxikace)

Nejdůležitějšími enzymy metabolizujícími xenobiotika a patřícími do I. fáze biotransformace jsou CYP. CYP patří do rodiny proteinů obsahující hem; tyto enzymy můžeme nalézt od bakterií až k lidskému organismu<sup>69,70</sup>.

Cílem reakcí I. fáze je především přeměna xenobiotika na polárnější metabolit. Tato přeměna je uskutečněna buď zavedením polární funkční skupiny (např. hydroxylací) do molekuly, nebo uvolněním („osvobozením“) (např. demethylací nebo jinými reakcemi) již přítomných funkčních skupin (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -COOH)<sup>61,62</sup>. Nejdůležitější reakce I. fáze metabolismu spolu s příslušnými enzymy a jejich buněčným umístěním jsou zobrazeny v tabulce 3.

**Tabulka 3** – Hlavní reakce I. fáze biotransformace xenobiotik. Převzato z *Parkinson, 2001*<sup>61</sup>.

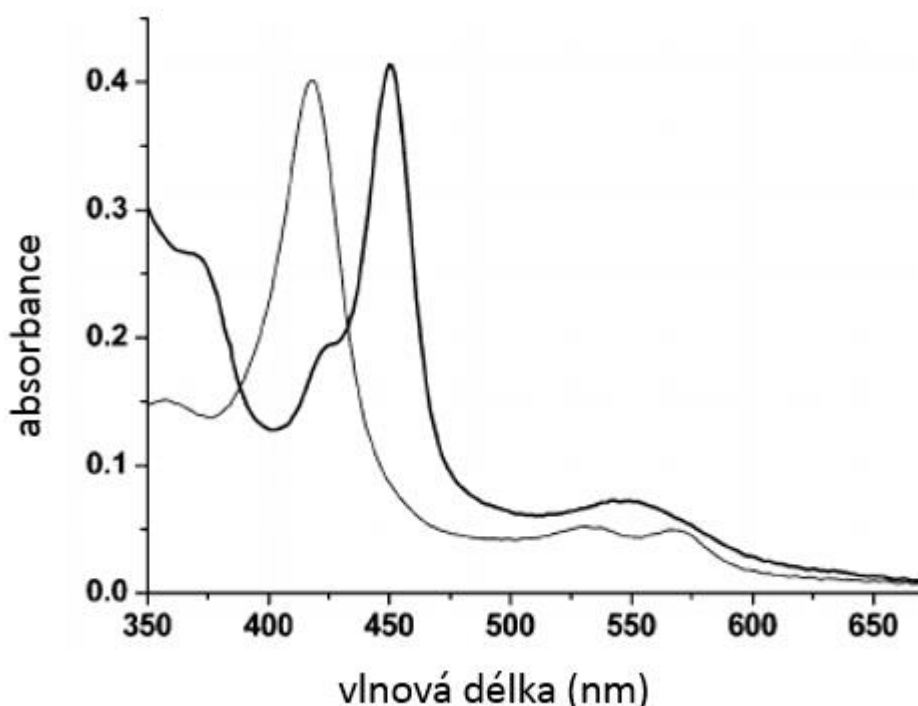
Reakce	Enzymy	Lokalizace
<b>hydrolýza</b>	esteráza	mikrosomy, cytosol, lysozomy, krev
	peptidáza	krev, lysozomy
	epoxidhydroláza	mikrosomy, cytosol
<b>redukce</b>	azo- a nitro-redukce	mikroflóra, mikrosomy, cytosol
	redukce karbonylové skupiny	cytosol, krev, mikrosomy
	redukce disulfidové vazby	cytosol
	redukce sulfoxidové skupiny	cytosol
	redukce chinonu	cytosol, mikrosomy
	redukční dehalogenace	mikrosomy
<b>oxidace</b>	alkoholdehydrogenáza	cytosol
	aldehyddehydrogenáza	mitochondrie, cytosol
	aldehydoxidáza	cytosol
	xantinoxidáza	cytosol
	monoaminoxidáza	mitochondrie
	diaminoxidáza	cytosol
	prostaglandin H syntáza	mikrosomy
	flavin monooxygenázy	mikrosomy
	<b>cytochrom P450</b>	mikrosomy

CYP byl poprvé charakterizován v roce 1958 M. Klingenbergem jako pigment v mikrosomální frakci připravené z potkaních jater<sup>71</sup> a D. Garfinkelem v prasečích jaterních mikrosomech<sup>72</sup>. O několik let později popsali T. Omura a R. Sato tento pigment jako hemoprotein<sup>73</sup>. Pigment vykazuje absorpční pás s maximem při vlnové délce 450 nm; odsud pochází označení P450 neboli Pigment 450 (obrázek 9).

Absorpční pás při vlnové délce 450 nm je charakteristický pro komplex redukované formy CYP s oxidem uhelnatým. Tato forma vznikne po redukci centrálního atomu železa ( $\text{Fe}^{3+}$ ) v hemu. *In vitro* lze provést redukci mikrosomálního CYP např. přidáním dithioničitanu sodného. Redukovaná forma s oxidem uhelnatým poskytuje komplex ( $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ ), který vykazuje absorpční pás v rozmezí 380–455 nm. Samotná redukovaná forma absorbuje okolo 412–415 nm, oxidovaná forma nejčastěji okolo 417 nm. Poloha absorpčního pásu (podle objevitele nazývaného Soretovým pásem) se může ještě dále poněkud měnit

v závislosti např. na spinovém stavu centrálního atomu železa hemu; nikdy ale o 30 nm, jako je tomu při vzniku  $\text{Fe}^{2+}$ -CO komplexu<sup>74</sup>.

Důvodem pro tento charakteristický posun absorpčního maxima je, že v CYP je distribuce elektronové hustoty ovlivněna vazbou hemového železa na protein přes atom síry cysteinu, který je ale ve formě aniontu (thiolátu). U ostatních hemoproteinů, kde je hem vázán vazbou Fe-N (z histidinu) k tomu nedochází a tyto proteiny absorbují ve všech stavech ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ -CO) mezi 390–430 nm<sup>70</sup>.



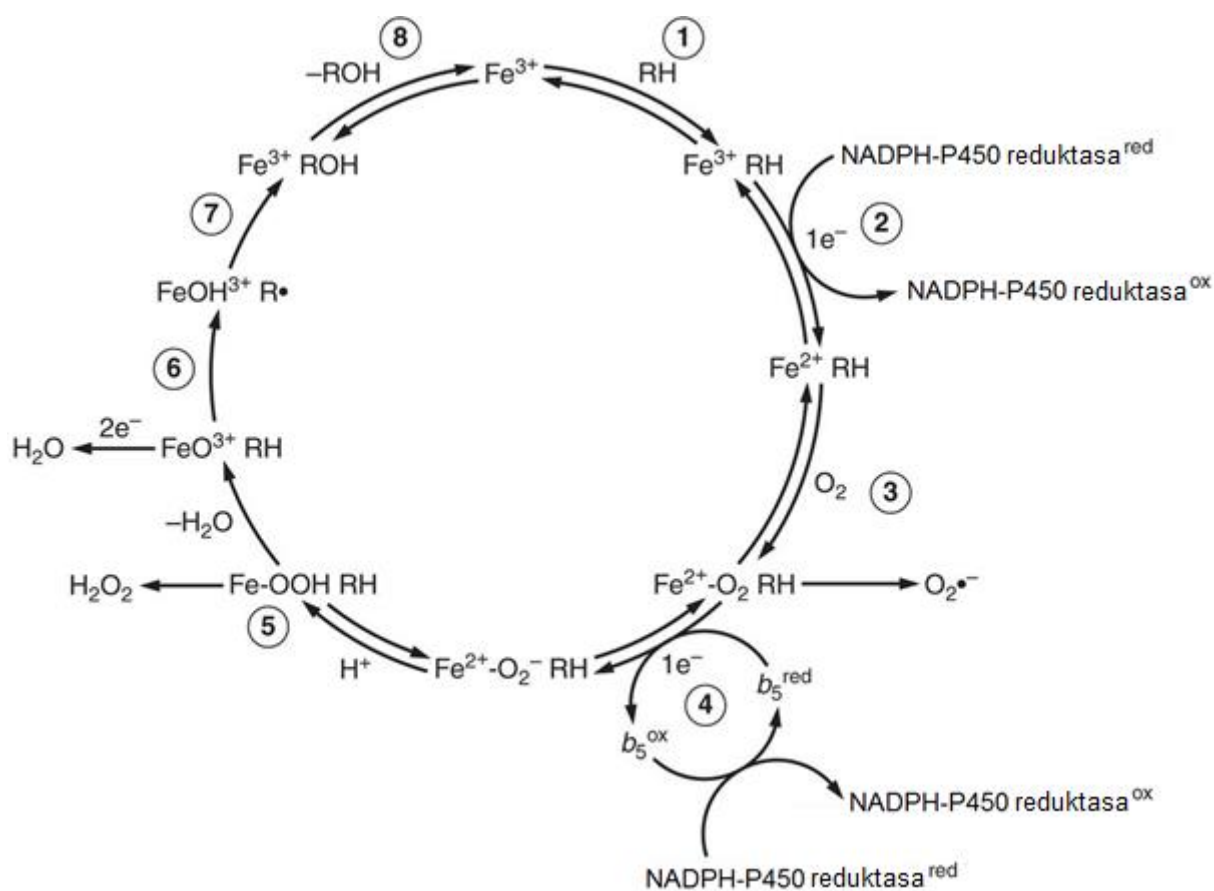
**Obrázek 9** – Absorpční spektra CYP a jeho  $\text{Fe}^{2+}$ -CO komplexu. Typické absorpční spektrum pro CYP51B1 z *Mycobacterium tuberculosis* je zobrazeno v oxidovaném ( $\text{Fe}^{3+}$ ) stavu (tenká čára,  $A_{\text{max}} = 418$  nm) a v redukováném ( $\text{Fe}^{2+}$ -CO komplex) stavu (silná čára,  $A_{\text{max}} = 450$  nm). Převzato z *Munro a kol., 2007*<sup>75</sup>.

CYP jsou členy skupiny enzymů nazývaných monooxygenasy nebo také oxidasy se smíšenou funkcí (protože vzniká hydroxylovaný substrát a molekula vody). Ve většině případů CYP katalyzují reakce oxidativní přeměny chemické látky (obrázek 10)<sup>74</sup>. CYP je zapojen do cyklické série reakcí<sup>75-77</sup>, kde v prvním kroku se substrát (RH) váže s oxidovanou formou CYP a vytvoří se komplex  $\text{RH}-(\text{Fe}^{3+})$ . V dalším kroku dochází k jednoelektronové redukci železa za vzniku  $\text{RH}-(\text{Fe}^{2+})$ . Zdrojem elektronů je zde NADPH-P450 reduktasa. Ve třetím kroku se naváže kyslík a vzniká ternární komplex  $\text{RH}-\text{Fe}^{2+}(\text{O}_2)^*$ , který je redukován dalším

elektronem. Následuje rozštěpení vazby O-O za vzniku reaktivního oxidantu a molekuly vody. (V pátém kroku může rovněž vznikat za určitých okolností peroxid vodíku, tato cesta ale nevede k hydroxylaci substrátu). Dvouelektronovou výslednou reakci lze zapsat podle schématu:



Vzniká tedy hydroxylovaný produkt, molekula vody a regeneruje se CYP<sup>62</sup>.

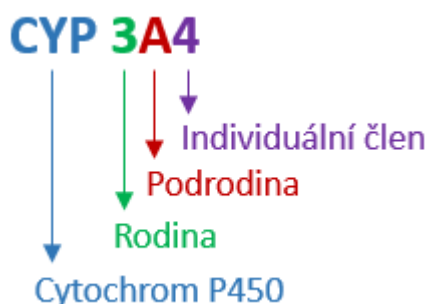


**Obrázek 10** – Schéma oxidačních reakcí katalyzovaných CYP. RH, substrát; ROH, produkt. Převzato z *Dorokhov a kol., 2015*<sup>78</sup>.



### 2.3.3 Nomenklatura CYP

V lidském genomu bylo nalezeno padesát sedm genů pro různé formy CYP<sup>79</sup>. Z důvodu přehlednosti bylo důležité zavést systematické názvosloví, které bylo zavedené Nebertem a kol.<sup>80</sup>. CYP jsou vhodným způsobem uspořádány do rodin a podrodin na základě podobnosti aminokyselinové sekvence. Názvy CYP jsou uváděny v pořadí číslo-písmeno-číslo; první číslo označuje rodinu CYP, jehož označení vychází z 40% nebo vyšší podobnosti aminokyselinové sekvence; písmeno označuje podrodinu CYP, která je založena na podobnosti aminokyselinové sekvence z 55 % a vyšší; konečné číslo představuje individuální člen CYP v rámci rodiny/podrodiny (obrázek 11)<sup>70</sup>.



**Obrázek 11** – Systematické názvosloví CYP. CYP jsou označeny rodinou ( $\geq 40\%$  podobnost aminokyselinové sekvence); podrodinou ( $\geq 55\%$  podobnost aminokyselinové sekvence) a individuálním členem v rámci podrodiny. Převzato z Furge a kol., 2006<sup>70</sup>.

### 2.3.4 Přehled forem CYP důležitých pro metabolismus xenobiotik včetně léčiv u člověka

CYP jsou nezbytné pro detoxikaci xenobiotik a také pro metabolismus mnoha léčiv<sup>79,81</sup>. Lidské CYP se účastní biotransformace většiny xenobiotik, včetně více než dvou třetin všech léčiv, u kterých byl metabolismus poznán. Mezi nejdůležitější CYP, které se účastní metabolismu léčiv, patří zejména CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 a CYP3A5<sup>79,82</sup>. Většina CYP se v lidském organismu vyskytuje převážně v játrech<sup>79</sup>. Nicméně tyto enzymy jsou přítomny také v gastrointestinálním traktu, plicích, ledvinách, srdci, mozku a v jiných

orgánech<sup>81</sup>. Nejrozšířenější formou CYP, která se vyskytuje především v lidských játrech a ve střevě a která metabolizuje téměř polovinu všech léčiv, je CYP3A4<sup>69</sup>.

#### 2.3.4.1 Podrodina CYP1A

Podrodina lidského CYP1A zahrnuje dva hlavní členy: CYP1A1 a CYP1A2<sup>69</sup>. Forma CYP1A1 se vyskytuje převážně extrahepatálně; v játrech se exprimuje v důsledku indukce např. polycyklickými aromatickými sloučeninami, které jsou často jejich substráty. Naopak CYP1A2 je exprimována převážně v lidských játrech<sup>79</sup>, v extrahepatálních tkáních vůbec ne nebo minimálně<sup>83</sup>. CYP1A2 hraje v metabolismu léčiv významnější roli než CYP1A1<sup>84</sup>. Lidský jaterní CYP1A2 tvoří přibližně 13 % z celkového obsahu jaterních CYP a je zodpovědný za metabolismus ~ 10 % klinicky užívaných léčiv<sup>79,83</sup>. CYP1A2 metabolizuje různé substráty např. kofein<sup>85</sup> a teofylin<sup>86</sup>.

#### 2.3.4.2 Podrodina CYP2A

Podrodina CYP2A u lidí obsahuje tři členy: CYP2A6, CYP2A7 a CYP2A13<sup>79</sup>. CYP2A6 je nejdůležitější enzym z této podrodiny, který se účastní metabolismu léčiv. Je exprimován především v játrech<sup>87</sup> a zaujímá zde ~ 4 % všech CYP. Tato forma je zodpovědná za metabolismus přibližně 3 % běžně užívaných léčiv<sup>79</sup>. Nejvýznamnějšími substráty CYP2A6 jsou kumarin a nikotin<sup>88-90</sup>. CYP2A6 se účastní také metabolismu bilirubinu, jakožto endogenního substrátu<sup>91</sup>.

#### 2.3.4.3 Podrodina CYP2B

Do podrodiny CYP2B u lidí patří enzym CYP2B6, který významně přispívá k metabolismu léčiv<sup>92</sup>. Tento enzym metabolizuje asi 8 % klinicky užívaných léčiv<sup>79</sup>. Mezi léčiva, která jsou metabolizována CYP2B6 patří bupropion, petidin, propofol a ketamin<sup>93</sup>. CYP2B6 se podílí z malé části také na metabolismu nikotinu<sup>94</sup>. Tento enzym zaujímá ~ 3–6 % z celkového obsahu CYP v játrech<sup>93</sup>.

#### 2.3.4.4 Podrodina CYP2C

Podrodina lidského CYP2C se skládá z následujících členů: CYP2C8, CYP2C9 a CYP2C19. Tyto formy podrodiny CYP2C zaujímají v játrech alespoň 20 %. Forma CYP2C8 není v metabolismu léčiv moc důležitá<sup>69,79</sup>. Nicméně v metabolismu léčiv jsou další formy, CYP2C9 a CYP2C19, zastoupeny z 10 %, respektive z 5 %<sup>95</sup>. Všechny formy, které jsou zahrnuty v této podrodině disponují genetickým polymorfismem<sup>96</sup>. CYP2C19 byl první enzym, jehož genetický polymorfismus byl objeven v případě antikonvulziva mefenytoinu<sup>79</sup>. CYP2C19 metabolizuje různá terapeutika, jako jsou antikonvulziva mefenytoin, felbamát<sup>96,97</sup>; antidepressiva amitriptylin, imipramin<sup>79,96,98</sup>; benzodiazepiny<sup>79</sup>; protidestickový lék klopidogrel<sup>79</sup> a jiné. CYP2C9 je hlavním enzymem podrodiny CYP2C v lidských játrech. Tato forma metabolizuje klinicky důležitá terapeutika, včetně antidiabetik (např. tolbutamid, glipizid), antikonvulziv (např. fenytoin), antikoagulancií (např. warfarin) a mnoho protizánětlivých léčiv (např. ibuprofen)<sup>79,95,96</sup>.

#### 2.3.4.5 Podrodina CYP2D

Jediný gen kódující protein v podrodině CYP2D je enzym CYP2D6<sup>79</sup>. Tento enzym je exprimován v lidských játrech a představuje pouze asi 4 % z celkového zastoupení CYP<sup>83</sup>. CYP2D6 je charakterizován jako polymorfní enzym metabolizující léčiva<sup>99</sup>. Genetický polymorfismus zapříčiňuje přítomnost tří hlavních fenotypů oxidativního metabolismu, které jsou rozděleny do následujících skupin: pomalí metabolizátoři (PM), rychlí metabolizátoři (RM) a ultrarychlí metabolizátoři (UM)<sup>69,79</sup>. Tento enzym metabolizuje okolo 20 % léčiv, jako jsou antidepressiva a antipsychotika (např. nortriptylin, paroxetin, fluoxetin), neuroleptika (např. haloperidol, zyklopentixol), antiarytmika (např. propafenon, mexiletin)<sup>79,83,99</sup>.

#### 2.3.4.6 Podrodina CYP2E

Podrodina CYP2E zahrnuje u savců pouze gen CYP2E1. Lidský CYP2E1 tvoří 3 % z celkového obsahu jaterních CYP. CYP2E1 se podílí na metabolismu pouze 5 % léčiv. O tomto enzymu je známo, že se účastní především metabolismu etanolu<sup>69,79</sup>. Kromě metabolismu etanolu, jakožto induktoru CYP2E1 se tento enzym účastní také metabolismu acetonu a jiných známých induktorů CYP2E1<sup>69,79</sup>. Dlouhodobé vystavení sloučeninám

(ve velkém množství), které indukují CYP2E1, může zapříčinit tvorbu volných radikálů, peroxidaci lipidů a poškození jater<sup>100</sup>. Je rovněž znám svým podílem na přeměně metabolitu paracetamolu na reaktivní *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin, který je příčinou toxicity tohoto léčiva<sup>62</sup>.

#### 2.3.4.7 Podrodina CYP3A

Podrodina CYP3A se u lidí skládá ze čtyř genů: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 a CYP3A43<sup>79</sup>. CYP3A4 spolu s CYP3A5 jsou enzymy, které se během dospělosti hojně vyskytují v lidských játrech a gastrointestinálním traktu. Na druhou stranu CYP3A7 se exprimuje v játrech plodu a v děložní sliznici. Nicméně množství tohoto enzymu v prvních týdnech života klesá<sup>101</sup>. Funkce jaterního CYP3A43 není dosud známa<sup>102,103</sup>. CYP3A4 je nejdůležitější formou nezbytnou pro detoxikaci xenobiotik a metabolismus většiny léčiv<sup>69</sup>. Tato forma tvoří (bez příspěvku indukce např. barbituráty nebo rifampicinem) asi 30 % celkových jaterních CYP<sup>79</sup>. Je také zodpovědná za několik klinicky významných lékových interakcí (např. interakcí statinů, azolů a antivirotik)<sup>84</sup>. Aktivní místo CYP3A4 je velké a flexibilní, může vázat a metabolizovat mnoho lipofilních sloučenin, jako jsou imunosupresiva (např. cyklosporin A, takrolimus), protirakovinné léky (např. taxol) a mnoho dalších<sup>62,79</sup>. Pro stanovení aktivity CYP3A4 existuje několik specifických substrátů, z nichž nejdůležitější jsou bezesporu testosteron<sup>104</sup> a midazolam<sup>102</sup>.

#### 2.3.5 Mezidruhové srovnání jednotlivých forem CYP se zaměřením na člověka, myš a potkana

Farmakogenetické odchylky, které jsou spojeny se změnami v aminokyselinové sekvenci, se podílí na některých interindividuálních rozdílech v metabolismu zprostředkovaného CYP u lidí<sup>105</sup>. Cílem experimentální farmakologie je pochopit molekulární mechanismy metabolismu léčiv<sup>106</sup>, abychom mohli snáze předpovídat vlastnosti nových sloučenin u lidí. V preklinickém vývoji nových léčiv bývají běžně užívány zvířecí modely. Je však důležité si uvědomit, že lidé se od zvířat liší, a to platí rovněž, pokud jde o formy CYP, jejich struktury, expresi a katalytickou aktivitu enzymů metabolizujících léčiva<sup>83,107</sup>.

### 2.3.5.1 Podrodina CYP1A

Podrodina CYP1A, která se skládá ze dvou členů (CYP1A1 a CYP1A2), si zachovává své postavení mezi jednotlivými druhy (tabulka 4). Tato podrodina u myši a potkanů vykazuje vyšší než 80% podobnost k lidem<sup>83</sup>. Jejich substráty jsou společné u všech druhů. Jedná se převážně o planární aromatické uhlovodíky. Pro aktivitu enzymu CYP1A1/2 je charakteristická *O*-deetylace 7-etoxyresorufinu, avšak existují i jiné významné markery aktivit (*O*-deetylace fenacetinu, 4-hydroxylace acetanilidu a *N*-hydroxylační reakce několika heterocyklických aminů)<sup>108</sup>.

CYP1A1 je exprimován v lidských, myších a potkaních játrech ve velmi malém množství a je, jak bylo již uvedeno u lidské formy, především extrahepatálním enzymem, který je přítomný především ve střevě, plicích, placentě a ledvinách<sup>83,109</sup>. Na druhou stranu se CYP1A2 nachází převážně v játrech a vůbec ne nebo pouze slabě je exprimován v extrahepatálních tkáních u člověka<sup>109</sup>, myši a potkana<sup>83</sup>.

### 2.3.5.2 Podrodina CYP1B

U lidí i zvířecích druhů je jediným enzymem této podrodiny CYP1B1 (tabulka 4)<sup>83</sup>. CYP1B1 je exprimován ve většině orgánů, včetně jater, srdce, ledvin, plic, placenty, prostaty a mozku<sup>109</sup>. Tento enzym se vyskytuje v mnohem vyšším množství v nádorových buňkách v porovnání s okolní normální tkání<sup>83</sup>.

### 2.3.5.3 Podrodina CYP2A

Podrodina CYP2A u lidí zahrnuje formy CYP2A6, CYP2A7 a CYP2A13 (tabulka 4). CYP2A6 se vyskytuje především v lidských játrech, zatímco ostatní formy podrodiny CYP2A u lidí jsou v játrech exprimovány v mnohem nižším množství. Lidský CYP2A6 vykazuje často odlišnou substrátovou specifitu v porovnání s enzymy CYP2A u živočišných druhů<sup>83</sup>.

U myši patří do této podrodiny čtyři formy CYP: CYP2A4, CYP2A5, CYP2A12 a CYP2A22. CYP2A4 a CYP2A5 se liší pouze 11 aminokyselinami<sup>110</sup>. CYP2A5 se nachází zejména v játrech, ledvinách, plicích, mozku a tenkém střevě<sup>111</sup>. Tato forma katalyzuje 7-hydroxylaci kumarinu a tím se podobá jeho lidskému ortologu CYP2A6<sup>112</sup>.

V podrodině CYP2A jsou u potkanů zahrnuty CYP2A1, CYP2A2 a CYP2A3. Aminokyselinová sekvence CYP2A1/2 je z 60 % podobná lidskému CYP2A6. Na rozdíl od lidí jsou u potkanů endogenní steroidy substráty CYP2A. Například CYP2A1 katalyzuje 7 $\alpha$ -hydroxylaci testosteronu, zatímco CYP2A2 je zodpovědný za 15 $\alpha$ - a 7 $\alpha$ -hydroxylaci testosteronu<sup>83</sup>. Lidský CYP2A6 tyto reakce nekatalyzuje.

#### 2.3.5.4 Podrodina CYP2B

U zvířecích druhů bylo identifikováno několik forem CYP2B (tabulka 4). U lidí jsou v podrodině CYP2B zahrnuty CYP2B6 a CYP2B7. První forma je exprimována v játrech a některých extrahepatálních tkáních, zatímco exprese mRNA genu *Cyp2b7* byla nalezena v plicích<sup>83</sup>.

Mezi nejdůležitější formy CYP2B u myši můžeme zařadit CYP2B9 a CYP2B10. mRNA *Cyp2b10* byla stanovena v játrech a ve střevě, avšak zdá se, že jeho exprese je mnohem vyšší v duodenu než v játrech<sup>113</sup>.

U potkanů se vyskytují tři formy CYP, z nichž CYP2B1 a CYP2B2 jsou strukturně příbuzné enzymy s 97% identitou. Tyto formy mají podobnou substrátovou specifitu. Oba enzymy jsou konstitutivně exprimovány v játrech a extrahepatálních tkáních (střevě, plicích)<sup>83</sup>.

#### 2.3.5.5 Podrodina CYP2C

Podrodina CYP2C je nejsložitější podrodinou všech CYP, které se nacházejí u lidí a zvířecích druhů (tabulka 4). V lidských játrech se vyskytují převážně formy CYP2C8, CYP2C9 a CYP2C19. Všechny enzymy z této podrodiny vykazují genetický polymorfismus. CYP2C19 je vysoce polymorfní a populační studie ukázaly, že jedinci mohou být rozděleni na PM a RM. PM CYP2C19 je přibližně 3–5 % bělochů (tzv. kavkazská populace) a afroameričanů, a 12–23 % asiátů<sup>96</sup>. Substrátová specifita lidských a zvířecích forem CYP je velmi odlišná.

Myší podrodina CYP2C je větší a složitější než u lidí. Zahrnuje CYP2C29, CYP2C37, CYP2C38, CYP2C39, CYP2C40, CYP2C44, CYP2C50, CYP2C54 a CYP2C55. Většina těchto forem se vyskytuje v játrech, ale některé i v extrahepatálních tkáních<sup>83,109</sup>.

Podrodina CYP2C u potkanů zahrnuje formy CYP2C6, CYP2C7, CYP2C11, CYP2C12, CYP2C13, CYP2C22 a CYP2C23. Pozoruhodně pouze u potkanů je exprese

CYP2C závislá na pohlaví dospělého zvířete. Převažující formou v potkaních játrech je CYP2C11, kde zaujímá až 50 % celkového obsahu CYP. Tato konkrétní forma CYP je exprimována nejen v játrech, ale i v ostatních extrahepatálních orgánech<sup>83</sup>.

#### 2.3.5.6 Podrodina CYP2D

Formy podrodiny CYP2D byly identifikovány u mnoha savčích druhů (tabulka 4). CYP2D byl první enzym CYP, u kterého byl popsán genový polymorfismus. Genetický polymorfismus byl rozdělen do tří skupin – RM, PM a UM<sup>114</sup>. Přibližně 7–10 % kavkazské populace zdědí mutantní alelu CYP2D6 jako autosomální recesivní vlastnost, což vede k individuálním odchylkám v reakci na různá léčiva, která jsou metabolizována CYP2D. Tato genetická variabilita u CYP2D6 je spojena s rizikem vzniku různých onemocnění a rakoviny (např. Parkinsonovy choroby, rakoviny plic, rakoviny jater). Jedinou formou této podrodiny u lidí je CYP2D6, který se nachází v různých tkáních (játrech, ledvinách, placentě, plicích, střevě, mozku). CYP2D7 a CYP2D8 jsou neaktivní pseudogeny<sup>83</sup>.

U myši existuje několik forem CYP (CYP2D9, CYP2D10, CYP2D11, CYP2D12, CYP2D13, CYP2D22, CYP2D26, CYP2D34 a CYP2D40). Forma CYP2D22 u myši, která se hojně vyskytuje v játrech, je ortologní k lidskému CYP2D6<sup>83</sup>.

Podrodina CYP2D u potkanů zahrnuje šest forem CYP, a to CYP2D1, CYP2D2, CYP2D3, CYP2D4, CYP2D5 a CYP2D18. Enzym, který odpovídá lidskému CYP2D6 je u potkanů CYP2D1. I když je substrátová specifita CYP2D6 u lidí a CYP2D1 u potkanů podobná, tak specifický inhibitor chinidin pro CYP2D6 není specifický pro ortologní formu u potkanů<sup>106</sup>.

#### 2.3.5.7 Podrodina CYP2E

Jedinou formou, která je součástí podrodiny CYP2E je CYP2E1. Nachází se v játrech a mnoha extrahepatálních tkáních. Tento enzym je zachován u všech zvířecích druhů (tabulka 4), a proto je extrapolace mezi jednotlivými druhy velmi dobrá. U myši a potkanů se podobnost s lidskou formou CYP2E1 pohybuje okolo 80 %<sup>83</sup>.

#### 2.3.5.8 Podrodina CYP3A

Podrodina CYP3A hraje velmi důležitou roli v metabolismu xenobiotik, přitom, jak bylo uvedeno u lidských forem, má velmi širokou substrátovou specifitu<sup>115</sup>. U lidí se vyskytují čtyři enzymy této podrodiny (CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 a CYP3A43). CYP3A4 a CYP3A5 bývají spojovány a jsou nejvýznamnějšími formami v lidských játrech. Kromě jater jsou exprimovány také v žaludku, plicích, střevě a ledvinách. Nicméně různé formy CYP3A, které se vyskytují u různých druhů savcí říše (tabulka 4), vykazují odlišnou substrátovou specifitu, a tudíž extrapolace na člověka není příliš bezpečná.

U myši existuje šest forem CYP3A (CYP3A11, CYP3A13, CYP3A16, CYP3A25, CYP3A41 a CYP3A44). Bylo zjištěno, že CYP3A13 se vyskytuje především ve střevě, zatímco CYP3A11, CYP3A25 a CYP3A41 se vyskytují zejména v játrech<sup>116</sup>. Z myších enzymů této podrodiny forma CYP3A11 vykazuje 76% podobnost s aminokyselinovou sekvencí lidského CYP3A4 a tudíž je tato forma nejvíce podobná tomuto lidskému ortologu<sup>83</sup>.

V podrodině CYP3A u potkanů byly identifikovány tyto formy CYP (CYP3A1/3A23, CYP3A2, CYP3A9, CYP3A18 a CYP3A62). Výskyt forem CYP3A u potkanů závisí na pohlaví jedince<sup>83</sup>.



**Tabulka 4** – Enzymy nejdůležitějších rodin CYP účastnících se metabolismu léčiv u lidí, myši a potkanů. Převzato z *Martignoni, 2006*<sup>83</sup>.

<i>Rodina</i>	<i>Podrodina</i>	<i>Člověk</i>	<i>Myš</i>	<i>Potkan</i>
<b>CYP1</b>	A	1A1, 1A2	1A1, 1A2	1A1, 1A2
	B	1B1	1B1	1B1
<b>CYP2</b>	A	2A6, 2A7, 2A13	2A4, 2A5, 2A12, 2A22	2A1, 2A2, 2A3
	B	2B6, 2B7	2B9, 2B10	2B1, 2B2, 2B3
	C	2C8, 2C9, 2C18, 2C19	2C29, 2C37, 2C38, 2C39, 2C40, 2C44, 2C50, 2C54, 2C55	2C6, 2C7*, 2C11*, 2C12*, 2C13*, 2C22, 2C23
	D	2D6, 2D7, 2D8	2D9, 2D10, 2D11, 2D12, 2D13, 2D22, 2D26, 2D34, 2D40	2D1, 2D2, 2D3, 2D4, 2D5, 2D18
	E	2E1	2E1	2E1
<b>CYP3</b>	A	3A4, 3A5, 3A7, 3A43	3A11, 3A13, 3A16, 3A25, 3A41, 3A44	3A1/3A23, 3A2*, 3A9*, 3A18*, 3A62

\*rozdíly mezi pohlavími (uvažuje se i o formě CYP3A4<sup>79</sup>)

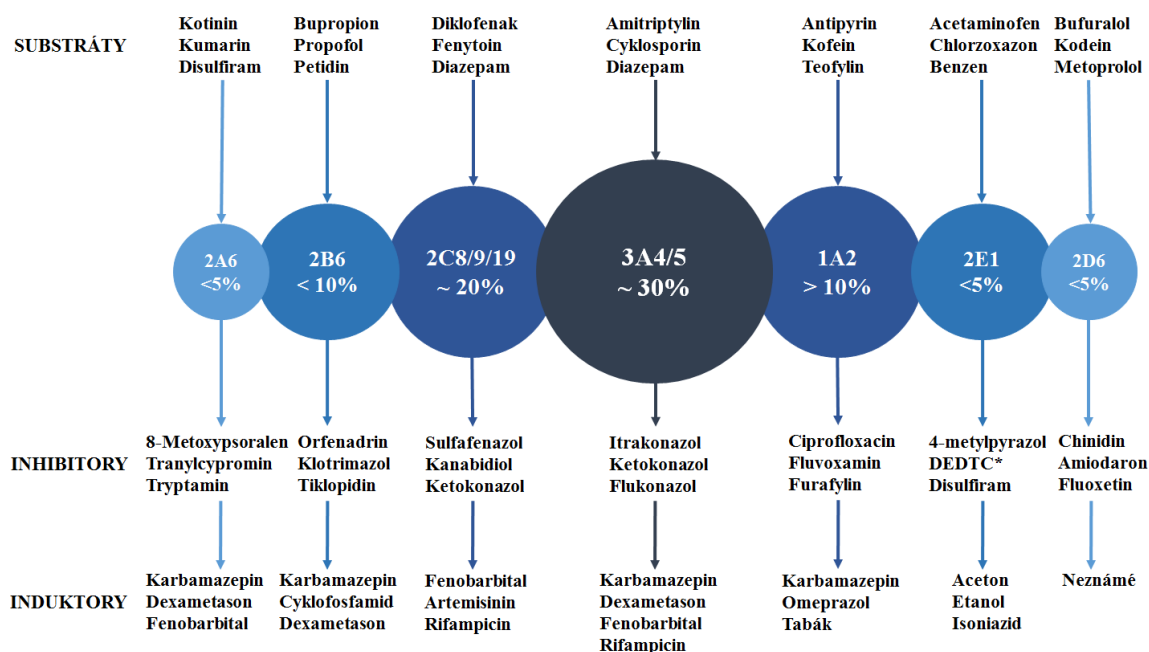
### 2.3.6 Lékové interakce

Nedílnou součástí výzkumu léčiv jsou studie lékových interakcí mezi jednotlivými léčivy, avšak interakce mohou nastat i v kombinaci léčiva s doplňkem stravy či stravou samotnou<sup>84</sup>. Lékové interakce se mohou objevit jako důsledek buď indukce exprese, nebo inhibice aktivity či exprese enzymů metabolizujících léčiva<sup>83,105</sup>. Jeden ze zajímavých aspektů rodiny CYP je, že některé, ale nikoliv všechny enzymy jsou inducibilní. Mezi inducibilní enzymy patří lidský CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 a CYP3A4, zatímco u CYP2D6 zatím indukce pozorována nebyla nebo nebyla jeho indukce všeobecně akceptována<sup>83</sup>.

Indukce je definována jako zvýšení množství a aktivity enzymů metabolizujících léčiva, která je důsledkem vystavení jiné chemické látky<sup>117</sup>. Indukce exprese enzymu obecně vede ke zvýšení clearance xenobiotika<sup>83</sup>. Indukce enzymů CYP xenobiotiky je zprostředkována skupinou transkripčních faktorů aktivovaných ligandy. Mezi tyto

intracelulární receptory můžeme zařadit především aryluhlovodíkový receptor (AhR), pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR)<sup>118</sup>.

Naopak inhibice CYP probíhá prakticky s okamžitou odezvou nebo v případě inhibice závislé na čase v rámci minut či nejvýše hodin. Inhibice může vést k významnému a nežádoucímu zvýšení koncentrace jednoho ze souběžně podávaných léčiv v plazmě. Mechanismus inhibice může být reverzibilní (nejběžnější) nebo ireverzibilní („mechanism-based“). Tento mechanismus („mechanism-based“) vede k tvorbě reaktivních metabolitů a zapříčiňuje trvalou ztrátu enzymové aktivity až do doby, než jsou nově syntetizované enzymy<sup>83</sup>. Modelové inhibitory a induktory jednotlivých CYP účastníků se metabolismu léčiv jsou zobrazeny na obrázku 12.



**Obrázek 12** – Systematické znázornění lidských jaterních enzymů CYP s modelovými substráty, inhibitory a induktory. Velikost kruhů je zhruba úměrná relativnímu množství jednotlivých CYP v lidských játrech. \* DEDTC – *N,N*-dietyldithiokarbamát. Modifikováno z Pelkonen a kol., 2008<sup>118</sup>.

## 2.4 OBEZITA A ZMĚNA AKTIVITY ENZYMŮ CYP

### 2.4.1 Obezita a s ní spojené zdravotní problémy

Obezita je metabolická porucha, která představuje velmi závažný celosvětový problém. Je to onemocnění, které je charakterizované zvýšenou hmotností nebo obecněji jako stav, který vede k nadměrnému hromadění tělesného tuku. V souvislosti s ukládáním tělesného tuku je obezita spojována se zvýšenou úmrtností v důsledku intenzivního výskytu mnoha chronických onemocnění<sup>11,119,120</sup>, mezi něž můžeme zařadit hypertenzi, diabetes mellitus<sup>121</sup>, ale také různé druhy rakoviny (prsů, endometria, tlustého střeva, děložního čípku, vaječníků, žaludku a prostaty)<sup>119,122</sup>.

Ke klasifikaci nadváhy a obezity u dospělých jedinců se běžně používá tzv. index tělesné hmotnosti (BMI; z angl. Body Mass Index). Tento index se vypočítá vydělením hmotnosti (v kilogramech) druhou mocninou výšky (v metrech). K nadváze u lidí dochází v případě, že  $BMI \geq 25$ ; zatímco  $BMI \geq 30$  je považováno za obezitu<sup>100</sup>. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO; z angl. World Health Organization) se zhruba dvě miliardy dospělých populace ve věku 18 let a výše potýkaly v roce 2014 s nadváhou, z nichž více než 600 milionů bylo obézních. V případě, že výskyt obezity poroste lineárně, může se stát, že v roce 2030 bude obézní 51 % populace<sup>123</sup>.

Fyziologické změny spojené s obezitou pravděpodobně zahrnují také změněný metabolismus a clearance léčiv<sup>11,86</sup>. Tyto důsledky mohou vést ke zvýšení rizika nežádoucích účinků a lékových interakcí u obézních pacientů. Z tohoto důvodu je velmi důležité vědět, zda jsou enzymy, které se podílejí na metabolismu léčiv, ovlivněny patologickým stavem u jedinců s obezitou<sup>86,104,121</sup>.

### 2.4.2 Modely obezity

Přesné molekulární mechanismy zdravotních problémů spojených s obezitou jsou stále nejasné, a abychom lépe porozuměli patologickým stavům u obézních jedinců, je pro výzkum obezity nezbytné použít vhodné zvířecí modely<sup>124,125</sup>. Existuje několik zvířecích modelů obezity (hlodavci i nehlodavci), nicméně mezi nejpopulárnější druhy jsou zařazovány myši a potkani. Pro studium obezity se běžně používají dvě třídy

genetických modelů, a to monogenní a polygenní. Kromě genetických modelů ale existují také modely negenetické<sup>126</sup>.

#### 2.4.2.1 Genetické modely – monogenní

Monogenní modely obezity jsou charakteristické tím, že jim chybí nebo mají změněný jediný gen. První gen spojený s obezitou charakterizovaný na molekulární úrovni byl gen *agouti*. Tento gen byl klonován Bultmanem a kol. v roce 1992<sup>127</sup>. U myši existuje model pojmenovaný jako letální žluté mutantní myši ( $A^y$ ), který má mutaci genu *agouti*. Tento gen je přechodně exprimován ve folikulárních melanocytech, které produkují červeno-žlutý pigment (feomelanin) místo černo-hnědého pigmentu (eumelaninu). Myši s mutací genu *agouti* mají žlutou barvu srsti, jsou náchylnější k rozvoji diabetu II. typu spojeného s obezitou, zvýšeným příjmem potravy (hyperfágií), hyperinzulinémií, mírně zvýšenou svalovou hmotou a neplodností. Bylo zjištěno, že tento zvířecí model je vynikající pro výzkum obezity; může být významný také u obézních lidí, protože gen *agouti* je exprimován i v lidské tukové tkáni, a u lidí trpících diabetem II. typu je zvýšená jeho exprese<sup>124,128</sup>.

Pravděpodobně nejběžnější zvířecí modely klasifikované jako monogenní mutace v leptinové dráze jsou *ob/ob* myši (obézní myši), *db/db* myši (diabetické myši) a Zuckerovy obézní diabetičtí (ZDF; z angl. Zucker diabetic fatty) potkani. Monogenní mutace zahrnuje necitlivost vůči leptinu v důsledku mutace leptinového receptoru nebo enormní resistenci vůči leptinu<sup>126</sup>.

V současné době je obézní „*ob*“ gen pravděpodobně jedním z nejstudovanějších genů v oblasti výzkumu obezity. Spontánní mutace „*ob*“ genu u myšího modelu *ob/ob* je zodpovědná za ztrátu funkce jediného „*ob*“ genu. Tato mutace zabraňuje sekreci biologicky aktivního leptinu. To znamená, že syntéza leptinu, což je proteinový hormon regulující energetické bilance inhibicí pocitu hladu, je předčasně ukončena. Leptinový gen je exprimován především v bílé tukové tkáni a ovlivňuje centrální regulaci energetické rovnováhy<sup>129,130</sup>. Myši *ob/ob* vykazují hyperfagii, hyperglykémii a hyperinzulinémií, což vede k inzulinové rezistenci. Tyto defekty vedou k časnému výskytu morbidní obezity spojené s diabetem. Myši *ob/ob* jsou také neplodné a vykazují jednu z forem obezity, která může být léčena podáváním leptinu<sup>126,128</sup>.

Fenotypově podobný model k myším *ob/ob* jsou myši *db/db* s deficitem leptinového receptoru. Tato autosomálně recesivní „*db*“ mutace vede k poškození signalizace leptinu.

Myši *db/db* vykazují, stejně jako myši *ob/ob*, morbidní obezitu a hyperfagii s následnou inzulinovou rezistencí. U modelu těchto myší je rozvíjen diabetes, a proto jsou tyto myši často používány ke studiu diabetu II. typu<sup>124,126</sup>.

Analogickým modelem k myším *db/db* je model ZDF potkanů, u kterých je leptinový receptor vytvořen, avšak zůstává v intracelulárním prostoru<sup>126</sup>. Vyskytuje se zde mutace, která je přítomná v extracelulární doméně leptinového receptoru. ZDF potkani se vyznačují dyslipidemií a hyperglykemií vedoucí k morbidní obezitě<sup>124,128</sup>.

Výše uvedené modely hlodavců vykazují mikrovaskulární komplikace (např. diabetickou retinopatii, neuropatii a nefropatii), které jsou podobné těm, pozorovaných u lidí. Tyto modely jsou tudíž velmi důležité pro testování experimentálních terapeutických přístupů. Nicméně mutace v leptinu nebo v genu receptoru leptinu se u lidí vyskytuje pouze zřídka<sup>124,131</sup>.

#### 2.4.2.2 Genetické modely – polygenní

Obezita u lidí je však pravděpodobně zprostředkována několika geny, nikoliv pouze jediným genem, jako je tomu v případě monogenních zvířecích modelů. Jiným typem modelů obezity jsou tedy modely polygenní, které odrážejí lidský obézní fenotyp<sup>124</sup>.

Obezita a diabetes mellitus u lidí se vyskytuje zejména díky stravě, která obsahuje velké množství tuku<sup>132</sup>. Ve výzkumu obezity se velmi často používají myši nebo potkani s obezitou vyvolanou stravou (DIO; z angl. diet-induced obesity), a to zejména z důvodu největší podobnosti s lidskou obezitou<sup>133</sup>. Modely hlodavců DIO jsou klasifikovány jako polygenní mutace<sup>126</sup>. Mezi nejdiskutovanější faktory, které jsou nezbytné pro obezitu vyvolanou stravou, jsou hyperfagie, sociální faktory, stres a jiné<sup>134</sup>. Je velmi důležité rozlišovat jaká strava je používána v průběhu experimentu, stejně tak použitý kmen laboratorních zvířat<sup>133</sup>. Jeden z nejdůležitějších myších modelů DIO, který je stále více populární, je myší kmen C57BL/6J. Tento kmen myší vykazuje podobnosti s metabolickým syndromem člověka, protože u myší C57BL/6J se rozvíjí obezita, hyperglykémie, hypertenze a hyperinzulinémie<sup>124,132</sup>. V případě, že ve stravě je omezený tuk, myši tohoto kmene zůstávají hubené<sup>135</sup>. Dalším modelem z této kategorie jsou potkani Sprague Dawley. Pokud jsou tyto potkani vystaveni potravě s vysokým obsahem tuku, stávají se obézními<sup>124,126</sup>.

### 2.4.2.3 Negenetické modely

Vzhledem k nižším nákladům, lepší dostupnosti a také snadnější údržbě, jsou stále častěji používány negenetické zvířecí modely obezity<sup>136</sup>. Ty zahrnují především modely obezity vyvolané chemicky a chirurgicky<sup>126</sup>.

Zvířecí model obezity, který vede k poškození hypothalamu, konkrétně obloukovitého jádra (ARC – arcuate nucleus) je takový, kdy byl syndrom obezity navozen novorozeným zvířatům subkutánní aplikací glutamátu sodného (GS). GS model je spojován s dyslipidemií a inzulínovou rezistencí. Obezita, která je u zvířat navozena GS vede ke sníženému příjmu potravy (hypofágie)<sup>104,126,137</sup>.

### 2.4.3 Změny exprese a aktivity enzymů CYP u různých modelů obezity

V literatuře existují údaje o tom, že obezita je zdrojem variability exprese a aktivity CYP jak u člověka, tak u experimentálních zvířecích modelů a mohla by tedy ovlivňovat farmakokinetiku léčiv<sup>138-140</sup>. Nejobsáhlejší přehled o vlivu obezity na metabolismus léčiv u lidí byl proveden autory Brill a kol.<sup>95</sup>. Autoři se zde zaměřili na porovnání clearance léčiv metabolizovaných pomocí CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4. Tato studie zjistila sníženou clearance substrátů CYP3A4 (hlavní formy CYP účastníci se metabolismu léčiv) a zvýšenou clearance substrátů CYP2E1 u obézních jedinců.

Pro výzkum obezity bylo vyvinuto několik zvířecích modelů, nicméně v rámci jednoho druhu zvířete, pohlaví nebo vyvolání obezity existují rozdíly. Všechny tyto faktory mohou ovlivnit regulaci exprese konkrétní formy CYP.

Nejstudovanější formou CYP v oblasti obezity je CYP2E1. I přes celkově nižší expresi tohoto enzymu vzhledem např. k CYP3A4 a s jeho omezeným zapojením do metabolismu léčiv, je vliv obezity na aktivitu CYP2E1 zahrnut v několika studiích. Obezita je považována za jeden z induktorů enzymu CYP2E1<sup>141</sup>. Většina studií zabývajících se lidskou i zvířecí obezitou demonstruje zvýšenou aktivitu a expresi CYP2E1 jak na proteinové úrovni, tak na úrovni mRNA. Pro studium vlivu obezity na aktivitu CYP2E1 je široce používán chlorzoxazon, jako specifický markerový substrát<sup>102,104,142</sup>.

Obezita je spojována se zvýšeným výskytem diabetes mellitus, a také v případě vlivu diabetu na aktivity a exprese CYP existují rozdíly mezi lidskými a zvířecími studiemi. Tento fakt může být ovlivněn několika faktory, jako je pohlaví, věk, stupeň diabetu nebo trvání nemoci<sup>143</sup>. Studie, která se zabývala vlivem obezity na aktivity a exprese CYP zaznamenala

významné snížení aktivity CYP3A4 a hladiny proteinu tohoto enzymu v lidské jaterní mikrosomální frakci z diabetických dárců. Z této studie tedy vyplývá, že diabetes a s ním spojená obezita je spojena s významným snížením aktivity a proteinové exprese jaterního enzymu CYP3A4<sup>102</sup>. Většina obezity u lidí je obvykle vyvolána vlivy, které jsou spojeny s životním stylem (např. nadměrným příjmem kalorií) než genetickými defekty. A právě ve studiích, které používaly jako model obezity myši s nutričně vyvolanou obezitou (HFD; z angl. „high fat diet“)<sup>144,145</sup>, se zjistilo, že stejně jako v lidských studiích, došlo k významnému snížení exprese proteinu CYP3A i mRNA genu *Cyp3a11*. Tyto výsledky byly potvrzeny také sníženou aktivitou CYP3A4.

Studie, která se zabývala vlivem obezity na aktivitu CYP1A2 u lidí zjistila, že se aktivita tohoto enzymu u obézních pacientů významně nelišila od kontrolních pacientů<sup>85</sup>. Stejně tak nebyly žádné změny pozorovány ve studiích zvířecích, kde se používaly *ob/ob* myši<sup>140</sup> a HFD myši<sup>86</sup>, jako modely obezity.

Aktivita CYP2A6 v lidských steatozních hepatocytech se ve studii *in vitro*<sup>146</sup> snížila. Nicméně zvířecí modely, ať už GS myši<sup>104</sup>, nebo myši *ob/ob*<sup>140</sup> aktivitu CYP2A naopak významně zvýšily.

U myši, kde byla obezita navozená GS, byly změřeny odlišné aktivity a exprese CYP ve srovnání s lidskými studii, s výjimkou CYP2E1<sup>104</sup>. Tyto výsledky poukazují na fakt, že je velmi důležité zvolit vhodný zvířecí model, který se nejvíce svými vlastnostmi blíží situaci, která nastává v organismu v případech lidské obezity.

### 3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo zjistit, zda přírodní látky obsažené v mnoha volně dostupných doplňcích stravy ovlivňují aktivity a exprese nejdůležitějších enzymů I. fáze biotransformace xenobiotik, CYP. Velmi důležitým rizikovým faktorem, který spolu s přírodními látkami může ovlivňovat vlastnosti CYP, je obezita. Vliv této metabolické poruchy byl také studován.

#### **Experimenty *in vitro***

##### Zlatobýl obecný (*Solidago virgaurea*):

- Vliv extraktu, odvaru a výluhu ze zlatobýlu obecného na aktivitu i expresi proteinů CYP jak v lidské jaterní mikrosomální frakci, tak v primárních kulturách lidských hepatocytů.

##### Brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*):

- Vliv brusnice borůvky na aktivitu CYP v lidské jaterní mikrosomální frakci.

##### Ibišek súdánský (*Hibiscus sabdariffa*):

- Vliv odvaru a výluhu z ibišku súdánského na aktivitu CYP v lidské jaterní mikrosomální frakci.

#### **Experimenty *in vivo***

##### Klikva velkoplodá (*Vaccinium macrocarpon*):

- Vliv extraktu z brusinky na aktivitu, genovou a proteinovou expresi CYP v jaterní a střevní mikrosomální frakci normálních a obézních myší.

##### Zelený čaj (*Camellia sinensis*):

- Vliv extraktu ze zeleného čaje na aktivitu, genovou a proteinovou expresi CYP v jaterní a střevní mikrosomální frakci normálních a obézních myší.

##### Obezita:

- Vliv obezity na aktivitu, genovou a proteinovou expresi CYP v myší jaterní a střevní mikrosomální frakci.



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Roztoky, chemikálie a studované látky

##### Studované přírodní látky:

Pelety obsahující 2% brusinkový extrakt a speciální pelety obsahující 0,01 % a 0,1 % polyfenonu 60 (P) byly připraveny firmou SEMED (Praha, Česká republika), P byl zakoupen od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká republika), extrakt ze zlatobýlu obecného byl dodán společností Walmark (Praha, Česká republika), celík zlatobýl nať a květ z ibišku súdánského byl obdrženo od firmy Valdemar Grešík – Natura s.r.o (Děčín, Česká republika), plody borůvek byly sbírané v létě 2015 ve Východních Čechách.

##### Chemikálie pro stanovení enzymových aktivit:

Substráty fenacetin, kumarin, diklofenak, warfarin, diazepam, bufuralol, chlorzoxazon, testosteron, stejně jako příslušné metabolity paracetamol, 7-hydroxykumarin, 7-hydroxywarfarin, desmetyldiazepam, 6-hydroxychlorzoxazon byly dodány firmou Sigma Aldrich (Praha, Česká republika). Metabolity 4-hydroxydiklofenak a 6 $\beta$ -hydroxytestosteron byly zakoupeny od firmy Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA) a 1'-hydroxybufuralol byl obdrženo od firmy BD Genstest (Woburn, MA, USA).

##### Chemikálie pro stanovení množství proteinů:

Pro *in vitro* experimenty byly primární a sekundární protilátky pro formy CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6 a CYP3A4, stejně jako kontrola aplikace vzorků  $\beta$ -aktin obdrženy od firmy Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA); primární a sekundární protilátka pro CYP2C9 byla zakoupena od firmy Acris (Herford, Německo).

Pro *in vivo* experimenty byly primární a sekundární protilátky pro formy CYP1A2, CYP2E1 a CYP3A4 dodány firmou Sigma Aldrich (Praha, Česká republika); primární

protilátka pro CYP2A6 byla pořízena od firmy BD Gentest (Woburn, MA, USA) a sekundární protilátka pro CYP2A6 byla zakoupena od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká republika); primární a sekundární protilátky pro formy CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6 byly dodány firmou Acris (Herford, Německo).

Komerční testovací souprava pro stanovení celkových proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA) byla zakoupena od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká republika).

#### Chemikálie pro stanovení hladiny mRNA:

Roztok RNA Later pro stabilizaci RNA ve vzorcích tkání a komerční souprava RNeasy Plus Mini pro izolaci RNA byly obdrženy od firmy Qiagen (Hilden, Německo). Komerční souprava Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis pro syntézu komplementární DNA (cDNA) byla zakoupena od firmy Roche (Praha, Česká republika). Komerční soustava TaqMan Gene Expression Assays byla dodána firmou Applied Biosystems (Praha, Česká republika).

#### Další chemikálie:

Methanol a dichlormethan byly zakoupeny od firmy Merck (Praha, Česká republika); kyselina fosforečná ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), kyselina octová ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), chlorid sodný ( $\text{NaCl}$ ), 2-propanol, chloroform a síran hořečnatý ( $\text{MgSO}_4$ ) byly dodány firmou Lach-Ner (Neratovice, Česká republika); acetonitril (ACN) byl obdržen od firmy VWR International (Stříbrná Skalice, Česká republika); dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a uhličitán sodný ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) byly pořízeny od firmy Lachema (Brno, Česká republika); isocitrátdehydrogenáza (IDH), nikotinamidadenindinukleotidfosfát ( $\text{NADP}^+$ ), isocitrát, kyselina chloristá ( $\text{HClO}_4$ ), dimetylsulfoxid (DMSO) a glutamát sodný (GS) byly získány od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká republika); stabilizovaný roztok penicilinu (10 000 U/ml) se streptomycinem (10 mg/ml) (PenStrep), manitol, sorbitol, amfotericin B, glutathion, tricin, Williamsovo médium E; WME, kyselina N-(2-hydroxyetyl)piperazin-N'-etansulfonová (HEPES), Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem s přísávkem F12 (DMEM/F12), fetální bovinní sérum (FBS), glukosa, chlorid draselný (KCl), chlorid vápenatý ( $\text{CaCl}_2$ ) a hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) byly obdrženy od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA); 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).

#### Roztoky pro izolaci mikrosomální frakce lidské jaterní tkáně

*Homogenizační pufr:* sacharosa (250 mmol/l), EDTA (1 mmol/l), pH 7,4

*Promývací pufr:* TRIS (50 mmol/l), KCl (150 mmol/l), pH 7,4

*Rehomogenizační pufr:* KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (20 mmol/l), EDTA (0,2 mmol/l), 20% glycerol, pH 7,4

#### Roztoky pro izolaci a kultivaci lidských hepatocytů

*Premix:* glukosa (7 mmol/l), glutamin (2,4 mmol/l), penicilin G (16 µmol/l), streptomycin sulfát (9,6 µmol/l), pyruvát sodný (400 µmol/l), dexamethason (1,78 µmol/l), holo-transferin (5 mg/l), etanolamin (1 µmol/l), inzulin (350 nmol/l), glukagon (0,2 mg/l), kyselina linolová (11 µg/l)

*HEPES 1:* HEPES (20 mmol/l), NaCl (120 mmol/l), KCl (5 mmol/l), glukosa (0,5%), amfotericin B (4,1 µg/l), PenStrep (1%), manitol (0,1 µmol/l), sorbitol (0,1 µmol/l), glutathion redukovaný (0,1 µmol/l), pH 7,4

*HEPES 2:* HEPES (20 mmol/l), NaCl (120 mmol/l), KCl (5 mmol/l), glukosa (0,5%), amfotericin B (4,1 µg/l), PenStrep (1%), pH 7,4

*HEPES 3:* HEPES (20 mmol/l), NaCl (120 mmol/l), KCl (5 mmol/l), glukosa (0,5%), amfotericin B (4,1 µg/l), PenStrep (1%), CaCl<sub>2</sub> (7 µmol/l), kolagenasa typ IV (600 mg/l)

*HEPES 4:* HEPES (20 mmol/l), NaCl (120 mmol/l), KCl (5 mmol/l), glukosa (0,5%), amfotericin B (4,1 µg/l), PenStrep (1%), bovinní sérum (5%)

*EGTA*: KCl (5,4 mmol/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (440 μmol/l), NaCl (140 mmol/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (340 μmol/l), EGTA (500 μmol/l), Tricin (25 mmol/l), amfotericin B (4,1 μg/l), PenStrep (1%), pH 7,2

*Kultivační médium ISOM*: WME (0,5 l), DMEM/F12 (HAM) médium (0,5 l), pH 7,2, kyselina askorbová (15 mg), premix (37 ml), fetální bovinní sérum (5%)

*Bezserové médium ISOM*: WME (0,5 l), DMEM/F12 (HAM) médium (0,5 l), pH 7,2, kyselina askorbová (15 mg), premix (37 ml)

#### 4.1.2 Použité *in vitro* modely

##### Primární kultury lidských hepatocytů

Lidské hepatocyty byly izolovány z jater multiorgánových dárců dvoufázovou kolagenovou perfuzí<sup>147</sup>. Použití jaterních buněk od dárců bylo schváleno Etickou komisí FN a LF Olomouc v souladu se zákonem č. 285/2000 Sb.

##### Lidská jaterní mikrosomální frakce

Lidské mikrosomy byly připraveny podle standardních postupů frakční centrifugací<sup>148</sup>. Játra byla obdržena od multiorgánových dárců a použita po schválení Etickou komisí FN a LF Olomouc v souladu se zákonem č. 285/2000 Sb.

#### 4.1.3 Použité *in vivo* modely

##### Myší jaterní a střevní mikrosomální frakce

Myší jaterní a střevní mikrosomy byly získány ze samců myší kmene NMRI, kteří byli obdrženy od firmy MediTox (Konárovice, Česká republika). Myši byly používány v souladu s pokyny pro péči a používání laboratorních zvířat (Ochrana zvířat proti zneužití, zákon č. 246/92, Česká republika). Etická komise Univerzity Karlovy v Praze, Farmaceutické

fakulty v Hradci Králové schválila všechny zvířecí experimentální postupy (číslo povolení: 34354/2010-30).

## 4.2 Přístroje

Analytické váhy AX 105 Delta-Range, Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko)

Analytické váhy GX 600, Schoeller Instruments (Praha, Česká republika)

Centrifuga Labofuge 400, Heraeus (Hanau, Německo)

Chemiluminiscenční western blot skener Li-COR C-DiGit™, KRD (Praha, Česká republika)

Chlazená centrifuga Z 323 K, Hermle LaborTechnik GmbH (Wehingen, Německo)

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

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

Koncentrátor vzorků TERMOVAP TV 10, ECOM (Praha, Česká republika)

Magnetická míchačka s ohřevem IKA RH digital, Merci (Brno, Česká republika)

Mikrocentrifuga Eppendorf™ MiniSpin™, Eppendorf (Hamburg, Německo)

pH metr HI 2211, Hanna instruments (Praha, Česká republika)

SNAP i.d.® Protein Detection System, Merck Millipore (Praha, Česká republika)

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

Spektrofotometr Varian Cary UV VIS 4000, Varian (Mulgrave, VIC, Austrálie)

Systém HPLC s UV a fluorescenční detekcí (Shimadzu LC-10A Prominence; software CLASS-VP), Shimadzu (Kyoto, Japonsko)

Systém HPLC s UV a fluorescenční detekcí (Shimadzu LC-20A Prominence; software LC-Solution), Shimadzu (Kyoto, Japonsko)

Termomixer Comfort, Eppendorf (Hamburg, Německo)

Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, BioRad (Praha, Česká republika)

Třepací inkubátor BIOSAN ES 20, Merci (Brno, Česká republika)

Třepací vodní lázeň, Grant Instruments (Cambridge, Velká Británie)

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

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

Ultrazvuková čisticí jednotka Elmasonic S 10 (H), Elma-Ultrasonic, (Singen, Německo)

Ultrazvuková UP 200S, Hielscher Ultrasonic (Teltow, Německo)

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

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

Vakuová rotační odparka Büchi B480, Büchi Labortechnik (Flawil, Švýcarsko)

Vysokoproudý napájecí zdroj PowerPac™ HC, BioRad (Praha, Česká republika)

Zařízení pro přípravu deionizované vody Ultrapur, Watrex (Praha, Česká republika)

## 4.3 Metody

### 4.3.1 Příprava vzorků přírodních látek pro *in vitro* experimenty

#### 4.3.1.1 Zlatobýl obecný (*Solidago virgaurea*)

Extrakt ze zlatobýlu obecného byl připraven extrakcí do směsi organických rozpouštědel v extrakčním poměru 10:1 podle instrukcí výrobce. Výsledný extrakt obsahoval minimální množství zbytkového rozpouštědla (max. 0,05 %). Tento extrakt podle výrobců přispívá ke správné funkci močového měchýře a dolních cest močových. Je jednou ze složek přípravku Urinal Akut; jedna tableta obsahuje 30 mg sušiny.

Celík zlatobýl nať (*Solidaginis virgaureae herba*) byl použit pro přípravu odvaru a výluhu. Pro přípravu odvaru i výluhu bylo naváženo 0,67 g tohoto produktu. Odvar byl zalit 50 ml studené destilované vody, byl přiveden k varu a následně louhován po dobu 15 min, poté byl přefiltrován, přenesen do mikrozkuumavek typu Eppendorf a zamražen na -20 °C do příslušných stanovení. Výluh byl naopak zalit 50 ml vroucí destilované vody; další postup byl stejný jako při přípravě odvaru.

#### 4.3.1.2 Brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*)

Pro přípravu vzorku brusnice borůvky bylo naváženo 5 g těchto plodů a přidáno 10 ml destilované vody. Tato směs byla pomocí ponorného mixéru zhomogenizována a následně přefiltrována přes vatou. Filtrát byl převeden do mikrozkuvek typu Eppendorf a zamražen na -20 °C do příslušných stanovení.

#### 4.3.1.3 Ibišek súdánský (*Hibiscus sabdariffa*)

Pro přípravu odvaru i výluhu bylo naváženo 0,5 g ibišku súdánského. Odvar byl zalit 50 ml studené destilované vody, byl přiveden k varu a následně louhován po dobu 8 min, poté byl přefiltrován, přenesen do mikrozkuvek typu Eppendorf a zamražen na -20 °C do příslušných stanovení. Výluh byl naopak zalit 50 ml vroucí destilované vody; další postup byl stejný jako při přípravě odvaru.

#### 4.3.2 Standardizace vzorků zlatobýlu obecného na fenolický diglukosid – leiokarposid

Standardizace testovaných vzorků zlatobýlu obecného byla stanovena na základě kvantifikace účinné látky leiokarposidu. Nejprve byla provedena kalibrace leiokarposidu metodou HPLC Prominence system (Shimadzu; Tokyo, Japonsko) s UV detekcí při vlnové délce 216 nm<sup>59</sup>. Zásobní roztok leiokarposidu byl připraven v metanolu a naředěn mobilní fází, která se skládala z (metanol/ACN/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2,5; 15:10:75; v/v/v). Celkový čas analýzy byl nastaven na 30 min, rychlost průtoku mobilní fáze na 1 ml/min. Následně byl touto metodou stanoven obsah leiokarposidu ve vzorcích zlatobýlu obecného. Objem nástřiku vzorků a standardního roztoku leiokarposidu byl 20 µl a kolona byla udržována při teplotě 25 °C.

### 4.3.3 Spektrofotometrické stanovení obsahu celkových antokyanů

Pro měření obsahu celkových antokyanů v připraveném vzorku brusnice borůvky a v odvaru a výluhu z ibišku súdánského byla použita spektrofotometrická pH-diferenční metoda<sup>149,150</sup>. Pro každý testovaný vzorek byly použity dvě ředění; jedno s pufrům chloridu draselného o koncentraci 0,025 mmol/l (pH 1,0) a druhé s pufrům octanu sodného o koncentraci 0,4 mmol/l (pH 4,5). Rozdíl v hodnotách absorbancí dvou ředění v různých hodnotách pH je způsoben strukturální přeměnou jednotlivých antokyanů z barevné oxoniové formy (pH 1,0) na bezbarvou hemiketalovou formu (pH 4,5). Spektrální absorbance vzorků byly odečítány jak při vlnové délce 525 nm, tak při vlnové délce 700 nm. Jako slepá zkouška byla použita destilovaná voda. Hodnota absorbance ( $A$ ) ředěných vzorků byla počítána následovně:

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

Obsah monomerních antokyanů v původním vzorku je vyjádřen jako ekvivalent kyanidin-3-*O*-glukosidu podle následující rovnice:

$$\text{Obsah celkových antokyanů (mg/l)} = A \cdot M \cdot \check{R} \cdot 1000 / (\epsilon \cdot L) \quad (2)$$

kde  $A$  je hodnota absorbance vypočítaná z rovnice (1);  $M$  je molární hmotnost kyanidin-3-*O*-glukosidu (449,2 g/mol);  $\check{R}$  je ředící faktor;  $1000$  je faktor pro převod gramů (g) na miligramy (mg);  $\epsilon$  je molární absorpční koeficient pro kyanidin-3-*O*-glukosid (26 900); a  $L$  je objem extrakční kapaliny

### 4.3.4 Stanovení antokyanů a antokyanidinů metodou HPLC

Jednotlivé antokyaniny byly analyzovány pomocí modifikované HPLC metody<sup>151</sup> ve vzorku brusnice borůvky a v odvaru a výluhu z ibišku súdánského. Pro separaci těchto látek byla použita kolona LiChrospher RP-18 (5 $\mu$ m), 250 x 4 mm. Zásobní roztoky studovaných přírodních látek (koncentrace zjištěné spektrofotometricky) byly naředyeny do mobilní fáze rozpouštědla A a následně přefiltrovány přes 0,22  $\mu$ m filtr. Mobilní fáze se skládala z rozpouštědla A (voda/CH<sub>3</sub>COOH/ACN/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 94,64:2,6:2,5:0,26; v/v/v/v)



a rozpouštědla B (ACN). Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1 ml/min. Detektor diodového pole byl nastaven na sledování signálu při vlnové délce 520 nm. Po nástřiku (50 µl) byly vzorky podrobeny analýze jednotlivých antokyanů gradientovou metodou HPLC podle tabulky 5.

**Tabulka 5** – Gradientová metoda HPLC pro stanovení antokyanů na koloně C<sub>18</sub>.

Čas (min)	Podíl mobilní fáze A (%) <sup>*</sup>	Podíl mobilní fáze B (%) <sup>#</sup>
0,1	100	0
5,0	100	0
20,0	80	20
25,0	70	30
30,0	100	0
35,0	100	0

<sup>\*</sup> mobilní fáze A je voda/CH<sub>3</sub>COOH/ACN/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (94,64:2,6:2,5:0,26; v/v/v/v)

<sup>#</sup> mobilní fáze B je 100% ACN

Pro stanovení antokyanidinů ve vzorcích brusnice borůvky a ibišku súdánského byla použita modifikovaná metoda kyselé hydrolýzy antokyanů<sup>151</sup>. Studované vzorky byly naředěny do 0,1 mol/l HCl a ponechány ve vodní lázni při 37 °C po dobu 1 h. Po uplynutí této doby byl roztok centrifugován 10 min při 3 500 g. Následně byl odebrán supernatant, který byl odpařen na vakuové odparce. Vzniklý odparek byl rozpuštěn v 500 µl 2 mol/l HCl a hydrolyzován po dobu 30 min ve vroucí vodě. Po hydrolýze byly vzorky ochlazeny na pokojovou teplotu a odpařeny pod dusíkem při 40 °C. Výsledný odparek byl rozpuštěn ve 200 µl mobilní fáze A, převeden do vialek a podroben analýze jednotlivých antokyanidinů pomocí gradientové HPLC metody (tabulka 6). Mobilní fáze, rychlost průtoku mobilní fáze, nastavení detektoru i objem nástřiku vzorku byl stejný jako při separaci antokyanů.

**Tabulka 6** – Gradientová metoda HPLC pro stanovení antokyanidinů na koloně C<sub>18</sub>.

Čas (min)	Podíl mobilní fáze A (%) <sup>*</sup>	Podíl mobilní fáze B (%) <sup>#</sup>
0,1	95	5
20,0	80	20
25,0	95	5
30,0	95	5
40,0	95	5

<sup>\*</sup> mobilní fáze A je voda/CH<sub>3</sub>COOH/ACN/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (94,64:2,6:2,5:0,26; v/v/v/v)

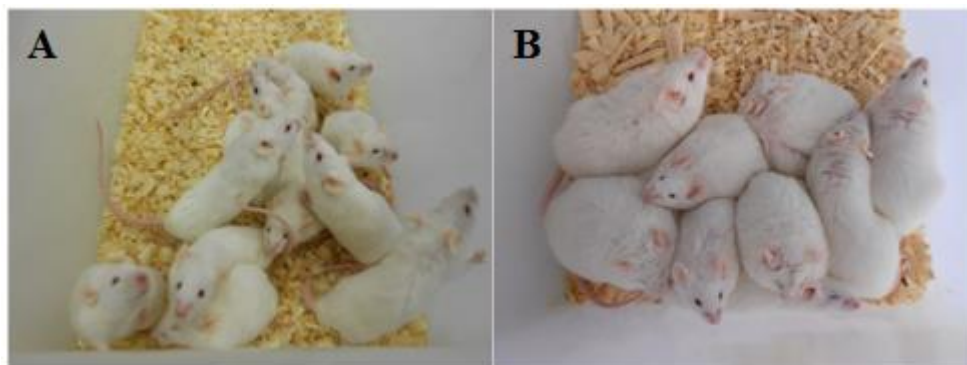
<sup>#</sup> mobilní fáze B je 100% ACN

Množství jednotlivých antokyanů a antokyanidinů ve stanovovaných vzorcích bylo vypočítáno z kalibrační křivky připravené ze známých množství standardů. Pětibodové kalibrační křivky byly stanoveny prostřednictvím čistých standardů antokyanů DEL-glu, DEL-gala, DEL-ara, KYA-gala, KYA-ara, PET-glu, PET-gala, MAL-glu, MAL-gala, PEO-glu a antokyanidinů DEL, KYA, PET, MAL, PEO.

#### 4.3.5 Příprava experimentálních zvířat pro *in vivo* experiment

Jako experimentální zvířata byli použiti myši samci z kmene NMRI (MediTox, Konárovice, Česká republika), byly chovány při teplotě 23 °C a 12 hodinovém cyklu světlo/tma (světlo od 6:00). Voda a standardní strava jim byla podávána „*ad libitum*“ (ST-1, Velaz, Koleč, Česká republika). Novorozené myši byly rozděleny do dvou skupin (obrázek 13). Jedné skupině byl aplikován GS, zatímco druhé skupině bylo aplikováno ekvivalentní množství fyziologického roztoku. Druhá skupina představovala skupinu kontrolní. Obezita u experimentálních zvířat vyvolaná hypotalamickou lézí byla indukována aplikací GS novorozeným mláďatům (10 mg a 20 mg/myš, s.c.) denně od 2–6 dne, respektive od 7–8 dne po narození<sup>104</sup>. Všechna zvířata byla chována celkem osm měsíců. V sedmém měsíci života byla zvířata náhodně rozdělena do několika skupin: **kontrolní skupina** – myši, kterým byla po celou dobu experimentu podávána standardní strava; **skupina brusinka** – myši, kterým byl po dobu 4 týdnů podáván 2% extrakt z brusinky; **skupina VDP28** – myši, kterým byl po dobu 4 týdnů podáván polyfenon v koncentraci 0,1 %; **skupina NDP28** – myši, kterým byl po dobu 4 týdnů podáván polyfenon v koncentraci 0,01 % a **skupina VDP3** – myši, kterým byl po dobu 3 dnů podáván polyfenon v koncentraci

0,1 %. Po osmi měsících života všechny myši lačnily po dobu 12 h a následně byly usmrceny cervikální dislokací. Játra, tenké a tlusté střevo byly z experimentálních zvířat odstraněny, promyty roztokem fosfátového pufru (PBS), který obsahoval tablety směsi inhibitorů proteáz a okamžitě zmrazeny v kapalném dusíku. Malé kousky jednotlivých tkání byly umístěny samostatně v roztoku RNAlater. Všechny biologické vzorky byly skladovány v mrazicím boxu při teplotě -80 °C.



**Obrázek 13** – Samci myši kmene NMRI. **A** – kontrolní myši po aplikaci fyziologického roztoku; **B** – obézní myši po aplikaci GS.

#### 4.3.6 Příprava mikrosomální subcelulární frakce

Mikrosomální frakce byla získána z jater, tenkého a tlustého střeva myši zmrazených kapalným dusíkem. Mikrosomy byly připraveny podle zavedených protokolů<sup>148</sup>. Všechny tkáně byly jednotlivě homogenizovány v PBS (pH 7,4) o koncentraci 0,1 mol/l s použitím Potter-Elvehjemova homogenizátoru. Pufr pro homogenizaci střevních vzorků byl obohacen tabletami se směsí inhibitorů proteáz. Všechny frakce byly uloženy do -80 °C. Koncentrace proteinů v mikrosomální frakci byla stanovena pomocí BCA metody<sup>152</sup>. Koncentrace enzymů CYP v jaterních mikrosomech byla stanovena pomocí diferenční spektroskopie<sup>153</sup>.

#### 4.3.7 HPLC analýza polyfenonu 60

HPLC analýza katechinů (galokatechin, epigalokatechin, katechin, epikatechin, galokatechin galát, epigalokatechin galát, katechin galát) v polyfenonu 60 (P) (definovaná forma extraktu ze zeleného čaje) byla provedena podle metody Bronnera a Beechera<sup>154</sup>. Pro analýzu byl použit kapalinový chromatograf JASCO 2000 Plus series vybaven fotodiodovým polem, fluorescenčním detektorem a kolonou LiChrospher RP-8, 250 x 4 mm

(Merck, Darmstadt, Německo). Vzorky P, jakož i standardů katechinů (Extrasynthese, Genay, Francie) byly rozpuštěny v metanolu a zfiltrány přes 0,45 µm nylonový mikrofiltr (Corning, Německo). Šestibodová kalibrační křivka obdržena s čistými standardy byla použita pro kvantifikaci P. Mobilní fáze se skládala z rozpouštědla A (ACN/voda/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 5:94,7:0,3; v/v/v) a rozpouštědla B (ACN/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 99,7:0,3; v/v) při rychlosti průtoku mobilní fáze 0,8 ml/min. Gradientová eluce byla navržena následovně: 0–5 min, 4 % rozpouštědla B; 5–34 min, 4–30 % rozpouštědla B. Objem nástřiku vzorku a standardních roztoků byl 20 µl a kolona byla udržována při teplotě 25 °C. Spektra byla zaznamenána pro všechny píky v rozsahu vlnových délek 190–450 nm. Vlnová délka detektoru, který využívá fotodiodové pole byla nastavena na 280 nm. Citlivost kvantifikace byla zvýšena fluorescenční detekcí (excitace 276 nm, emise 316 nm).

#### 4.3.8 HPLC analýza extraktu z brusinek

Brusinkový extrakt bohatý na antokyany byl připraven podle extrakční metody<sup>155</sup> použitím extrakce směsi metanol/voda/CH<sub>3</sub>COOH (85:15:0,5; v/v/v). Vzorky antokyanů a antokyanidinů byly analyzovány na systému Dionex UltiMate 3000 HPLC (Dionex, Bannockburn, IL, USA) vybaveném autosamplerem/injektorem a detektorem s diodovým polem. Pro separaci těchto složek byla použita kolona Polaris C18 (5µm), 250 x 4,5 mm (Varian, Palo Alto, CA, USA). Vzorky brusinkového extraktu i standardní roztoky antokyanů a antokyanidinů byly připraveny rozpuštěním v okyseleném metanolu (okyselení H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2,7). Koncentrace proantokyanidinů byla měřena spektrofotometrickou metodou. Proantokyanidiny byly vyjádřeny jako chlorid kyanidinu a jejich procentuální zastoupení bylo vypočítáno z kalibrační křivky připravené ze známých množství standardů. Sedmibodové kalibrační křivky byly stanoveny prostřednictvím čistých standardů delfinidinu, kyanidinu, pelargonidinu, malvidinu, peonidinu a kyanidinu-3-*O*-glukosidu a kyanidinu-3,5-*O*-diglukosidu. Mobilní fáze se skládala z rozpouštědla A (metanol/voda/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 20:0,3:79,7; v/v/v) a rozpouštědla B (metanol/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 99,7:0,3; v/v). Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1 ml/min. Detektor diodového pole byl nastaven na sledování signálu při vlnové délce 520 nm.

#### 4.3.9 Stanovení enzymových aktivit vybraných forem CYP

Enzymové aktivity jednotlivých forem CYP byly studovány *in vitro* v modelech (v lidské jaterní mikrosomální frakci a primárních kulturách lidských hepatocytů) i v *in vivo* modelech (v myší mikrosomální frakci jater a střev) podle zavedených metod<sup>156</sup> za použití specifických substrátů v případě *in vitro* experimentů. Pro stanovení aktivit CYP v případě *in vivo* experimentů u myší byly použity substráty ortologní k lidským formám CYP: CYP1A2 (myší CYP1A2), CYP2A6 (myší CYP2A5), CYP2C9 a CYP2C19 (myší podrodina CYP2C), CYP2D6 (myší CYP2D22), CYP2E1 (myší CYP2E1) a CYP3A4 (myší podrodina CYP3A). Substráty použité pro stanovení enzymových aktivit, jejich příslušné metabolity a typ reakce je uveden v tabulce 7.

**Tabulka 7** – Použité substráty, výsledné metabolity a typ reakce pro stanovení enzymových aktivit jak v jaterní i střevní mikrosomální frakci, tak v primárních kulturách lidských hepatocytů.

Enzym	Substráty	Metabolity	Typ reakce
<b>CYP1A2</b>	fenacetin	paracetamol	<i>O</i> -deetylace fenacetinu
<b>CYP2A6</b>	kumarin	7-hydroxykumarin	7-hydroxylace kumarinu
<b>CYP2C9</b>	warfarin	7-hydroxywarfarin	7-hydroxylace warfarinu
	diklofenak	4-hydroxydiklofenak	4-hydroxylace diklofenaku
<b>CYP2C19</b>	diazepam	desmetyldiazepam	diazepam <i>N</i> -demetylace
<b>CYP2D6</b>	bufuralol	1'-hydroxybufuralol	1'-hydroxylace bufuralolu
<b>CYP2E1</b>	chlorzoxazon	6-hydroxychlorzoxazon	6-hydroxylace chlorzoxazonu
<b>CYP3A4</b>	testosteron	6 $\beta$ -hydroxytestosteron	6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu

Množství mikrosomální frakce v reakčních směsích odpovídalo 70 pmol CYP pro stanovení aktivit CYP1A2 a CYP2C19; 35 pmol CYP pro stanovení aktivit CYP2A6 a CYP2C9; 67,3 pmol CYP pro stanovení aktivity CYP2D6; 160 pmol CYP pro stanovení aktivity CYP2E1 a 100 pmol CYP pro stanovení aktivity CYP3A4. Všechny reakční směsi byly pufovány na pH 7,4 pomocí 100 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a obsahovaly NADPH generující systém (viz. tabulka 8). Konečné koncentrace substrátů v odpovídajících reakčních směsích byly následující: CYP1A2, fenacetin, 25  $\mu$ mol/l; CYP2A6, kumarin, 6,25  $\mu$ mol/l; CYP2C9, diklofenak, 16  $\mu$ mol/l; CYP2C19, diazepam, 100  $\mu$ mol/l; CYP2D6, bufuralol, 25  $\mu$ mol/l; CYP2E1, chlorzoxazon, 50  $\mu$ mol/l a CYP3A4, testosteron, 100  $\mu$ mol/l.

## Stanovení enzymových aktivit jednotlivých enzymů CYP v jaterní a střevní mikrosomální frakci

Mikrosomy jsou subcelulární frakce, zejména endoplazmatického retikula, obsahující řadu enzymů metabolizujících léčiva (např. enzymy CYP, flavin monooxygenázy, karboxylesterázy a epoxid hydrolázy). Mikrosomální frakce je *in vitro* model, který je široce používán při studiu mezidruhové a interindividuální variability a při studiu metabolických lékových interakcí. Tento přístup byl použit pro zjišťování inhibice studovaných enzymů.

Stanovení aktivit v mikrosomální frakci bylo zahájeno přípravou reakční směsi. Schéma přípravy reakčních směsí je uvedeno v tabulkách níže (tabulka 8). Pro stanovení jednotlivých aktivit byl použit HPLC Prominence system (Shimadzu; Tokyo, Japan) s UV nebo fluorescenční detekcí.

**Tabulka 8** – Schéma přípravy reakčních směsí pro stanovení aktivity enzymů CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4) v mikrosomální frakci jater a střev.

<b>CYP1A2<sup>157</sup></b>	
<b>Objem reakční směsi</b>	200 µl
<b>Mikrosomální frakce</b>	70 pmol CYP
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufr, pH 7,4</b>	100 mmol/l
<b>Substrát</b>	25 µmol/l fenacetinu
<b>Potenciální inhibitory</b>	<p style="text-align: center;"><b>extrakt z brusinek (2%)</b>  <b>extrakt ze zeleného čaje (0,01; 0,1%)</b>  <b>extrakt, odvar a výluh ze zlatobýlu obecného (0,042; 0,083; 0,167 mg/ml)</b>  <b>vzorek brusnice borůvky (0,0006; 0,0012; 0,003; 0,006; 0,03; 0,044 mg/ml)</b>  <b>odvar a výluh z ibišku súdanského (1; 2,5; 5; 10; 50; 60 000 ng/ml)</b></p>
<b>Preinkubace</b>	30 min při 37 °C
<b>NADPH generující systém</b>	NADP <sup>+</sup> (0,8 mmol/l), isocitrát (6 mmol/l), MgSO <sub>4</sub> (8 mmol/l), IDH (0,3 U/ml)
<b>Inkubace</b>	20 min při 37 °C
<b>Zastavení reakce</b>	10 µl 70% HClO <sub>4</sub>
<b>Mobilní fáze</b>	MF1: metanol, pH 2,9 (20 %) + H <sub>2</sub> O (80 %); MF2: 100% metanol
Centrifugace 10 min, 13 400 rpm → 150 µl supernatantu do vialek → HPLC analýza	

MF – mobilní fáze

<b>CYP2A6<sup>158</sup></b>	
<b>Objem reakční směsi</b>	100 µl
<b>Mikrosomální frakce</b>	35 pmol CYP
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufr, pH 7,4</b>	100 mmol/l
<b>Substrát</b>	6,25 µmol/l kumarinu
<b>Potenciální inhibitory</b>	<b>extrakt z brusinek (2%)</b> <b>extrakt ze zeleného čaje (0,01; 0,1%)</b> <b>extrakt, odvar a výluh ze zlatobýlu obecného (0,042; 0,083; 0,167 mg/ml)</b> <b>vzorek brusnice borůvky (0,0006; 0,0012; 0,003; 0,006; 0,03; 0,044 mg/ml)</b> <b>odvar a výluh z ibišku súdanského (1; 2,5; 5; 10; 50; 60 000 ng/ml)</b>
<b>Preinkubace</b>	30 min při 37 °C
<b>NADPH generující systém</b>	NADP <sup>+</sup> (0,8 mmol/l), isocitrát (6 mmol/l), MgSO <sub>4</sub> (8 mmol/l), IDH (0,3 U/ml)
<b>Inkubace</b>	15 min při 37 °C
<b>Zastavení reakce</b>	200 µl metanolu
<b>Mobilní fáze</b>	0,5% CH <sub>3</sub> COOH (60 %)/ACN (40 %)
Centrifugace 10 min, 14 000 rpm → 200 µl supernatantu do vialek → HPLC analýza	



<b>CYP2C9<sup>159</sup></b>	
<b>Objem reakční směsi</b>	250 µl
<b>Mikrosomální frakce</b>	250 pmol CYP
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufr, pH 7,4</b>	100 mmol/l
<b>Substrát</b>	200 µmol/l warfarinu
<b>Potenciální inhibitory</b>	<p style="text-align: center;"><b>extrakt z brusinek (2%)</b></p> <p style="text-align: center;"><b>extrakt ze zeleného čaje (0,01; 0,1%)</b></p> <p style="text-align: center;"><b>extrakt, odvar a výluh ze zlatobýlu obecného (0,042; 0,083; 0,167 mg/ml)</b></p> <p style="text-align: center;"><b>vzorek brusnice borůvky (0,0006; 0,0012; 0,003; 0,006; 0,03; 0,044 mg/ml)</b></p> <p style="text-align: center;"><b>odvar a výluh z ibišku súdanského (1; 2,5; 5; 10; 50; 60 000 ng/ml)</b></p>
<b>Preinkubace</b>	30 min při 37 °C
<b>NADPH generující systém</b>	NADP <sup>+</sup> (0,8 mmol/l), isocitrát (6 mmol/l), MgSO <sub>4</sub> 8 mmol/l), IDH (0,4 U/ml)
<b>Inkubace</b>	20 min při 37 °C
<b>Zastavení reakce</b>	5 µl 70% HClO <sub>4</sub>
<b>Mobilní fáze</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 3 (52 %)/metanol (32 %)/ACN (16 %)
Centrifugace 10 min, 14 000 rpm → 200 µl supernatantu do vialek → HPLC analýza	

<b>CYP2C9<sup>160</sup></b>	
<b>Objem reakční směsi</b>	200 µl
<b>Mikrosomální frakce</b>	35 pmol CYP
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufr, pH 7,4</b>	100 mmol/l
<b>NADPH generující systém</b>	NADP <sup>+</sup> (0,6 mmol/l), isocitrát (4 mmol/l), MgSO <sub>4</sub> (6 mmol/l), IDH (0,2 U/ml)
<b>Potenciální inhibitory</b>	<b>extrakt z brusinek (2%)</b> <b>extrakt ze zeleného čaje (0,01; 0,1%)</b> <b>extrakt, odvar a výluh ze zlatobýlu obecného (0,042; 0,083; 0,167 mg/ml)</b> <b>vzorek brusnice borůvky (0,0006; 0,0012; 0,003; 0,006; 0,03; 0,044 mg/ml)</b> <b>odvar a výluh z ibišku súdanského (1; 2,5; 5; 10; 50; 60 000 ng/ml)</b>
<b>Preinkubace</b>	30 min při 37 °C
<b>Substrát</b>	16 µmol/l diklofenaku
<b>Inkubace</b>	25 min při 37 °C
<b>Zastavení reakce</b>	50 µl ACN (94 %)/CH <sub>3</sub> COOH (6 %), na ledu
<b>Mobilní fáze</b>	MF1: ACN (30 %)/2 mmol/l HClO <sub>4</sub> (70 %); MF2: 100% metanol
Centrifugace 4 min, 4 000 rpm → 150 µl supernatantu do vialek → HPLC analýza	

MF – mobilní fáze

<b>CYP2C19<sup>161</sup></b>	
<b>Objem reakční směsi</b>	200 µl
<b>Mikrosomální frakce</b>	70 pmol CYP
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufr, pH 7,4</b>	100 mmol/l
<b>Substrát</b>	100 µmol/l diazepamu
<b>Potenciální inhibitory</b>	<p style="text-align: center;"><b>extrakt z brusinek (2%)</b></p> <p style="text-align: center;"><b>extrakt ze zeleného čaje (0,01; 0,1%)</b></p> <p style="text-align: center;"><b>extrakt, odvar a výluh ze zlatobýlu obecného (0,042; 0,083; 0,167 mg/ml)</b></p> <p style="text-align: center;"><b>vzorek brusnice borůvky (0,0006; 0,0012; 0,003; 0,006; 0,03; 0,044 mg/ml)</b></p> <p style="text-align: center;"><b>odvar a výluh z ibišku súdanského (1; 2,5; 5; 10; 50; 60 000 ng/ml)</b></p>
<b>Preinkubace</b>	30 min při 37 °C
<b>NADPH generující systém</b>	NADP <sup>+</sup> (0,5 mmol/l), isocitrát (4 mmol/l), MgSO <sub>4</sub> (5 mmol/l), IDH (0,3 U/ml)
<b>Inkubace</b>	15 min při 37 °C
<b>Zastavení reakce</b>	100 µl ACN
<b>Mobilní fáze</b>	50 mmol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2,9 (55 %)/ACN (45 %)
Centrifugace 10 min, 10 000 rpm → 200 µl supernatantu do vialek → HPLC analýza	

<b>CYP2D6<sup>162</sup></b>	
<b>Objem reakční směsi</b>	200 µl
<b>Mikrosomální frakce</b>	67,3 pmol CYP
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufr, pH 7,4</b>	100 mmol/l
<b>Substrát</b>	25 µmol/l bufuralolu
<b>Potenciální inhibitory</b>	<b>extrakt z brusinek (2%)</b> <b>extrakt ze zeleného čaje (0,01; 0,1%)</b> <b>extrakt, odvar a výluh ze zlatobýlu obecného (0,042; 0,083; 0,167 mg/ml)</b> <b>vzorek brusnice borůvky (0,0006; 0,0012; 0,003; 0,006; 0,03; 0,044 mg/ml)</b> <b>odvar a výluh z ibišku súdanského (1; 2,5; 5; 10; 50; 60 000 ng/ml)</b>
<b>Preinkubace</b>	30 min při 37 °C
<b>NADPH generující systém</b>	NADP <sup>+</sup> (0,5 mmol/l), isocitrát (4 mmol/l), MgSO <sub>4</sub> (5 mmol/l), IDH (0,1 U/ml)
<b>Inkubace</b>	20 min při 37 °C
<b>Zastavení reakce</b>	20 µl 70% HClO <sub>4</sub>
<b>Mobilní fáze</b>	ACN (30 %)/2 mmol/l HClO <sub>4</sub> (70 %)
Centrifugace 5 min, 1 500 rpm → 150 µl supernatantu do vialek → HPLC analýza	

<b>CYP2E1<sup>163</sup></b>	
<b>Objem reakční směsi</b>	1 000 µl
<b>Mikrosomální frakce</b>	160 pmol CYP
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufr, pH 7,4</b>	100 mmol/l
<b>NADPH generující systém</b>	NADP <sup>+</sup> (0,5 mmol/l), isocitrát (4 mmol/l), MgSO <sub>4</sub> (5 mmol/l), IDH (0,2 U/ml)
<b>Potenciální inhibitory</b>	<b>extrakt z brusinek (2%)</b> <b>extrakt ze zeleného čaje (0,01; 0,1%)</b> <b>extrakt, odvar a výluh ze zlatobýlu obecného (0,042; 0,083; 0,167 mg/ml)</b> <b>vzorek brusnice borůvky (0,0006; 0,0012; 0,003; 0,006; 0,03; 0,044 mg/ml)</b> <b>odvar a výluh z ibišku súdanského (1; 2,5; 5; 10; 50; 60 000 ng/ml)</b>
<b>Preinkubace</b>	30 min při 37 °C
<b>Substrát</b>	50 µmol/l chlorzoxazonu
<b>Inkubace</b>	20 min při 37 °C
<b>Zastavení reakce</b>	50 µl 42,5% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Mobilní fáze</b>	0,5% CH <sub>3</sub> COOH/ACN (3:1; v/v)
<p>extrakce do 2 ml směsi 2-propanol (15 %)/chloroform (85 %) → 20 s wortex  → centrifugace 10 min, 2 000 rpm → 1 ml spodní fáze extraktu odpařen dusíkem  → odparek rozpuštěn ve 200 µl mobilní fáze → 10 s wortex → 150 µl supernatantu  do vialek → HPLC analýza</p>	

<b>CYP3A4<sup>164</sup></b>	
<b>Objem reakční směsi</b>	500 µl
<b>Mikrosomální frakce</b>	100 pmol CYP
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufr, pH 7,4</b>	100 mmol/l
<b>Substrát</b>	100 µmol/l testosteronu
<b>Potenciální inhibitory</b>	<b>extrakt z brusinek (2%)</b> <b>extrakt ze zeleného čaje (0,01; 0,1%)</b> <b>extrakt, odvar a výluh ze zlatobýlu obecného (0,042; 0,083; 0,167 mg/ml)</b> <b>vzorek brusnice borůvky (0,0006; 0,0012; 0,003; 0,006; 0,03; 0,044 mg/ml)</b> <b>odvar a výluh z ibišku súdanského (1; 2,5; 5; 10; 50; 60 000 ng/ml)</b>
<b>Preinkubace</b>	30 min při 37 °C
<b>NADPH generující systém</b>	NADP <sup>+</sup> (0,5 mmol/l), isocitrát (4 mmol/l), MgSO <sub>4</sub> (5 mmol/l), IDH (0,2 U/ml)
<b>Inkubace</b>	20 min při 37 °C
<b>Zastavení reakce</b>	100 µl směsi 1 mol/l Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /2 mol/l NaCl
<b>Mobilní fáze</b>	64% metanol
extrakce do 2 ml dichlormetanu → 15 s wortex → centrifugace 5 min, 3 000 rpm → 1 ml spodní fáze extraktu odpařen dusíkem → odparek rozpuštěn ve 200 µl mobilní fáze → 10 s wortex → 200 µl supernatantu do vialek → HPLC analýza	

#### Stanovení enzymových aktivit jednotlivých enzymů CYP v primárních kulturách lidských hepatocytů

Primární kultury lidských hepatocytů představují velmi silný *in vitro* model pro zkoumání mnoha aspektů fyziologie jater u člověka. Mezi tyto aspekty můžeme zařadit např. sekreci plazmatických bílkovin, oxidativní metabolismus léků a cizorodých látek, ale také aktivaci prokarcinogenů. Tento model byl použit pro sledování změny exprese a aktivit studovaných enzymů.

Primární kultury lidských hepatocytů byly vysety na kultivační desky a inkubovány s testovanými vzorky přírodních látek (extrakt, odvar a výluh ze zlatobýlu obecného)

v různých koncentracích (viz. tabulka 9). Hepatocyty byly inkubovány s přírodními látkami po dobu 24 h, poté byly ke kultivačnímu médiu přidány specifické substráty jednotlivých forem CYP (viz. tabulka 7), které byly v přítomnosti přírodních látek inkubovány po dobu 2 h. Médium bylo následně odebráno a krátce zcentrifugováno (10 min, 5000 g). Supernatant byl přenesen do mikrozkušavek typu Eppendorf a zamražen na -80 °C až do příslušných stanovení. V tabulkách níže (tabulka 9) je znázorněno schéma přípravy reakčních směsí. Pro stanovení jednotlivých aktivit byl použit HPLC Prominence system (Shimadzu; Tokyo, Japan) s UV nebo fluorescenční detekcí.

**Tabulka 9** – Schéma přípravy reakčních směsí pro stanovení aktivity enzymů CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4) v primárních kulturách lidských hepatocytů.

<b>CYP1A2<sup>157</sup></b>	
<b>Objem reakční směsi</b>	1 500 µl
<b>Substrát</b>	200 µmol/l fenacetinu
<b>Potenciální inhibitory</b>	<b>extrakt, odvar a výluh ze zlatobýlu obecného</b> (0,042; 0,083; 0,167 mg/ml)
<b>Množství odebraného média</b>	200 µl
<b>Zastavení reakce</b>	10 µl 70% HClO <sub>4</sub>
<b>Mobilní fáze</b>	MF1: metanol, pH 2,9 (20 %) + H <sub>2</sub> O (80 %); MF2: 100% metanol
Centrifugace 10 min, 13 400 rpm → 150 µl supernatantu do vialek → HPLC analýza	

MF – mobilní fáze

<b>CYP2A6<sup>158</sup></b>	
<b>Objem reakční směsi</b>	1 500 µl
<b>Substrát</b>	33,3 µmol/l kumarinu
<b>Potenciální inhibitory</b>	<b>extrakt, odvar a výluh ze zlatobýlu obecného</b> (0,042; 0,083; 0,167 mg/ml)
<b>Množství odebraného média</b>	100 µl
<b>Zastavení reakce</b>	200 µl metanolu
<b>Mobilní fáze</b>	0,5% CH <sub>3</sub> COOH (60 %)/ACN (40 %)
Centrifugace 10 min, 14 000 rpm → 200 µl supernatantu do vialek → HPLC analýza	

<b>CYP2C9<sup>159</sup></b>	
<b>Objem reakční směsi</b>	1 500 µl
<b>Substrát</b>	166,7 µmol/l warfarinu
<b>Potenciální inhibitory</b>	<b>extrakt, odvar a výluh ze zlatobýlu obecného</b> (0,042; 0,083; 0,167 mg/ml)
<b>Množství odebraného média</b>	250 µl
<b>Zastavení reakce</b>	5 µl 70% HClO <sub>4</sub>
<b>Mobilní fáze</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 3 (52 %)/metanol (32 %)/ACN (16 %)
Centrifugace 10 min, 14 000 rpm → 200 µl supernatantu do vialek → HPLC analýza	

<b>CYP2D6<sup>162</sup></b>	
<b>Objem reakční směsi</b>	1 500 µl
<b>Substrát</b>	83,3 µmol/l bufuralolu
<b>Potenciální inhibitory</b>	<b>extrakt, odvar a výluh ze zlatobýlu obecného</b> (0,042; 0,083; 0,167 mg/ml)
<b>Množství odebraného média</b>	200 µl
<b>Zastavení reakce</b>	20 µl 70% HClO <sub>4</sub>
<b>Mobilní fáze</b>	ACN (30 %)/2mmol/l HClO <sub>4</sub> (70 %)
Centrifugace 5 min, 1 500 rpm → 150 µl supernatantu do vialek → HPLC analýza	



<b>CYP3A4<sup>164</sup></b>	
<b>Objem reakční směsi</b>	1 500 µl
<b>Substrát</b>	333,3 µmol/l testosteronu
<b>Potenciální inhibitory</b>	<b>extrakt, odvar a výluh ze zlatobýlu obecného</b> (0,042; 0,083; 0,167 mg/ml)
<b>Množství odebraného média</b>	500 µl
<b>Zastavení reakce</b>	100 µl směsi 1 mol/l Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /2 mol/l NaCl
<b>Mobilní fáze</b>	64% metanol
extrakce do 2 ml dichlormetanu → 15 s wortex → centrifugace 5 min, 3 000 rpm → 1 ml spodní fáze extraktu odpařen dusíkem → odparek rozpuštěn ve 200 µl mobilní fáze → 10 s wortex → 200 µl supernatantu do vialek → HPLC analýza	

#### 4.3.10 Stanovení exprese proteinů vybraných forem CYP

Množství proteinů CYP bylo stanoveno metodou Western blotu. Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí BCA metody<sup>152</sup>. Proteiny jaterních i střevních vzorků byly separovány pomocí SDS-PAGE (10% rozdělovací gel) a následně přeneseny na nitrocelulóзовé membrány (0,45 µm) použitím přístroje Trans-Blot® Turbo™ Transfer System. Membrány byly blokovány v 5% odtučněném mléku/TBS-Tween 20 po dobu 2 h. Imunodetekce proteinů CYP u *in vitro* experimentu byla provedena použitím myších primárních protilátek pro formy CYP: CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6 a CYP3A4; použitím králičí primární protilátky pro formu CYP2C9. Imunodetekce proteinů CYP u *in vivo* experimentu byla provedena pomocí králičích primárních protilátek pro ortologní lidské formy CYP: CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4. Signál byl vizualizován příslušnými sekundárními protilátkami s křenovou peroxidázou. Navázané proteiny byly detekovány použitím chemiluminiscenčního kitu (Santa Cruz, CA, USA). Intenzita signálu byla vyhodnocována pomocí přístroje C-DiGit™ Blot Scanner.

#### 4.3.11 Izolace RNA a kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)

Celková RNA byla izolována z jater, tenkého a tlustého střeva myši uložených v RNAlateru za použití kitu RNeasy Plus Mini, který byl použit podle instrukcí výrobce. Koncentrace a čistota RNA byla stanovena spektrofotometriky při 260, 280 a 230 nm použitím přístroje NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA). Integrita RNA byla kontrolována pomocí gelové elektroforézy. První vlákno cDNA bylo syntetizováno z celkové RNA za použití kitu Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis. Analýza qPCR pro kvantifikaci enzymů CYP byla provedena na přístroji LightCycler 1536 Instrument (Roche, Praha, Česká republika) s použitím specifického testu TaqMan Gene Expression. Do 1536-jamkových destiček byly vzorky pipetovány pomocí automatického přístroje Labcyte Echo (Labcyte, Sunnyvale, CA, USA). Výpočty byly založeny na metodě „Delta-Delta Ct“<sup>165</sup>. Data byla vyjádřena jako násobek změny jednotlivých experimentálních skupin ve srovnání s kontrolou. Geny HPRT1 a 18S rRNA byly použity jako vnitřní kontrola<sup>166</sup>.

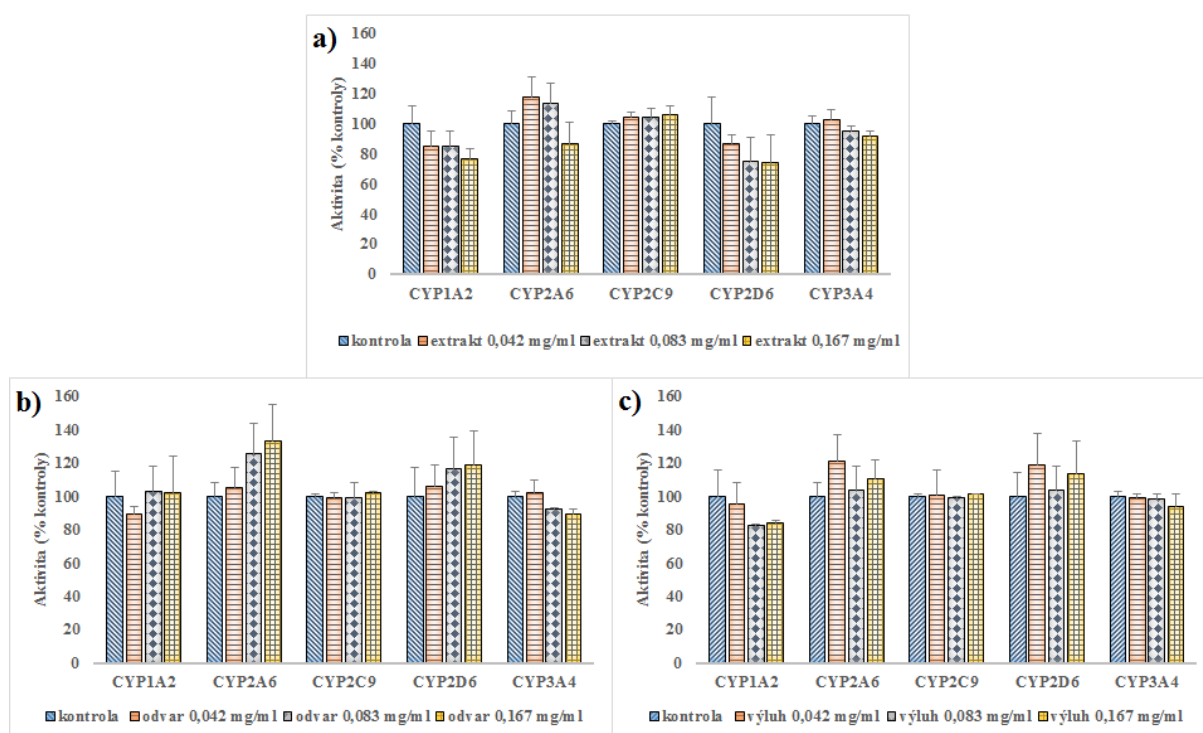
#### 4.3.12 Statistická analýza

Všechny výsledky byly podrobeny statistické analýze. Data byla vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka (s.o.). Statistická významnost byla stanovena za použití Studentova t-testu a softwaru Statistica 12 (Systat Software, San Jose, CA). Rozdíly byly považovány za statisticky významné, pokud  $p < 0,05$ .

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Vliv přípravků ze zlatobýlu obecného na aktivitu CYP v lidské jaterní mikrosomální frakci

S využitím specifických substrátů byly v lidské jaterní mikrosomální frakci stanoveny vybrané enzymové aktivity. Pro stanovení aktivit jednotlivých CYP byly použity vzorky extraktu, odvaru a výluhu ze zlatobýlu obecného. Lidská mikrosomální frakce jater byla inkubována s testovanými vzorky v různých koncentracích (0,042 mg/ml; 0,083 mg/ml a 0,167 mg/ml). Data v grafu 1 znázorňují, že aktivity CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4 po ovlivnění testovaných vzorků nevykazovaly ve všech studovaných koncentracích žádné signifikantní změny.

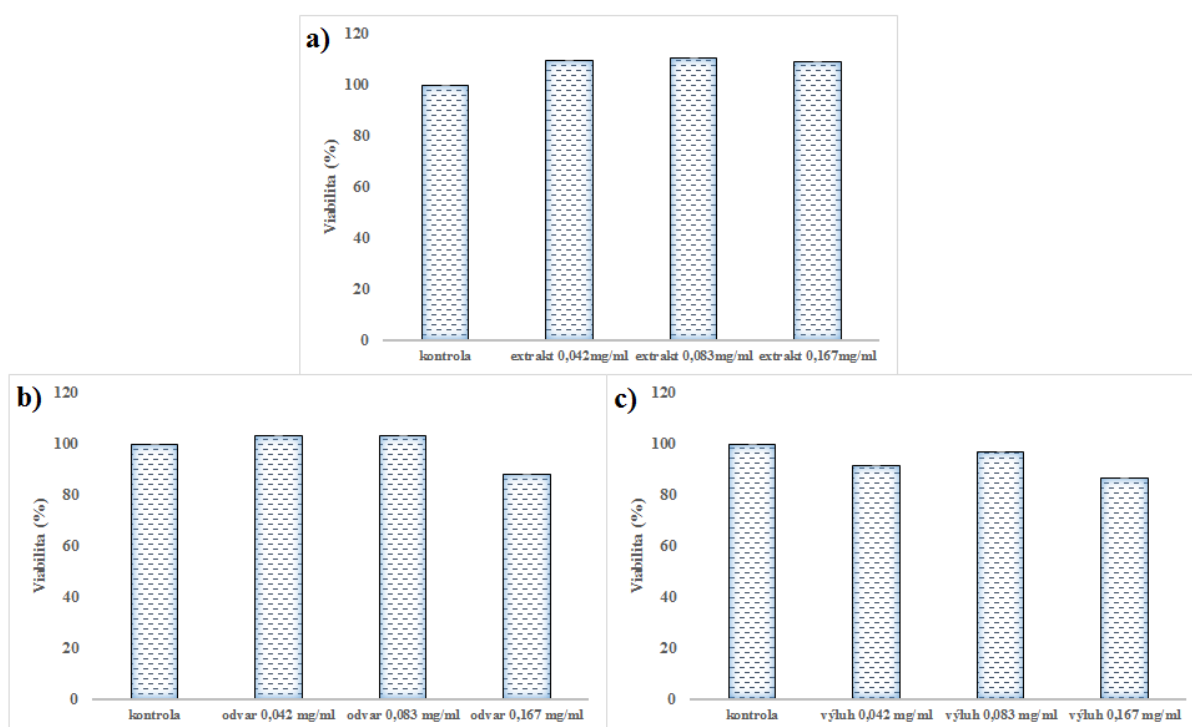


**Graf 1** – Vliv a) extraktu, b) odvaru a c) výluhu ze zlatobýlu obecného na aktivity enzymů CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4 v mikrosomální frakci lidských jater. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly. Hodnoty aktivit představují průměr  $\pm$  s.o. ze dvou nezávislých experimentů prováděných v duplikátech. Jako kontrola byla použita destilovaná voda. Hodnoty nejsou signifikantně ovlivněny ( $p > 0,05$ ).

## 5.2 Vliv přípravků ze zlatobýlu obecného na enzymovou aktivitu a expresi proteinů CYP v primárních kulturách lidských hepatocytů

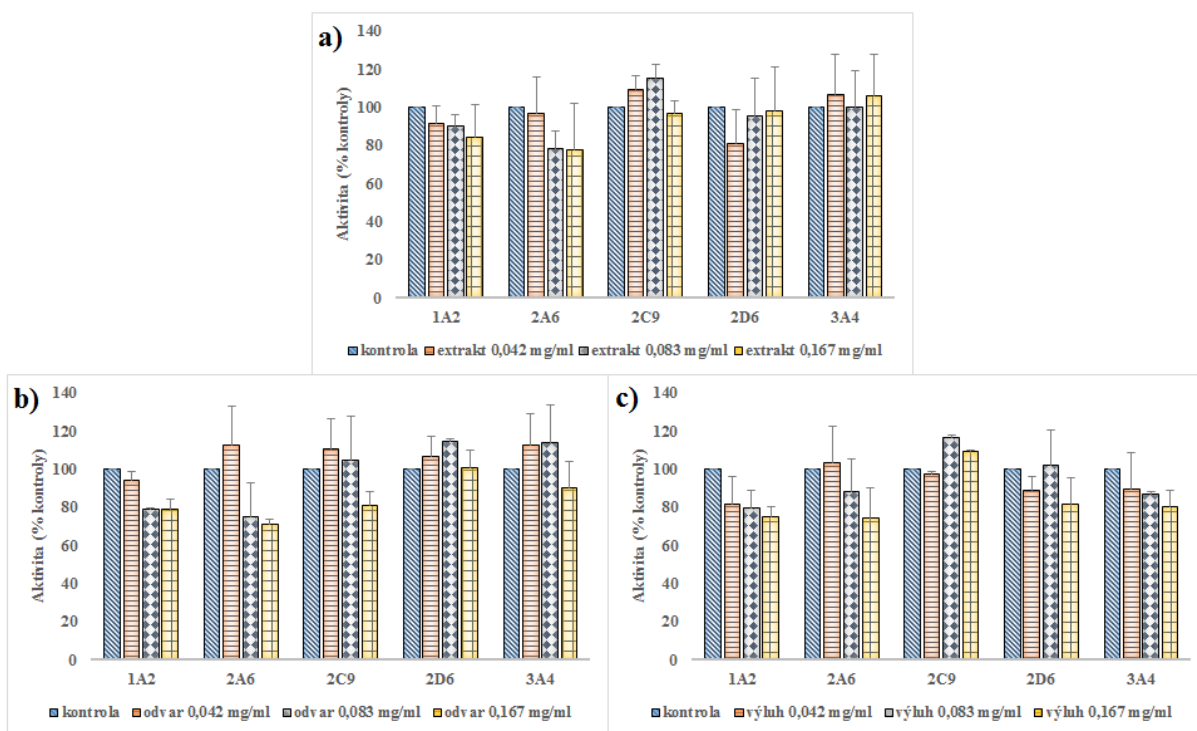
Enzymové aktivity byly s využitím specifických substrátů stanoveny také v primárních kulturách lidských hepatocytů po ovlivnění vzorků extraktu, odvaru a výluhu ze zlatobýlu obecného. Primární kultury lidských hepatocytů byly vysety na kultivační desky a inkubovány s testovanými vzorky o koncentracích 0,042 mg/ml; 0,083 mg/ml a 0,167 mg/ml po dobu 24 h. Po této době byly do média přidány specifické substráty pro stanovení jednotlivých aktivit.

Pro ověření metabolické aktivity tohoto *in vitro* systému a k vyloučení toxicity studovaných vzorků zlatobýlu obecného byl použit test cytotoxicity s MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid)<sup>167</sup> (graf 2).

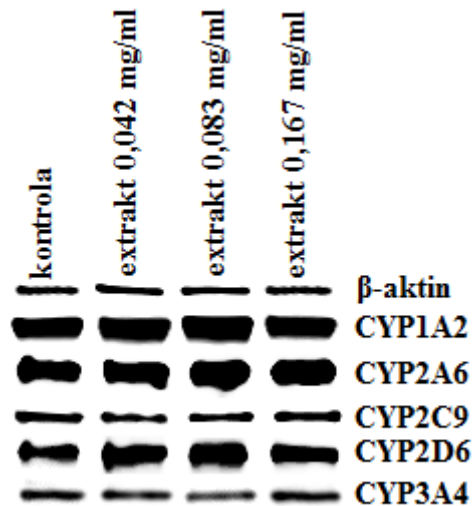


**Graf 2** – Test cytotoxicity pro a) extrakt, b) odvar a c) výluh ze zlatobýlu obecného. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly. Hodnoty aktivit představují průměr  $\pm$  s.o. ze dvou experimentů. Jako kontrola byla použita destilovaná voda. Hodnoty nejsou signifikantně ovlivněny ( $p > 0,05$ ).

Výsledky, které byly získány při stanovení aktivit enzymů CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4, jsou znázorněny v grafu 3. Data ukazují, že po aplikaci vzorků zlatobýlu nedochází v primárních kulturách lidských hepatocytů k signifikantním změnám stanovovaných aktivit ve všech studovaných koncentracích. Výsledky získané měřením aktivit jednotlivých CYP v lidských hepatocytech korespondovaly s výsledky, které byly obdrženy při sledování změn exprese proteinů, a tedy ani zde nebyly prokázány žádné signifikantní změny (obrázek 14).



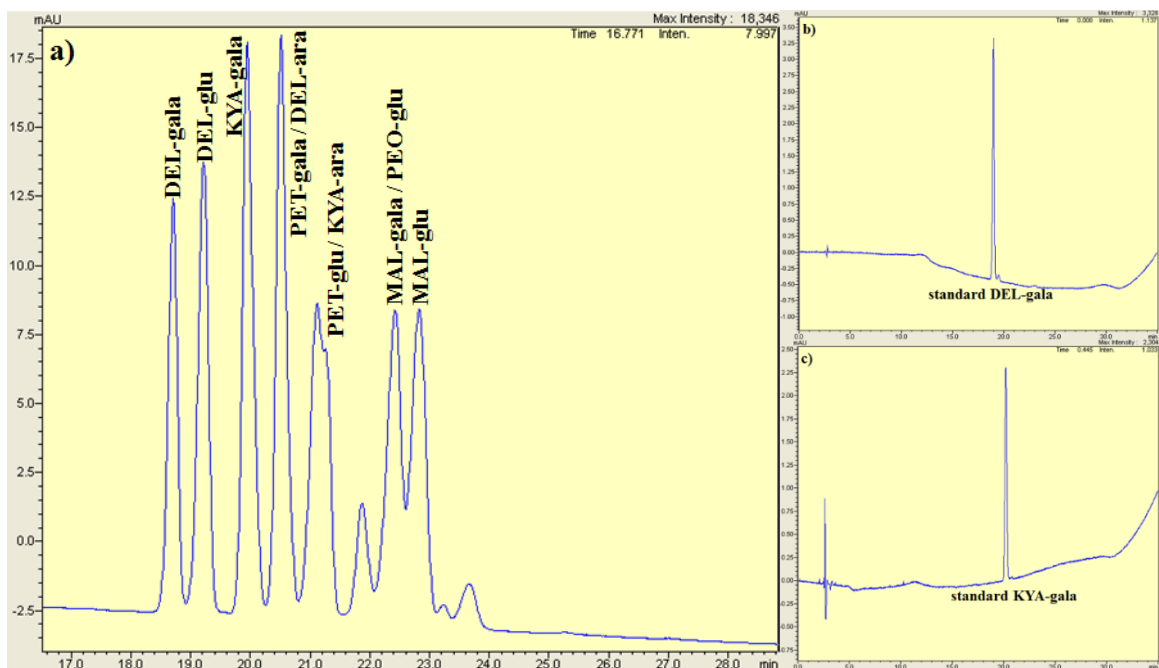
**Graf 3** – Vliv **a)** extraktu, **b)** odvaru a **c)** výluhu ze zlatobýlu obecného na aktivity enzymů CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4 v primárních kulturách lidských hepatocytů. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly. Hodnoty aktivit představují průměr ± s.o. ze dvou nezávislých experimentů prováděných v duplikátech. Jako kontrola byla použita destilovaná voda. Hodnoty nejsou signifikantně ovlivněny ( $p > 0,05$ ).



**Obrázek 14** – Vliv extraktu ze zlatobýlu obecného na expresi proteinů CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4.  $\beta$ -aktin byl použit jako kontrola aplikace vzorků.

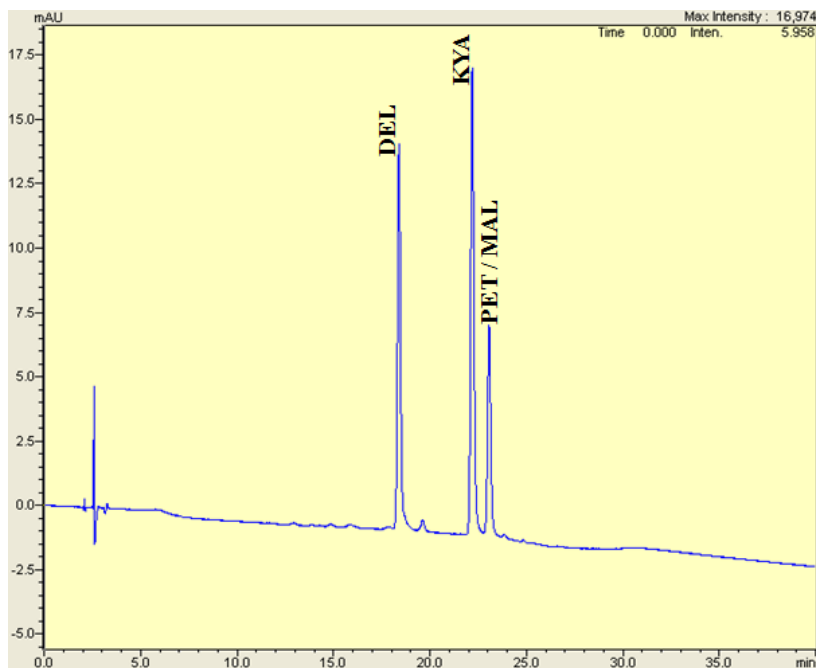
### 5.3 Vliv brusnice borůvky na aktivitu CYP v lidské jaterní mikrosomální frakci

Předtím než byl vzorek brusnice borůvky podroben analýze vybraných enzymových aktivit CYP, byly metodou HPLC stanoveny jednotlivé antokyany. Ve studovaném vzorku bylo zjištěno 10 antokyanů (obrázek 15a). Spektrofotometrickou metodou byl stanoven také celkový obsah monomerních antokyanů v tomto roztoku, který byl 1,1 mg/ml. Ze spektrofotometrického měření bylo spočítáno, že 100 g plodů brusnice borůvky obsahovalo 300 mg antokyanů.



**Obrázek 15** – a) Stanovené 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) ve vzorku brusnice borůvky, b) standard delfinidin-3-*O*-galaktosid chloridu, DEL-gala (retenční čas – 18,9 min), c) standard kyanidin-3-*O*-galaktosid chloridu, KYA-gala (retenční čas – 20,1 min).

Pro separaci aglykonů antokyanů (antokyanidinů) ve vzorku brusnice borůvky byla provedena kyselá hydrolýza přítomných antokyanů. Na obrázku 16 je zobrazen chromatogram s jednotlivými antokyanidiny, které vznikly ve vzorku studované přírodní látky po kyselé hydrolýze. Jak je patrné, vzorek brusnice borůvky obsahoval nejméně čtyři antokyanidiny. Podle retenčních časů antokyanidinů MAL a PET je zřejmé, že poslední největší pík odpovídá právě těmto dvěma antokyanidinům.

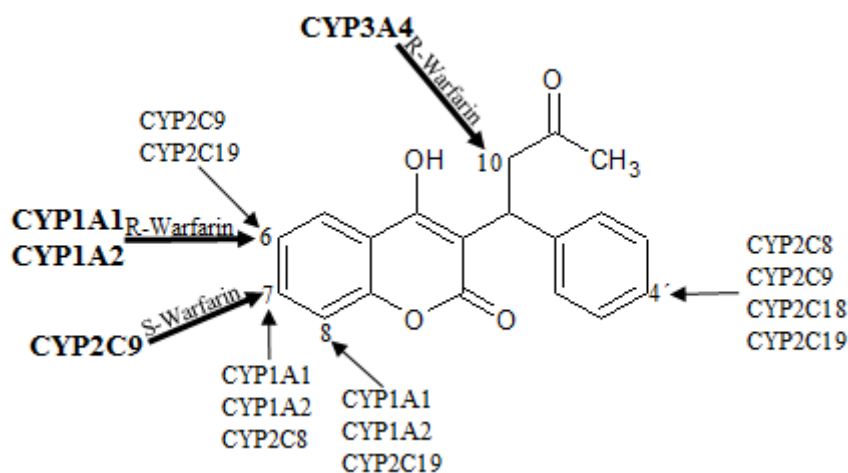


**Obrázek 16** – Stanovené antokyanidiny (delfinidin, DEL; kyanidin, KYA; petunidin, PET; malvidin, MAL) ve vzorku brusnice borůvky.

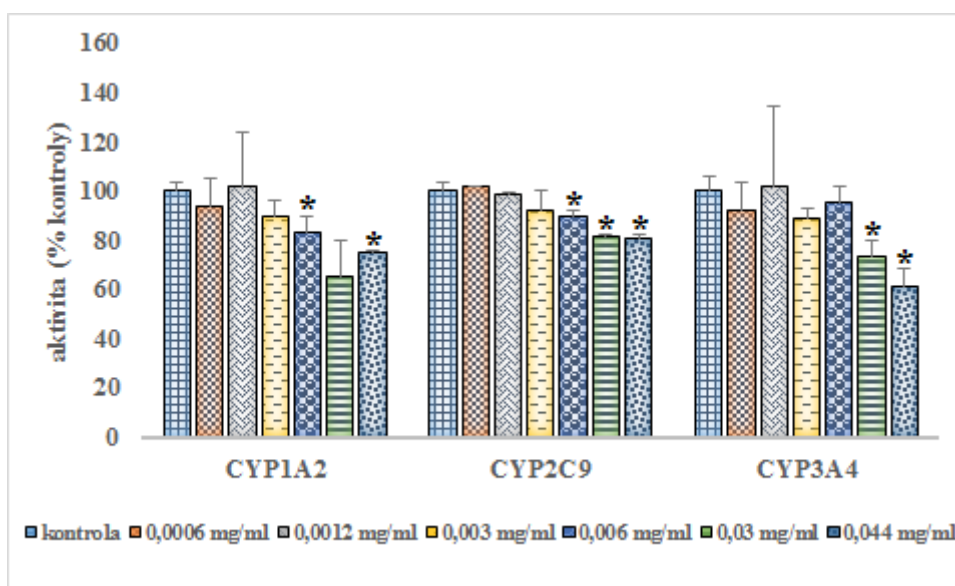
Vzorek brusnice borůvky byl přidán k lidské mikrosomální frakci jater v různých koncentracích (0,0006 mg/ml; 0,0012 mg/ml; 0,003 mg/ml; 0,006 mg/ml; 0,03 mg/ml a 0,044 mg/ml) za účelem zjištění, zda tato přírodní látka ovlivňuje metabolismus warfarinu (graf 4). Nejnižší koncentrace brusnice borůvky odpovídá konzumaci přibližně 100 g těchto plodů za předpokladu, že se do krve dostane 1 % celkových antokyanů<sup>168</sup>. Tato koncentrace byla vypočítána ze spektrofotometrického stanovení celkového obsahu monomerních antokyanů. Naopak nejvyšší koncentrace dle spektrofotometrického stanovení odpovídá konzumaci přibližně 7 kg plodů brusnice borůvky.

Enzymové aktivity byly po aplikaci vzorku brusnice borůvky na lidské mikrosomy stanoveny pro CYP, které se nejvíce zapojují do metabolismu warfarinu (obrázek 17). S-warfarin je specifickým substrátem pro stanovení aktivity CYP2C9 (7-hydroxylace warfarinu), zatímco pro stanovení aktivity CYP3A4 (10-hydroxylace warfarinu), ale také CYP1A2 (6-hydroxylace warfarinu) je používán substrát R-warfarin. Jak je patrné z grafu 4, v případě všech tří CYP došlo k signifikantnímu snížení enzymových aktivit, a to v případě vyšších koncentrací.



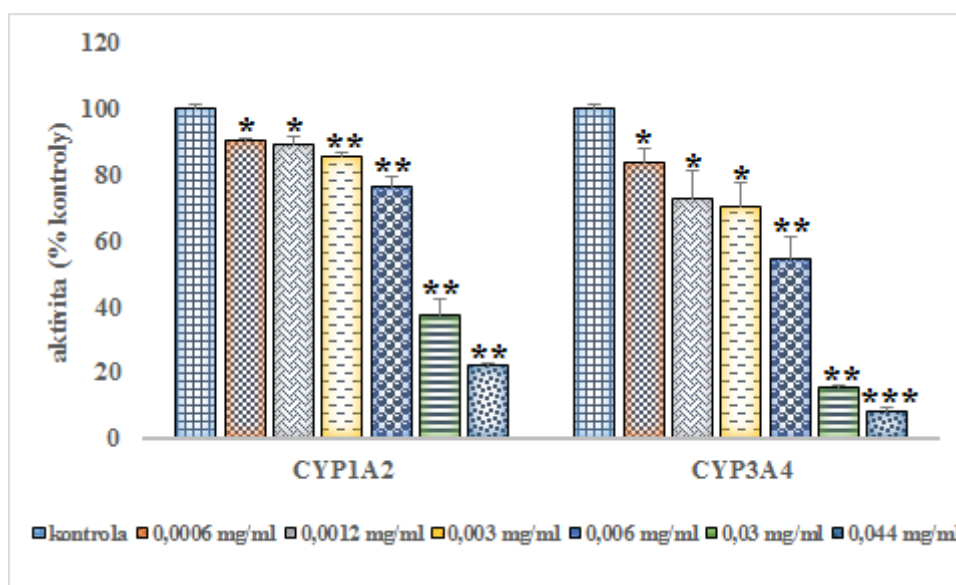


**Obrázek 17** – Metabolismus warfarinu zprostředkovaný různými enzymy v různých pozicích molekuly warfarinu. Tučným písmem jsou vyznačeny ty enzymy, které se nejvíce zapojují do metabolismu warfarinu.



**Graf 4** – Vliv vzorku brusnice borůvky na metabolismus warfarinu (aktivity enzymů CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4) v mikrosomální frakci lidských jater. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly. Hodnoty aktivit představují průměr ± s.o. ze dvou nezávislých experimentů prováděných v duplikátech. Jako kontrola byla použita destilovaná voda. Hodnoty signifikantně snížené ve srovnání s kontrolou jsou označeny hvězdičkou (\* $p \leq 0,05$ ).

Z důvodu signifikantních změn v případě CYP1A2 a CYP3A4, byly pro ověření těchto aktivit vybrány specifické substráty (fenacetin, respektive testosteron). Z výsledků grafu 5 je zřejmé, že již u nejnižší koncentrace antokyanů, která odpovídá konzumaci přibližně 100 g studovaných plodů, došlo k signifikantnímu snížení obou stanovovaných aktivit (CYP1A2 a CYP3A4). Na tomto grafu lze pozorovat, že čím vyšší koncentrace antokyanů ve vzorku brusnice borůvky byla použita, tím nižší aktivita námi sledovaných enzymových aktivit byla prokázána.

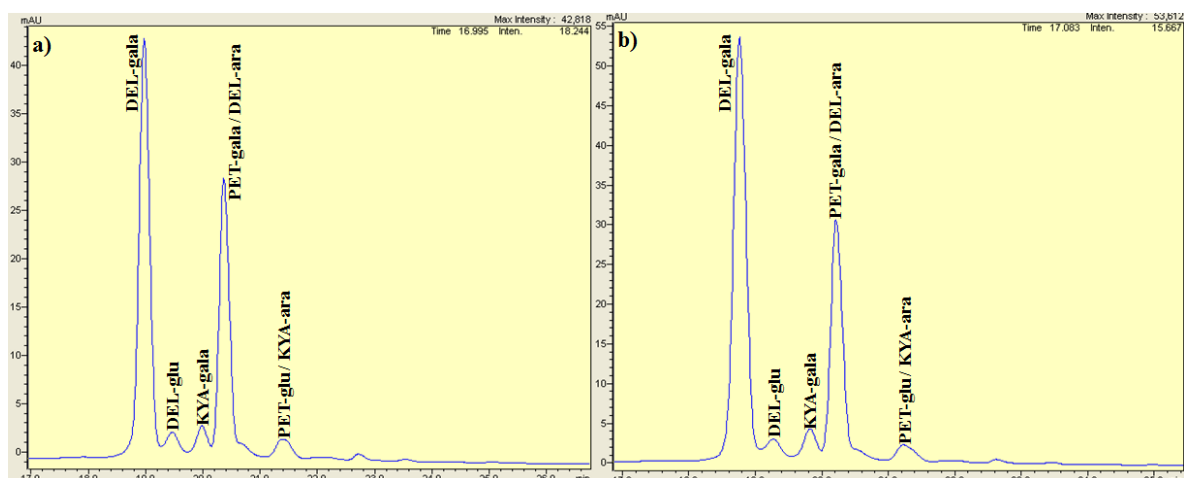


**Graf 5** – Vliv vzorku brusnice borůvky na metabolismus fenacetinu a testosteronu (aktivity enzymů CYP1A2 a CYP3A4) v mikrosomální frakci lidských jater. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly. Hodnoty aktivit představují průměr ± s.o. ze dvou nezávislých experimentů prováděných v duplikátech. Jako kontrola byla použita destilovaná voda. Hodnoty signifikantně snížené ve srovnání s kontrolou jsou označeny hvězdičkami (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,007$ ; \*\*\* $p \leq 0,0002$ ).

#### 5.4 Vliv ibišku súdánského na aktivitu CYP v lidské jaterní mikrosomální frakci

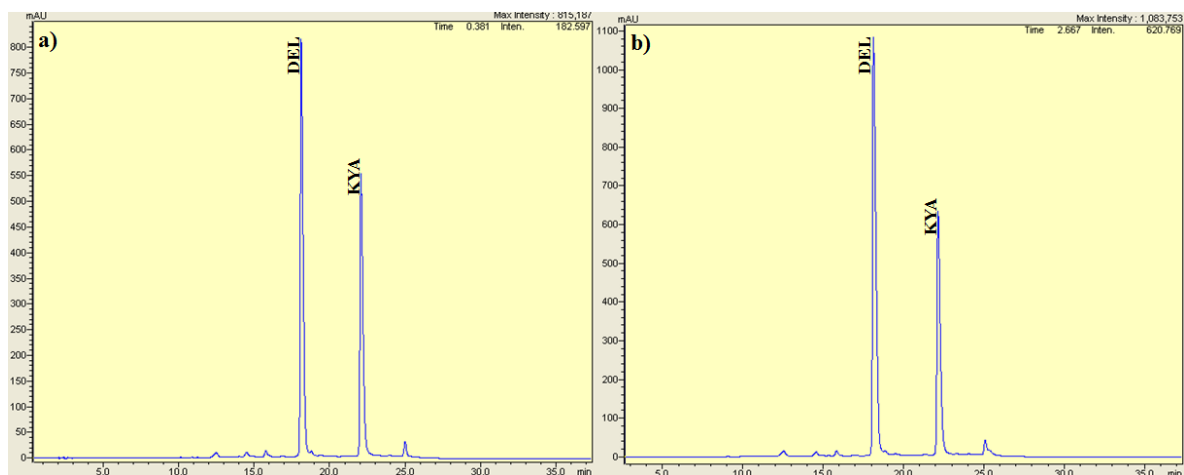
Stejně jako u vzorku brusnice borůvky, byly i pro roztoky odvaru a výluhu z ibišku súdánského stanoveny jednotlivé antokyaniny (obrázek 18) a antokyanidiny (obrázek 19). Spektrofotometrickou metodou byl stanoven i celkový obsah monomerních antokyanů v těchto vzorcích, který byl 0,0602 mg/ml pro odvar a 0,0676 mg/ml pro výluh z ibišku

súdánského. Ze spektrofotometrického měření bylo spočítáno, že 5 čajů z ibišku súdánského, které je člověk za den schopen vypít, obsahovalo 2,5 ng antokyanů.



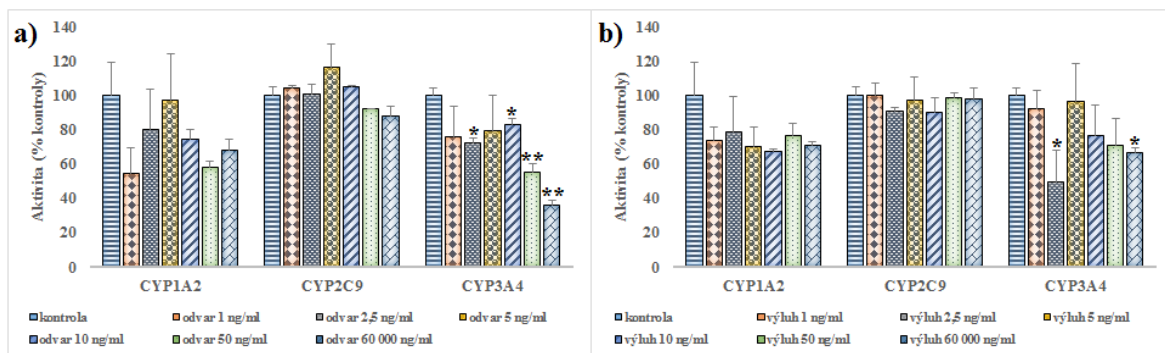
**Obrázek 18** – Stanovené antokyaniny (delfinidin-3-*O*-glukosid chlorid, DEL-glu; delfinidin-3-*O*-galaktosid chlorid, DEL-gala; delfinidin-3-*O*-arabinosid chlorid, DEL-ara; kyanidin-3-*O*-galaktosid chlorid, KYA-gala; kyanidin-3-*O*-arabinosid chlorid, KYA-ara; petunidin-3-*O*-glukosid chlorid, PET-glu; petunidin-3-*O*-galaktosid chlorid, PET-gala)

**a)** v odvaru, **b)** ve výluhu z ibišku súdánského.



**Obrázek 19** – Stanovené antokyanidiny (delfinidin, DEL; kyanidin, KYA) **a)** v odvaru, **b)** ve výluhu z ibišku súdánského.

V lidské mikrosomální frakci byly po aplikaci vzorků odvaru a výluhu z ibišku súdánského v různých koncentracích (1 ng/ml; 2,5 ng/ml; 5 ng/ml; 10 ng/ml; 50 ng/ml a 60 000 ng/ml) stanoveny enzymové aktivity CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4 pomocí substrátu warfarinu. Za předpokladu, že se do krve dostane přibližně 1% celkových antokyanů, odpovídá nejnižší koncentrace ibišku súdánského konzumaci dvěma čajům. Data v grafu 6 ukazují, že po ovlivnění lidské jaterní mikrosomální frakce odvarem i výluhem z ibišku súdánského nedošlo k signifikantním změnám v případě 6-hydroxylace (CYP1A2) a 7-hydroxylace (CYP2C9) warfarinu. Naopak aktivita CYP3A4 (10-hydroxylace warfarinu) byla u odvaru i výluhu z ibišku súdánského signifikantně snížena po aplikaci 2,5 a 60 000 ng/ml. Navíc u odvaru byla aktivita CYP3A4 signifikantně snížena také u dvou dalších koncentrací.



**Graf 6** – Vliv a) odvaru, b) výluhu z ibišku súdánského na metabolismus warfarinu (aktivity enzymů CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4) v mikrosomální frakci lidských jater. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly. Hodnoty aktivit představují průměr ± s.o. ze dvou nezávislých experimentů prováděných v duplikátech. Jako kontrola byla použita destilovaná voda. Hodnoty signifikantně snížené ve srovnání s kontrolou jsou označeny hvězdičkami (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,007$ ).

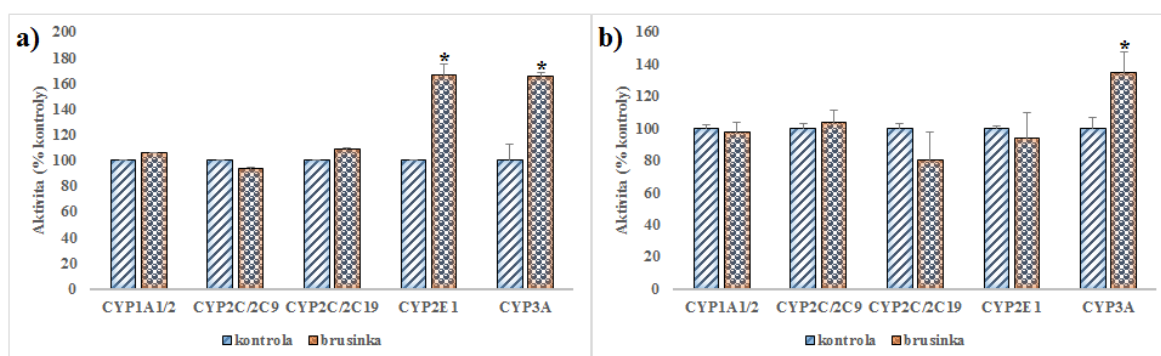
## 5.5 Vliv extraktu z brusinky na vlastnosti CYP v jaterní a střevní mikrosomální frakci *in vivo*

### 5.5.1 Stanovení enzymových aktivit, exprese proteinů a mRNA jednotlivých forem CYP v jaterní mikrosomální frakci u normálních a obézních myší

U normálních i obézních myší byly v jaterní mikrosomální frakci měřeny příslušné enzymové aktivity i exprese mRNA a proteinu. Expresa mRNA byla stanovena pro vybrané myší formy ortologní k lidským enzymům (*Cyp2c29*, *Cyp2e1*, *Cyp3a11* a *Cyp3a13*, respektive odpovídající lidským CYP2C9/19, CYP2E1 a CYP3A4).

Graf 7a ukazuje, že v játrech normálních myší byly enzymové aktivity zvýšeny po aplikaci extraktu z brusinky v případě 6-hydroxylace chlorzoxazonu (odpovídající lidskému CYP2E1) a 6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu (odpovídající lidskému CYP3A4). Na druhou stranu nebyly zjištěny žádné signifikantní změny *O*-deetylace fenacetinu (substrát pro CYP1A2), 4'-hydroxylace diklofenaku (substrát pro CYP2C9) a *N*-demetylace diazepamu (substrát pro CYP2C19).

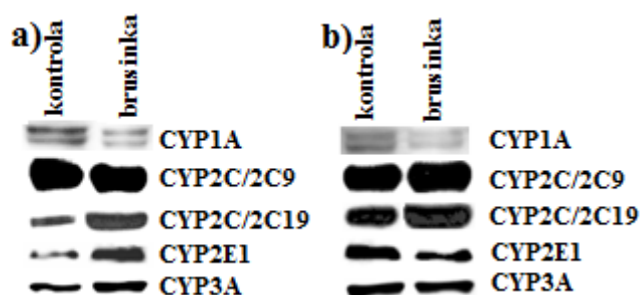
U obézních myší v jaterní mikrosomální frakci byla po aplikaci extraktu z brusinky zvýšena enzymová aktivita pro 6 $\beta$ -hydroxylaci testosteronu (aktivita lidského CYP3A4). Nicméně další měření aktivity byly nezměněné (graf 7b).



**Graf 7** – Vliv aplikace extraktu z brusinky o koncentraci 2 %, který byl podáván denně po 28 dní, na enzymové aktivity měřené pomocí specifických substrátů typických pro jednotlivé ortologní lidské formy CYP (**a**) v jaterní mikrosomální frakci normálních myší, (**b**) v jaterní mikrosomální frakci obézních myší. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly. Hodnoty aktivit představují průměr  $\pm$  s.o. z experimentů se směsnými

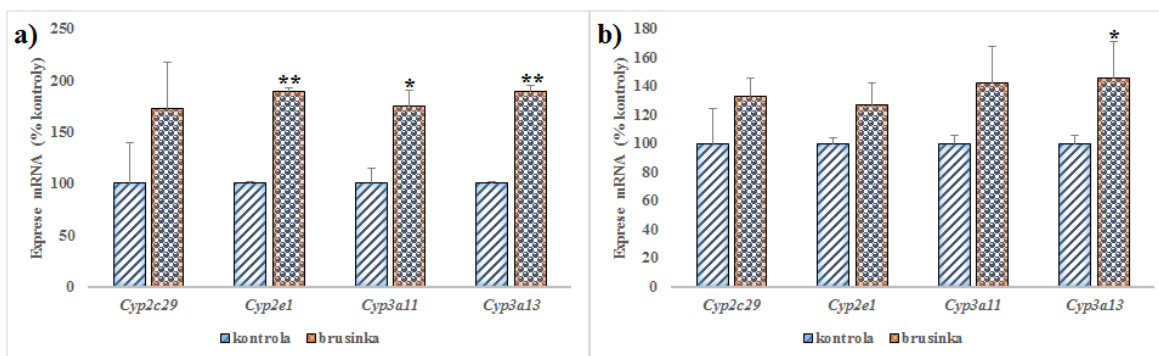
mikrosomálními vzorky (12 zvířat) prováděných v triplicátech. \*Statisticky významné ( $p \leq 0,05$ ).

Hladina proteinové exprese v játrech normálních a obézních myší (obrázek 20a, resp. 20b) byla stanovena metodou Western blotu použitím protilátek specifických pro příslušné lidské proteiny. Hladina exprese proteinu myších CYP ortologních k lidským CYP2C19, CYP2E1 a CYP3A4 byla u normálních myší zvýšena o 38, 27, respektive o 32 % ve srovnání s kontrolou. Naproti tomu v jaterní mikrosomální frakci obézních myší nebyly zjištěny žádné signifikantní změny.



**Obrázek 20** – Vliv aplikace extraktu z brusinky o koncentraci 2 %, který byl podáván denně po 28 dní, na expresi proteinů CYP (a) v jaterní mikrosomální frakci normálních myší, (b) v jaterní mikrosomální frakci obézních myší.

Změny v enzymových aktivitách a proteinové expresi myší jaterní mikrosomální frakce byly ověřeny analýzou qPCR. Data v grafech 8a a 8b znázorňují zvýšení hladiny genové exprese všech měřených CYP u normálních, respektive obézních myší. Nicméně trendy zvýšení hladiny exprese mRNA *Cyp2c29* u normálních a obézních myší (myší forma odpovídající lidským CYP2C9 a CYP2C19) a zvýšená hladina exprese mRNA *Cyp2e1* a *Cyp3a11* (myší formy odpovídající lidským CYP2E1, respektive CYP3A4) u obézních myší nebyla signifikantní. Na druhou stranu ve srovnání s kontrolní skupinou byly zjištěny signifikantně zvýšené hladiny mRNA *Cyp2e1*, *Cyp3a11* a *Cyp3a13* v jaterní mikrosomální frakci normálních myší.



**Graf 8** – Vliv aplikace extraktu z brusinky o koncentraci 2 %, který byl podáván denně po 28 dní, na genovou expresi CYP **(a)** v jaterní mikrosomální frakci normálních myší, **(b)** v jaterní mikrosomální frakci obézních myší. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly. mRNA data představují průměr  $\pm$  s.o. ze šesti jednotlivých zvířat. Hodnoty signifikantně zvýšené ve srovnání s kontrolou jsou označeny hvězdičkami (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ).

Je zajímavé, že zvýšená exprese *Cyp2e1* a *Cyp3a* odpovídá signifikantně zvýšené aktivitě a proteinové expresi CYP2E1 a CYP3A v jaterní mikrosomální frakci normálních myší po aplikaci extraktu z brusinky (srov. graf 7a, obrázek 20a a graf 8a). Korelace byla zjištěna také u aktivity CYP3A a exprese *Cyp3a* v jaterní mikrosomální frakci obézních myší (srov. graf 7b a 8b).

### 5.5.2 Stanovení exprese proteinů a mRNA jednotlivých forem CYP ve střevní mikrosomální frakci u normálních a obézních myší

Malé množství biologického vzorku myší mikrosomální frakce tenkého střeva nám zabránilo stanovit příslušné enzymové aktivity. Ze stejného důvodu byla studována mRNA exprese pouze s geny CYP odpovídající formám CYP, které měly změněnou proteinovou expresi (*Cyp2e1* a *Cyp3a*) (tabulka 10).

Výsledky analýzy qPCR detekovaly nižší hladiny mRNA ve srovnání s kontrolními vzorky pro *Cyp3a11* a *Cyp3a13* v mikrosomální frakci tenkého střeva normálních myší a pro *Cyp2e1* a *Cyp3a* v mikrosomální frakci tenkého střeva obézních myší, což pravděpodobně ukazuje na jiný mechanismus regulace genů *Cyp3a* ve střevě v porovnání s jaterními vzorky, kde byl pozorován nárůst.

Proteinová exprese myších CYP ortologních k lidským CYP2E1 a CYP3A4 byla sledována podrobněji (jiné formy CYP nevykazovaly žádné signifikantní změny). Data

exprese proteinu byla analyzována denzitometricky a vykazovala signifikantně snížené hladiny exprese proteinů CYP3A (ortologní k lidskému CYP3A4). Tyto výsledky odpovídaly expresi *Cyp3a* ve střevních vzorcích normálních myší. V mikrosomální frakci tenkého střeva u normálních myší nebyly zjištěny žádné signifikantní změny na hladině mRNA ani na hladině proteinu u CYP2E1. Žádné signifikantní změny nebyly pozorovány ani ve střevní mikrosomální frakci obézních myší na hladině proteinu CYP2E1 a CYP3A.

**Tabulka 10** – Vliv aplikace extraktu z brusinky o koncentraci 2 %, který byl podáván denně po 28 dní, na expresi mRNA a proteinů CYP v mikrosomální frakci tenkého střeva u normálních a obézních myší. Data proteinové exprese vyjadřují průměr ze dvou měření se směsnými mikrosomálními vzorky (12 zvířat); data mRNA představují průměr ± s.o. z experimentů se šesti jednotlivými zvířaty. Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako procento kontroly. Signifikantně snížené hodnoty oproti kontrole jsou označeny hvězdičkami (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ).

Tenké střevo					
		normální myši		obézní myši	
Protein	CYP2E1	100 ± 11	125 ± 15	100 ± 9	112 ± 10
	CYP3A	100 ± 8	56 ± 11*	100 ± 12	116 ± 11
mRNA	<i>Cyp2e1</i>	100 ± 7,1	110 ± 7,7	100 ± 7,74	49 ± 13,49**
	<i>Cyp3a11</i>	100 ± 10,4	59 ± 15,5*	100 ± 10,53	50 ± 12,38*
	<i>Cyp3a13</i>	100 ± 12,3	78 ± 16,7	100 ± 16,73	58 ± 10,4*

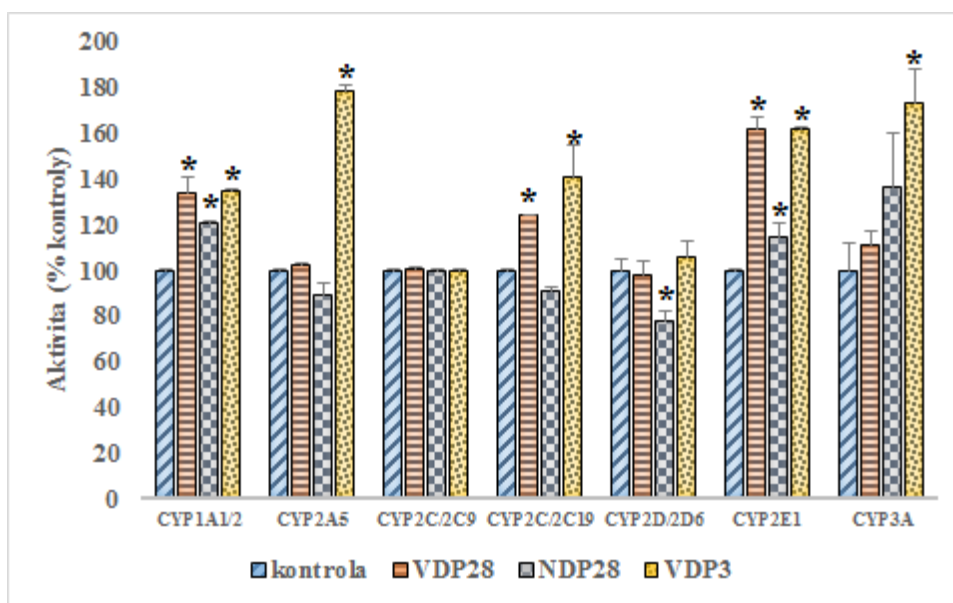
## 5.6 Vliv extraktu ze zeleného čaje (polyfenonu 60 – P) na vlastnosti CYP v jaterní a střevní mikrosomální frakci *in vivo*

### 5.6.1 Stanovení enzymových aktivit, exprese proteinů a mRNA jednotlivých forem CYP v jaterní mikrosomální frakci u normálních myší – vliv P

U normálních myší v jaterních mikrosomech kontrolních myší a myší, kterým byl podáván P v různých dávkách a po různou dobu (skupiny VDP28, NDP28 a VDP3, vysoká či nízká dávka, 3 dny či 28 dní, viz str. 44, kap. 4.3.5) byly stanoveny enzymové aktivity vybraných CYP. Aktivity myších CYP byly stanoveny s využitím substrátů ortologních k lidským formám CYP (graf 9). U myší, kterým byl podáván P (ve všech dávkách), byly zjištěny



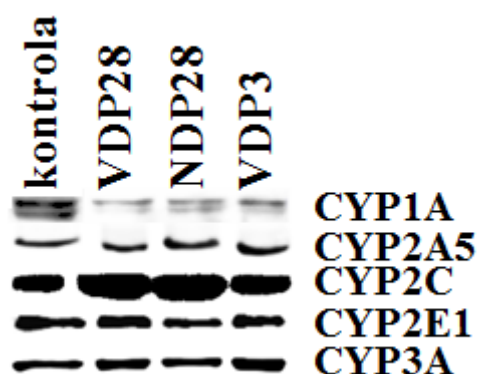
signifikantně zvýšené aktivity CYP1A a CYP2E1. Výrazně zvýšená aktivita byla zaznamenána pro aktivitu CYP2A5 u skupiny VDP3, avšak tato aktivita nebyla ovlivněna u skupin VDP28 a NDP28 ve srovnání s kontrolní skupinou. Naopak podávání vysokých dávek P (VDP) způsobilo zvýšení aktivity CYP2C/2C19, zatímco aplikace P o nízké koncentraci (NDP) enzymové aktivity neovlivnila. U skupiny VDP3 byla signifikantně zvýšena aktivita CYP3A ve srovnání s kontrolní skupinou. Aktivita myšičího CYP2D byla snížena u skupiny myši ovlivněných dlouhodobým podáváním NDP. Aplikace P v různých koncentracích a různých časových intervalech, neměla žádný vliv na změnu aktivity CYP2C/2C9.



**Graf 9** – Vliv potravy obohacené VDP nebo NDP po dobu 28 nebo 3 dní na specifické aktivity vybraných CYP v jaterní mikrosomální frakci normálních myši. Kontrola – myši po aplikaci standardní stravy, VDP28 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,1 % po dobu 28 dní, NDP28 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,01 % po dobu 28 dní a VDP3 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,1 % po dobu 3 dnů. Hodnoty představují průměr ± s.o. z experimentů se směsnými mikrosomálními vzorky (11 zvířat) prováděných v triplicátech. \*Statisticky významné ( $p \leq 0,05$ ).

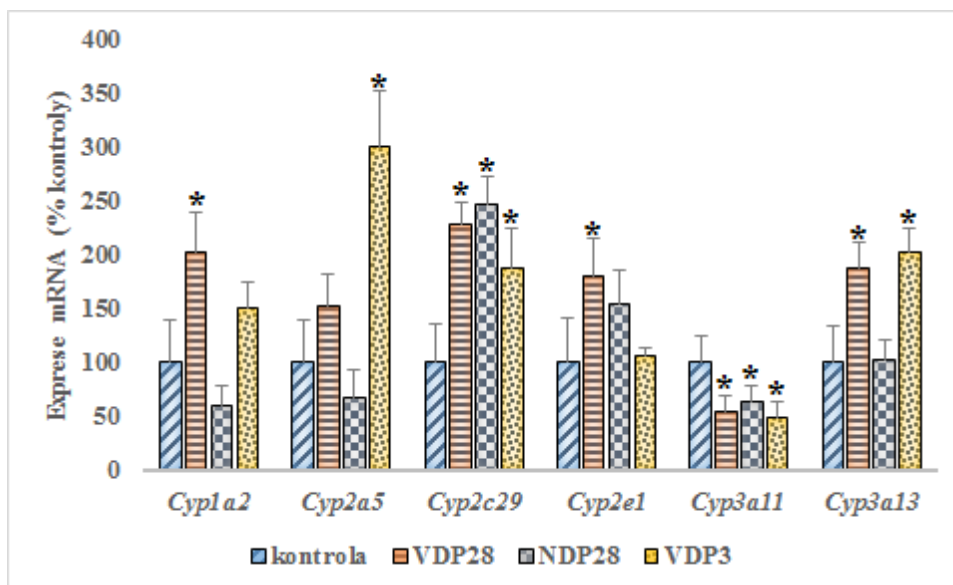
Proteinové exprese jaterních forem myšičích CYP byly kvantifikovány pomocí metody Western blotu s využitím protilátek ortologních k lidským CYP. Western blot byl prováděn u CYP, jejichž aktivita byla významně zvýšena po aplikaci P (formy CYP odpovídající lidskému CYP1A2, CYP2A6, CYP2C19, CYP2E1, a CYP3A4). Výsledky jsou ukázány na obrázku 21. Imunodetekcí proteinů CYP2C/2C19 a CYP2E1 byla ověřena hladina

enzymových aktivit: signifikantně vyšší množství těchto proteinů bylo stanoveno u skupiny VDP3; v případě CYP2E1 také u skupiny VDP28 ve srovnání s kontrolní skupinou. Na druhou stranu, množství proteinů CYP1A2, CYP2A6 a CYP3A4 po aplikaci P bylo s kontrolní skupinou srovnatelné nebo snižené, ačkoliv u skupin, kterým byl podáván P, byly zjištěny zvýšené odpovídající aktivity.



**Obrázek 21** – Vliv potravy obohacené VDP a NDP po dobu 3 nebo 28 dní na proteinovou expresi vybraných CYP v jaterní mikrosomální frakci normálních myši. Kontrola – myši po aplikaci standardní stravy, VDP28 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,1 % po dobu 28 dní, NDP28 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,01 % po dobu 28 dní a VDP3 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,1 % po dobu 3 dnů.

Kvantifikace mRNA jednotlivých myších CYP v jaterní mikrosomální frakci (graf 10) ukázala signifikantní zvýšení *Cyp1a2*, *Cyp2c29*, *Cyp2e1* a *Cyp3a13* ve skupině VDP28 ve srovnání s kontrolní skupinou. Expresie studovaných genů, s výjimkou *Cyp1a2*, *Cyp2e1* a *Cyp3a11* byla signifikantně zvýšená také u skupiny VDP3. Po aplikaci NDP došlo k indukci pouze u *Cyp2c29*. Expresie *Cyp3a11* byla signifikantně snižená po aplikaci P ve všech koncentracích a časových intervalech.



**Graf 10** – Vliv potravy obohacené VDP a NDP po dobu 3 nebo 28 dní na expresi mRNA vybraných CYP v jaterní mikrosomální frakci normálních myši. Kontrola – myši po aplikaci standardní stravy, VDP28 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,1 % po dobu 28 dní, NDP28 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,01 % po dobu 28 dní a VDP3 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,1 % po dobu 3 dnů. mRNA data představují průměr ± s.o. ze šesti jednotlivých zvířat. Signifikantně zvýšené nebo snížené hodnoty oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ) jsou označeny hvězdičkou.

### 5.6.2 Stanovení enzymových aktivit, exprese proteinů a mRNA jednotlivých forem CYP ve střevní mikrosomální frakci u normálních myši – vliv P

V tenkém střevě byly z důvodu nedostatku vzorku stanovovány aktivity pouze tří CYP. Srovnání specifických aktivit a exprese vybraných tří CYP mezi všemi experimentálními skupinami je shrnuto v tabulce 11. Aplikace P ve všech dávkách a časových intervalech vedla ke zvýšení aktivity CYP2A5. Aktivita CYP2C/2C19 byla zvýšena pouze u skupiny VDP3. U myši, kterým byla podávána VDP (jak po dobu 3 dnů, tak po dobu 28 dní) došlo k výraznému nárůstu v aktivitě CYP3A. Tato aktivita byla v mikrosomech tenkého střeva u skupiny VDP3 až 190 krát vyšší než u skupiny kontrolní.

Stejně jako enzymová aktivita, také exprese proteinů CYP2A5, CYP2C/2C19 a CYP3A byla výrazně zvýšena u skupiny VDP3. U ostatních skupin bylo zvýšení exprese proteinů pozorováno pouze u CYP2A5.

Naopak mRNA *Cyp2a5* byla ve srovnání s kontrolou snížena ve všech skupinách. U skupin NDP28 a VDP3 byla zjištěna signifikantní indukce střevního *Cyp2c29*, zatímco střevní *Cyp3a11* byla indukována u skupin VDP28 a NDP28.

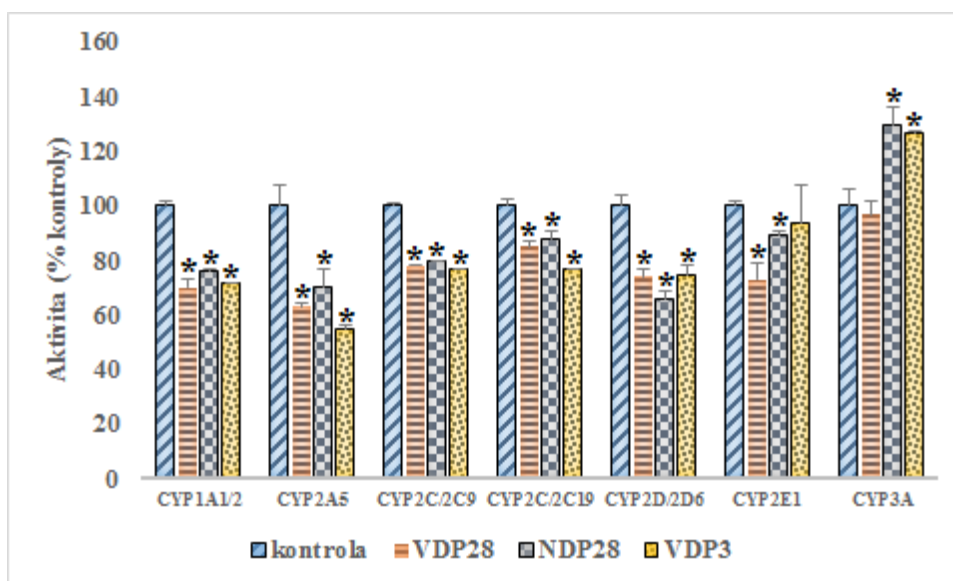
**Tabulka 11** – Vliv potravy obohacené VDP a NDP po dobu 3 nebo 28 dní na specifické aktivity a expresi vybraných CYP v mikrosomální frakci tenkého střeva u normálních myší. Data specifických aktivit a proteinové exprese vyjadřují průměr ze dvou měření se směsnými mikrosomálními vzorky (11 zvířat); data mRNA představují průměr  $\pm$  s.o. z experimentů se šesti jednotlivými zvířaty. Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako procento kontroly. Signifikantně zvýšené nebo snížené hodnoty oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ) jsou označeny hvězdičkou.

		Kontrola	VDP28	NDP28	VDP3		
tenké střevo	CYP2A	Aktivita CYP2A5	100	280	148	209	
		Protein CYP2A5	100	128	233	225	
		mRNA <i>Cyp2a5</i>	100 $\pm$ 22	40 $\pm$ 4*	35 $\pm$ 6*	17 $\pm$ 1*	
	CYP2C	Aktivita CYP2C/2C19	100	97	101	177	
		Protein CYP2C/2C19	100	87	39	233	
		mRNA <i>Cyp2c29</i>	100 $\pm$ 37	88 $\pm$ 7	168 $\pm$ 33*	228 $\pm$ 21*	
	CYP3A	Aktivita CYP3A/3A4	100	446	102	19035	
		Protein CYP3A/3A4	100	52	100	209	
		mRNA <i>Cyp3a11</i>	100 $\pm$ 42	183 $\pm$ 33*	229 $\pm$ 45*	79 $\pm$ 10	
			mRNA <i>Cyp3a13</i>	100 $\pm$ 29	62 $\pm$ 16*	127 $\pm$ 30	47 $\pm$ 10*

### 5.6.3 Stanovení enzymových aktivit a exprese mRNA jednotlivých forem CYP v jaterní mikrosomální frakci u obézních myší – vliv P

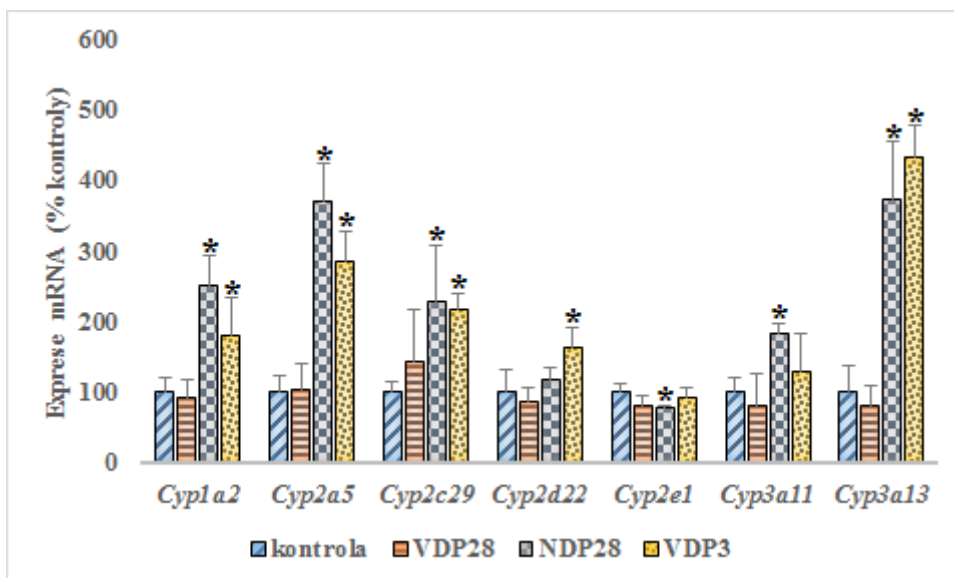
Hydroxylace, *O*-deethylace nebo *N*-demethylace osmi substrátů ortologních k lidským formám CYP, které byly selektivně katalyzovány jednotlivými myšimi formami CYP, byly testovány v jaterních mikrosomech kontrolních skupin i skupin ovlivněných P. Specifické aktivity CYP1A, CYP2A5, CYP2C/2C9, 2C19 a CYP2D/2D6 v myších játrech byly signifikantně sníženy ve všech studovaných skupinách. Dlouhodobá aplikace VDP a NDP zapříčinila snížení aktivity CYP2E1 o 27 % respektive o 11 %, zatímco vliv krátkodobé

aplikace nebyl signifikantní. Specifická aktivita CYP3A byla signifikantně zvýšena u skupin NDP28 a VDP3 o 30 % respektive o 27 % ve srovnání s kontrolou (graf 11).



**Graf 11** – Vliv potravy obohacené VDP a NDP po dobu 3 nebo 28 dní na specifické aktivity vybraných CYP v jaterní mikrosomální frakci obézních myši. Kontrola – myši po aplikaci standardní stravy, VDP28 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,1 % po dobu 28 dní, NDP28 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,01 % po dobu 28 dní a VDP3 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,1 % po dobu 3 dnů. Data jsou vyjádřena jako průměr ± s.o. z experimentů se směsnými mikrosomálními vzorky (11 zvířat) prováděných v triplicátech. Signifikantně zvýšené nebo snížené hodnoty oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ) jsou označeny hvězdičkou.

Kvantifikace jednotlivých mRNA myších CYP v jaterní mikrosomální frakci ukázala signifikantní zvýšení u *Cyp1a2*, *Cyp2a5*, *Cyp2c29*, *Cyp2e1*, *Cyp3a11* a *Cyp3a13* u skupiny NDP28 ve srovnání s kontrolou. Expres těchto genů (vyjma *Cyp2e1* a *Cyp3a11*), stejně jako *Cyp2d22* byla významně zvýšena také u skupiny VDP3. Nejmarkantnější indukce byla pozorována v případě *Cyp3a13*, jehož exprese mRNA vzrostla 3,7 krát a 4,3 krát u skupiny NDP28, respektive u skupiny VDP3 ve srovnání s kontrolou. Dlouhodobé podávání VDP výrazně expresi mRNA vybraných CYP neovlivnilo (graf 12).



**Graf 12** – Vliv potravy obohacené VDP a NDP po dobu 3 nebo 28 dní na expresi mRNA vybraných CYP v jaterní mikrosomální frakci obézních myší. Kontrola – myši po aplikaci standardní stravy, VDP28 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,1 % po dobu 28 dní, NDP28 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,01 % po dobu 28 dní a VDP3 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,1 % po dobu 3 dnů. mRNA data představují průměr ± s.o. ze šesti jednotlivých zvířat. Signifikantně zvýšené nebo snížené hodnoty oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ) jsou označeny hvězdičkou.

#### 5.6.4 Stanovení enzymových aktivit a exprese mRNA jednotlivých forem CYP ve střevní mikrosomální frakci u obézních myší – vliv P

V mikrosomální frakci tenkého střeva u obézních myší byly z důvodu nedostatku vzorků testovány pouze dvě specifické aktivity. Zatímco specifická aktivita CYP3A vzrostla až o 79 % oproti kontrole u skupiny NDP28, aktivita CYP2C/2C19 byla mírně snížena u skupin VDP28 a VDP3 (data nejsou ukázána).

Na druhou stranu, mRNA bylo měřeno u všech sledovaných CYP a jejich hladiny se v rámci skupin signifikantně lišily (tabulka 12). Pokud srovnáme experimentální skupiny se skupinou kontrolní, došlo ke snížení exprese *Cyp2c29* u skupin VDP28 a VDP3 o 71 % respektive o 81 %. Krátkodobé podávání VDP zapříčinilo signifikantní snížení exprese *Cyp2c29*, *Cyp2d22* a *Cyp3a13*. Expres střevního *Cyp2a5* a *Cyp2e1* byla signifikantně snížena u všech tří experimentálních skupin. Naopak významná indukce střevního *Cyp3a11* byla pozorována pouze u skupiny NDP28.

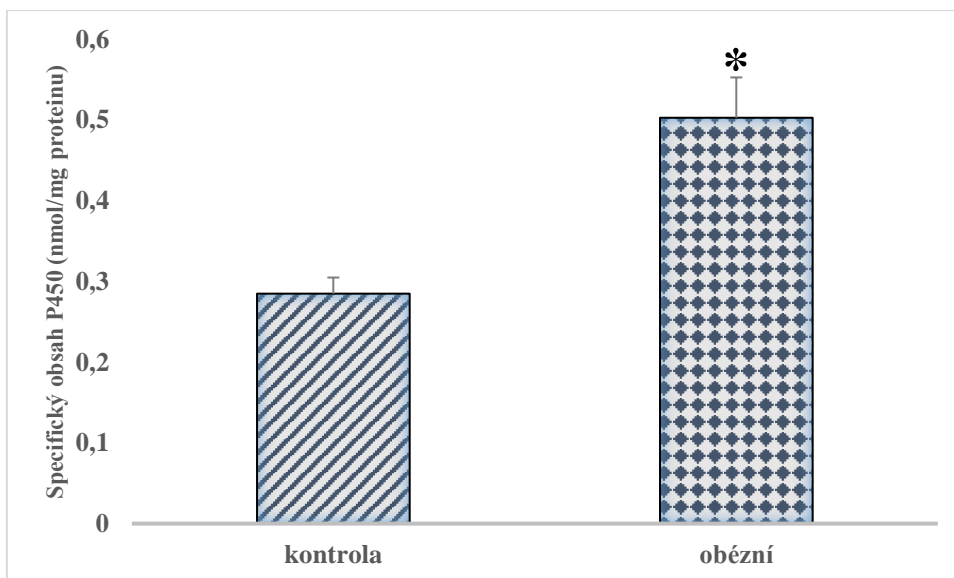
**Tabulka 12** – Vliv potravy obohacené VDP a NDP po dobu 3 nebo 28 dní na expresi mRNA vybraných CYP v mikrosomální frakci tenkého střeva u obézních myši. Kontrola – myši po aplikaci standardní stravy, VDP28 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,1 % po dobu 28 dní, NDP28 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,01 % po dobu 28 dní a VDP3 – myši po aplikaci P v koncentraci 0,1 % po dobu 3 dnů. mRNA data představují průměr ± s.o. ze šesti jednotlivých zvířat. Signifikantně zvýšené nebo snížené hodnoty oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ) jsou označeny hvězdičkou.

		mRNA			
		Kontrola	VDP28	NDP28	VDP3
tenké střevo	<i>Cyp1a1</i>	100 ± 21,57	137 ± 26,74	169 ± 54,34	109 ± 33,89
	<i>Cyp2a5</i>	100 ± 21,60	249 ± 93,23*	656 ± 103,67*	492 ± 123,44*
	<i>Cyp2c29</i>	100 ± 43,05	29 ± 18,08*	70 ± 33,10	19 ± 4,09*
	<i>Cyp2d22</i>	100 ± 25,43	93 ± 22,88	84 ± 11,15	34 ± 12,10*
	<i>Cyp2e1</i>	100 ± 22,10	312 ± 84,71*	484 ± 79,56*	157 ± 15,64*
	<i>Cyp3a11</i>	100 ± 20,79	151 ± 78,18	204 ± 59,30*	71 ± 28,83
	<i>Cyp3a13</i>	100 ± 23,59	159 ± 49,90	122 ± 41,57	59 ± 16,61*

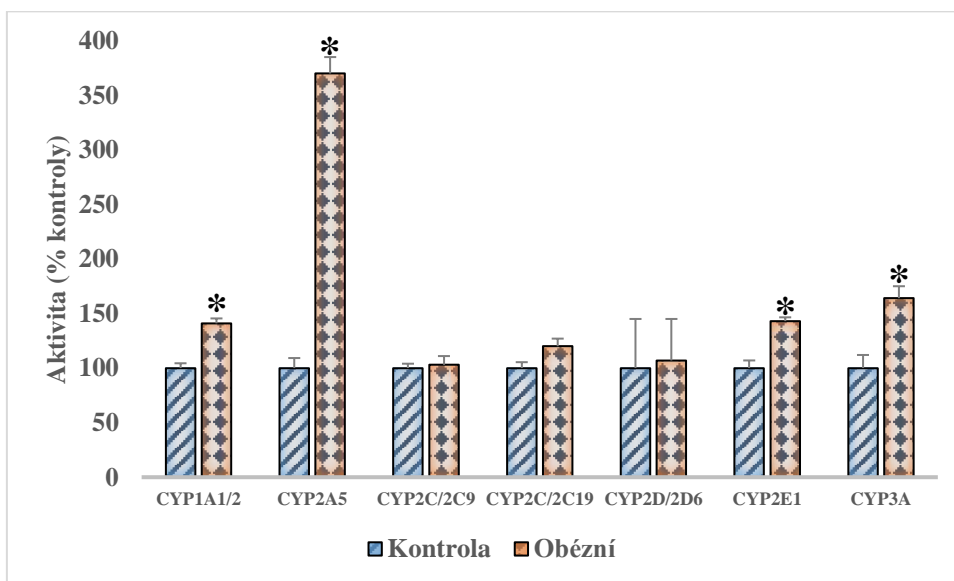
## 5.7 Vliv samotné obezity na vlastnosti CYP v jaterní a střevní mikrosomální frakci *in vivo*

### 5.7.1 Stanovení enzymových aktivit jednotlivých forem CYP v myši jaterní mikrosomální frakci

U obézních myši, jimž byl aplikován GS, byl pozorován zvýšený specifický obsah CYP (graf 13). Abychom získali informace o podílu jednotlivých forem CYP zodpovědných za tento nárůst, byly studovány specifické aktivity těchto forem (graf 14). Enzymové aktivity forem CYP, které patří do podrodin CYP2C a CYP2D se u normálních a obézních myši nelišily. Na druhou stranu, aktivity CYP1A2, CYP2A5, CYP2E1 a CYP3A byly signifikantně zvýšeny u obézních myši ve srovnání s kontrolními myšmi. Nejvýznamnější nárůst s hlediska metabolismu léčiv byl pozorován v případě stanovení aktivity CYP3A (až na 150 %). Nicméně nejmarkantnější zvýšení ze všech studovaných CYP bylo zjištěno u aktivity CYP2A5 (ortologní k lidskému CYP2A6). Jeho aktivita byla 3,5 krát vyšší u obézních myši ve srovnání s myšmi kontrolními.



**Graf 13** – Specifický obsah CYP (nmol/mg proteinu) v jaterní mikrosomální frakci kontrolních a obézních myší. Hodnoty představují průměr  $\pm$  s.o. z experimentů se směsnými mikrosomálními vzorky (11 kontrolních; 11 obézních) prováděných v triplicátech. \*Statisticky významné ( $p \leq 0,05$ ).



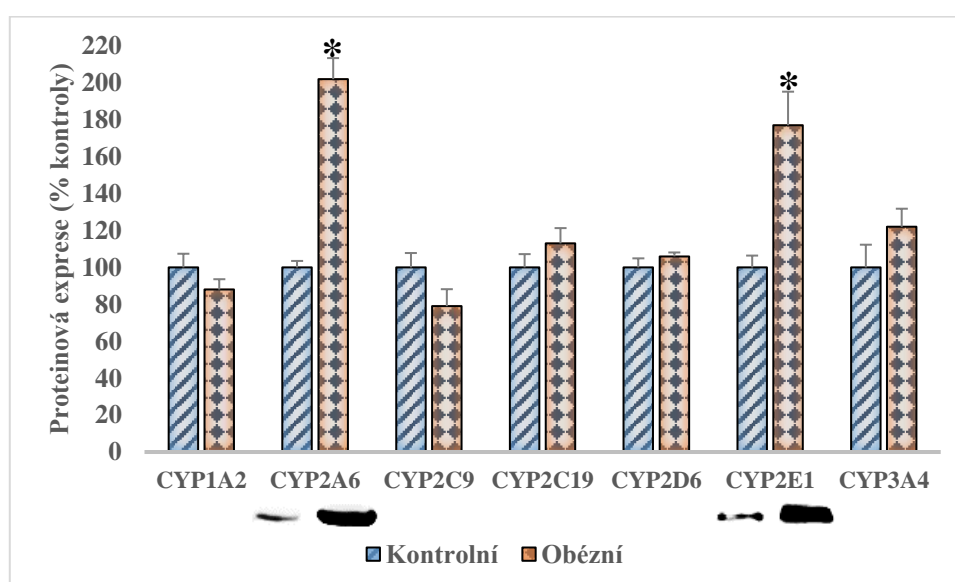
**Graf 14** – Enzymová aktivita jednotlivých forem CYP ve směsné jaterní mikrosomální frakci kontrolních (11 zvířat) a obézních myší (11 zvířat). Hodnoty představují průměr  $\pm$  s.o. z experimentů prováděných v triplicátech. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly. Signifikantní zvýšení ve srovnání s kontrolou ( $p \leq 0,05$ ) je označeno hvězdičkou.



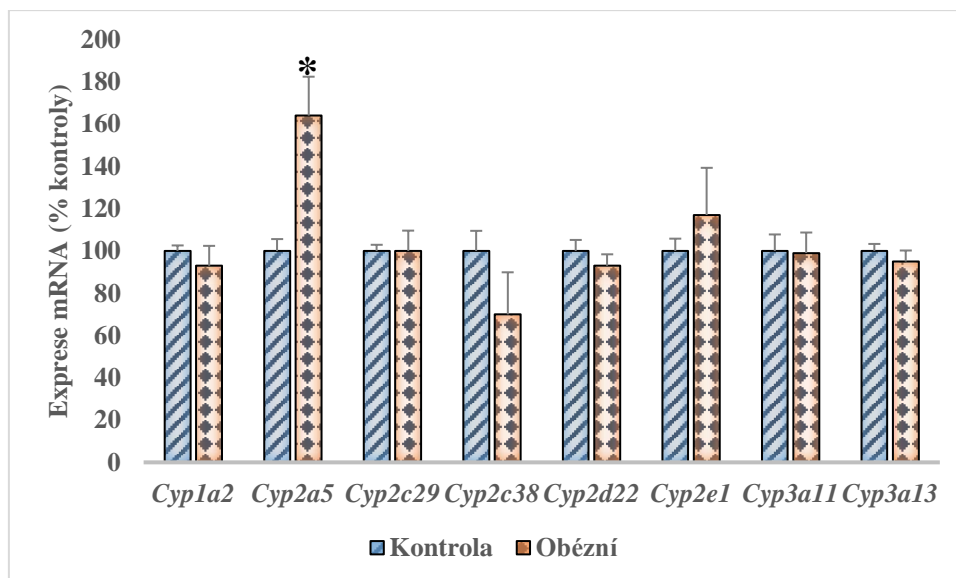
### 5.7.2 Srovnání exprese proteinů CYP a odpovídající mRNA v myší jaterní mikrosomální frakci u normálních a obézních myší

Expresse jaterních forem CYP na úrovni proteinů byla více či méně v souladu s měřenými aktivitami (srov. graf 14 a graf 15). Zvýšená exprese proteinu CYP2A5 (odpovídající aktivitě enzymu CYP2A, konkrétně 7-hydroxylase kumarinu), která byla stanovena metodou Western blotu, korespondovala se zvýšenou aktivitou. Zvýšená exprese byla pozorována také u proteinů CYP2E1 a 3A (graf 15).

Na hladině mRNA (graf 16) bylo zjištěno pro většinu forem CYP přibližně stejné množství ve srovnání kontrolních a obézních myší. Na druhou stranu, zvýšená exprese genu *Cyp2a5* byla v souladu s proteinovou expresí a enzymovou aktivitou. Trend zvýšené exprese mRNA *Cyp2e1* byl také pozorován, avšak nesignifikantní.



**Graf 15** – Proteinová exprese jednotlivých forem CYP ve směsné jaterní mikrosomální frakci kontrolních (11 zvířat) a obézních myší (11 zvířat). Hodnoty představují průměr  $\pm$  s.o. z experimentů prováděných v triplikátech. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly. Signifikantní zvýšení ve srovnání s kontrolou ( $p \leq 0,05$ ) je označeno hvězdičkou.



**Graf 16** – Expres mRNA jednotlivých forem CYP v jaterní mikrosomální frakci kontrolních (6 jednotlivých zvířat) a obézních myší (6 jednotlivých zvířat). Hodnoty představují průměr  $\pm$  s.o. z experimentů prováděných v triplikátech. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly. Signifikantní zvýšení ve srovnání s kontrolou ( $p \leq 0,05$ ) je označeno hvězdičkou.

### 5.7.3 Změny exprese vybraných CYP v mikrosomální frakci tenkého a tlustého střeva u myší

V tenkém střevě se hodnoty exprese CYP lišily od těch získaných v jaterní mikrosomální frakci; na hladině mRNA nebyly u stanovovaných CYP zjištěny žádné signifikantní změny. Množství odpovídajícího proteinu v tenkém střevě bylo také stanoveno, ale pouze pro několik forem CYP, a to z důvodu nedostatku vzorků. Expres CYP2A5, CYP2C a CYP3A odpovídaly hladině mRNA příslušných genů. Jinými slovy, nevykazovaly významné změny. U těchto tří enzymů byla stanovena také aktivita, která stejně jako u výsledků exprese nevykazovala žádné signifikantní změny (tabulka 13).

Vzhledem k tomu, že výsledky exprese a aktivity CYP nevykazovaly žádné významné změny v mikrosomální frakci tenkého střeva mezi kontrolními a obézními myši, byla analogicky provedena studie i v mikrosomální frakci tlustého střeva. Tato studie byla provedena z důvodu získat komplexnější obraz na expresi a aktivitu forem CYP podél gastrointestinálního traktu. Zajímavé je, že v tlustém střevě byl pozorován nárůst exprese mRNA *Cyp2e1*, ale také snížení exprese *Cyp3a11* (tabulka 13).

**Tabulka 13** – Enzymové aktivity, exprese proteinu a mRNA forem CYP v tenkém a tlustém střevě kontrolních a obézních myši.

	Enzymové aktivity		Hladiny proteinů		mRNA		
	Kontrolní myši	Obézní myši	Kontrolní myši	Obézní myši	Kontrolní myši	Obézní myši	
tenké střevo	<b>1A1/2</b>	n.m.	n.m.	n.d.	n.d.	<b>1a1</b> 100 ± 5,6	115 ± 7,9
	<b>2A5</b>	100 ± 5,6	103 ± 8,9	100 ± 5,1	99 ± 7,5	<b>2a5</b> 100 ± 2,4	115 ± 7,8
						<b>2b10</b> 100 ± 2,9	95 ± 9,8
	<b>2C/2C9</b>	n.d.	n.d.	100 ± 7,6	99 ± 2,9	<b>2c29</b> 100 ± 6,5	138 ± 18,6
	<b>2C/2C19</b>	100 ± 9,4	135 ± 12,6	100 ± 6,6	109 ± 8,3	<b>2c38</b> 100 ± 5,2	91 ± 15,6
	<b>2D/2D6</b>	n.m.	n.m.	n.d.	n.d.	<b>2d22</b> 100 ± 5,8	136 ± 23,4
	<b>2E1</b>	n.m.	n.m.	100 ± 4,8	111 ± 7,3	<b>2e1</b> 100 ± 7,7	114 ± 6,8
	<b>3A</b>	100 ± 8,9	136 ± 14,8	100 ± 9,1	122 ± 8,9	<b>3a11</b> 100 ± 3,3	92 ± 6,6
					<b>3a13</b> 100 ± 5,2	90 ± 7,6	
tlusté střevo	<b>1A1/2</b>	n.m.	n.m.	n.d.	n.d.	<b>1a1</b> 100 ± 5,4	101 ± 3,6
	<b>2A5</b>	n.m.	n.m.	100 ± 10,3	86 ± 8,9	<b>2a5</b> 100 ± 1,8	98 ± 11,3
						<b>2b10</b> 100 ± 3,1	102 ± 4,4
	<b>2C/2C9</b>	n.m.	n.m.	100 ± 8,6	80 ± 10,9	<b>2c29</b> 100 ± 4,8	92 ± 4,1
	<b>2C/2C19</b>	n.m.	n.m.	100 ± 15,9	144 ± 18,1		
	<b>2D/2D6</b>	n.m.	n.m.	n.d.	n.d.	<b>2d22</b> 100 ± 1,7	106 ± 4,8
	<b>2E1</b>	n.m.	n.m.	100 ± 9,5	77 ± 9,3	<b>2e1</b> 100 ± 5,6	119 ± 5,0*
	<b>3A</b>	n.m.	n.m.	100 ± 7,6	107 ± 7,1	<b>3a11</b> 100 ± 2,1	72 ± 14,7*
					<b>3a13</b> 100 ± 4,5	109 ± 28,5	

Enzymové aktivity a hladiny proteinů představují průměr ± s.o. z experimentů prováděných v triplicátech měřených ve směsných vzorcích mikrosomální frakce (11 kontrolních a 11 obézních myši). Data mRNA představují průměr ± s.o. z 6 jednotlivých zvířat. Data jsou vyjádřena jako procento kontroly. Kvůli nedostatku experimentálního materiálu mohla být srovnávána pouze některá data v mikrosomální frakci tenkého a tlustého střeva. Signifikantní změny v porovnání s kontrolou ( $p \leq 0,05$ ) jsou označeny hvězdičkou. n.m. – neměřeno; n.d. – nedetekováno.

## 6 DISKUZE

Jedna ze studií, kterou předkládám ve své disertační práci, se zabývá vlivem přípravků zlatobýlu obecného na aktivitu enzymů CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4. Výsledky získané s jaterními mikrosomy by mohly odpovědět na otázku, zda jsou vlivem přípravků zlatobýlu obecného ovlivněny jaterní enzymové aktivity; studie s primárními kulturami lidských hepatocytů by zase mohla naznačit potenciální indukci nebo inhibici CYP v lidských játrech. Výsledky nám ukázaly, že zlatobýl obecný významně neovlivňuje aktivity biotransformačních enzymů, a to jak v mikrosomální frakci jater, tak v lidských hepatocytech. Expres proteinů, které odpovídají studovaným CYP v primárních kulturách lidských hepatocytů, rovněž potvrzuje, že za daných experimentálních podmínek ke změnám hladin těchto proteinů nedochází.

V souvislosti s rozšiřováním alternativních a doplňkových přípravků po celém světě v poslední době neustále roste poptávka po bylinných přípravcích a doplňcích stravy. Z důvodu rostoucího počtu aplikací těchto přípravků roste i pravděpodobnost současného užívání léčiv<sup>169,170</sup>. Čaje z bylin se užívají jako doplňky stravy, prevence proti onemocnění, ale také k léčbě nemocí<sup>171</sup>. Velmi oblíbeným nápojem je zelený čaj. Vzhledem k jeho diuretickému účinku je však velmi důležité sledovat současnou konzumaci tohoto čaje a některých léčiv<sup>172</sup>. Bylinné přípravky s diuretickými účinky by mohly mít vliv na aktivitu biotransformačních enzymů, čímž by mohly ovlivňovat i farmakokinetiku a účinnost léčiv. Tento důvod byl právě impulsem k provedení této studie, která sledovala vliv zlatobýlu obecného (jedné ze složek přípravku Urinal Akut) na vlastnosti enzymů metabolizující léčiva.

Další přírodním zdrojem flavonoidů, kterým jsme se zabývali, byla brusnice borůvka, která je považována za jeden z nejbohatších zdrojů antokyanů. Existuje stále více důkazů, které naznačují, že strava bohatá na bobulové ovoce chrání organismus proti rakovině, kardiovaskulárním onemocněním i neurodegenerativním chorobám<sup>35</sup>. V roce 2011 vyšla zajímavá studie<sup>173</sup>, která zkoumala, zda extrakt z brusnice borůvky zmírní svědění u myšího modelu chronické kontaktní alergické dermatitidy. Z této studie vyplývá, že brusnice borůvka může být prospěšná také při léčbě chronického svědění, které může nastat u pacientů trpících zánětlivými kožními chorobami, jako je atopická dermatitida.

My jsme se v naší studii zabývali vlivem vzorku brusnice borůvky na aktivity jaterních CYP. Vzorek brusnice borůvky byl použit pro zjištění potenciální inhibice nejdůležitějších enzymů CYP pro metabolismus warfarinu (CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4). Při použití koncentrace 0,006 mg antokyanů na 1 ml reakční směsi (odpovídá asi 1 kg plodů borůvek) a více došlo k signifikantnímu snížení těchto aktivit za použití substrátu warfarinu. V případě použití specifických substrátů pro stanovení aktivit CYP1A2 a CYP3A4 (fenacetin, respektive testosteron) byla pozorována inhibice závislá na koncentraci; tj. čím vyšší koncentrace antokyanů byla v reakční směsi přítomna, tím vyšší inhibice studovaného enzymu byla pozorována. Existuje *in vitro* studie, která prokázala inhibici aktivity CYP3A a CYP2C9 vlivem borůvkového džusu<sup>174</sup>. Woll<sup>175</sup> ve své diplomové práci popsala, že extrakt z brusnice borůvky ovlivnil aktivity CYP1A a CYP3A v prasečí mikrosomální frakci jater *in vitro*, v závislosti na pohlaví. I když je orální biologická dostupnost antokyanů a antokyanidinů nízká, sloučeniny obsažené v potravě mohou působit jako účinné inhibitory za předpokladu, že jsou schopny proniknout do intestinálních epitelových buněk. Proto vliv antokyanů a antokyanidinů na metabolické zpracování léčiv pomocí CYP3A4 je také závislý na transportu do epitelu střevních buněk<sup>176</sup>.

Odvar z ibišku je velmi populární zejména při přípravě domácích osvěžujících nápojů a používá se také jako lék na různá onemocnění. Zvláště pozoruhodné jsou různé vědecké poznatky, které podporují jeho diuretický a antihypertenzní potenciál. Z tohoto hlediska není neobvyklé, že pacienti, kteří jsou léčeni na hypertenzi, současně užívají také nápoje z ibišku súdánského, a to bez ohledu na možnost interakcí mezi touto bylinou a léčivem<sup>55</sup>.

Studie, která používala etanolický extrakt aplikovaný na lidské mikrosomy, vedla k závěru o inhibici všech studovaných aktivit enzymů CYP, včetně CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4<sup>54</sup>. Dřívější studie, která použila potkany Wistar pro *in vivo* experiment sledující vliv různých dávek vodného extraktu z ibišku súdánského na některé CYP zjistila, že ani jedna z dávek neovlivnila jak celkový obsah CYP, tak aktivity studovaných CYP. Mezi studovanými enzymy CYP byly také CYP1A2 a CYP3A4. Důvod, který vede k odlišnosti výsledků aktivit je pravděpodobně provedení experimentů za různých podmínek a také použití odlišného extraktu (etanolický vs. vodný a důsledky vlivu etanolu na enzymové aktivity)<sup>177</sup>.

Naše studie se zabývala vlivem vodných roztoků odvaru a výluhu z ibišku súdánského na lidskou mikrosomální frakci jater. Z výsledků plyne, že došlo k signifikantnímu snížení aktivity CYP3A4. Další studované aktivity (CYP1A2 a CYP2C9)

ovlivněny nebyly. Všechny aktivity byly měřeny pomocí substrátu warfarinu. Současné podávání vodných roztoků odvaru či výluhu z ibišku súdánského a léčiv metabolizovaných CYP3A4 by teoreticky mohlo ovlivnit metabolismus daného léčiva. Nicméně je třeba podotknout, že tato bylina byla použita pro ovlivnění pouze nejdůležitějších enzymů, které se zapojují do metabolismu warfarinu. Vzhledem k tomu, že S-warfarin je specifickým substrátem pro stanovení aktivity CYP2C9, bylo by vhodné provést stanovení aktivit CYP1A2 a CYP3A4 také s jejich specifickými substráty; tj. fenacetinem pro CYP1A2, testosteronem pro CYP3A4. Stanovení aktivity CYP3A4 pomocí substrátu testosteronu by bylo vhodné provést zejména proto, aby se potvrdila zjištěná inhibice aktivity v případě použití warfarinu jako substrátu.

Brusinky jsou dalším zdrojem účinných látek, zejména flavonoidů. Brusinky by mohly být klasifikovány jako „funkční potravina“, a to zejména proto, že poskytují výhody nad rámec základní výživy a mohou hrát také roli při snižování nebo minimalizování rizika některých onemocnění a dalších zdravotních stavů<sup>35</sup>. Nicméně je třeba znát všechny údaje z *in vivo*, *in vitro* i klinických studií, které dohromady mohou naznačit možnost vzniku interakcí mezi potravinou a léčivem jak u normálních, tak obézních jedinců, včetně nežádoucích účinků. Podle *in vitro* údajů z literatury je zřejmé, že brusinkový džus má potenciál inhibovat aktivity CYP v lidských jaterních mikrosomech (CYP3A/midazolam<sup>178</sup>, CYP2C9/warfarin<sup>179</sup> a CYP2C9/diklofenak<sup>180</sup>). Nicméně se ukázalo, že brusinkový džus neinhibuje CYP2C9 v takovém množství ve srovnání s jinými nápoji, jako je grepový džus, džus z granátových jablek nebo čaj; naopak jeho potenciál inhibovat aktivitu CYP3A4 *in vitro* se zdá být podobný nebo dokonce lepší<sup>181</sup>.

Na druhou stranu byly pozorovány rozdíly mezi výsledky *in vitro* a *in vivo* studií. I přesto, že vlivem brusinkového džusu dochází k inhibicím CYP za podmínek *in vitro*, neexistují žádné klinické studie, které by ukazovaly, že by metabolismus midazolamu, warfarinu či diklofenaku byl inhibován příslušnými enzymy (CYP3A4, respektive CYP2C9)<sup>178-180</sup>. Pokus o objasnění rozdílů mezi výsledky za *in vitro* a *in vivo* podmínek byl uveden v přehledném článku<sup>181</sup> a vychází především z nízké biologické dostupnosti flavonoidů za *in vivo* podmínek.

Existuje mnoho složek brusinkového extraktu, nicméně hlavním cílem této studie bylo zjistit vliv brusinkového extraktu jako celku na expresi a aktivitu CYP v játrech a tenkém střevě normálních a obézních myší. Byla pozorována přímá korelace mezi mRNA, proteinovou expresí a aktivitou CYP3A a CYP2E1 u normálních myší. V případě těchto

forem CYP byl obdržen jasný nárůst v expresi mRNA, proteinu a aktivitě. Bylo zjištěno, že mnoho flavonoidů je silnými induktory různých CYP<sup>182-184</sup>. Mechanismus indukce CYP vlivem flavonoidů by mohl být vysvětlen několika cestami, včetně přímé stimulace genové exprese prostřednictvím specifického receptoru a/nebo stabilizace mRNA nebo proteinu<sup>185,186</sup>. Je také známo, že indukce je závislá na koncentraci flavonoidů, například při nižších koncentracích mohou flavonoidy působit jako antagonisté aryluhlovodíkového receptoru (AhR), které se váží na receptor bez aktivace transkripčního faktoru, zatímco při vyšších koncentracích mohou stejné flavonoidy fungovat jako agonisté AhR modulující genovou expresi<sup>187</sup>. Také mezidruhové rozdíly mohou hrát roli<sup>188</sup>. Kromě toho nelze vyloučit ani „crosstalk“ mezi receptory a možné zapojení regulačních drah, jako je Wnt/ $\beta$ -kateninová regulační dráha v expresi CYP<sup>189,190</sup>.

Je také třeba poznamenat, že experimenty popsané v této práci byly provedeny *in vivo* na myších jako experimentálním modelem. V tomto experimentu byly studovány jak exprese mRNA, proteinu, tak enzymová aktivita. Nárůst exprese mRNA *Cyp3a* a odpovídajícího množství proteinu a zvýšení aktivity, které bylo zjištěno v jaterních vzorcích u normálních myší, může být vysvětlen vlivem brusinkového extraktu na složité regulační dráhy, jako tomu bylo u kvercetinu v práci<sup>191</sup>. U modelu GS myší byla pozorována zvýšená aktivita CYP3A i genová exprese. Nicméně v tenkém střevě GS myší je situace odlišná, tzn., že byla pozorována snížená exprese mRNA *Cyp3a* a odpovídajícího proteinu. Tento výsledek může být vysvětlen odlišnou regulací exprese proteinů CYP ve střevě a v játrech; také přítomnost střevní mikroflóry může hrát roli<sup>192</sup>.

Interpretace významného nárůstu mRNA *Cyp2e1* a stejně tak exprese proteinu a aktivity u normálních myší může pramenit z toho, že tento protein je také regulován mnoha drahami, včetně transkripční aktivace, stabilizace mRNA, zvýšené účinnosti translace mRNA, snížení degradace proteinu a stabilizace proteinu<sup>190,192,193</sup>. V tenkém střevě byl pozorován pouze trend zvýšení mRNA *Cyp2e1* u normálních myší a exprese proteinu u normálních i obézních myší. U ostatních studovaných forem CYP nebyly prokázány žádné významné změny, ačkoliv zde byly některé trendy jako například zvýšení exprese proteinu a mRNA *Cyp2c* v jaterních vzorcích u normálních i obézních myší. Výsledky ukazují, že alespoň v některých případech existuje vliv brusinkového extraktu na expresi a aktivitu forem CYP (CYP3A, CYP2E1) v jaterních a střevních mikrosomech normálních myší. Mechanismy těchto změn jsou, jak již bylo zmíněno, velmi složité a měly by být v budoucnu studovány pomocí metod zaměřených na jednotlivé regulační dráhy. Odpověď na hlavní otázku týkající se možného vlivu brusinek na farmakokinetiku léčiv je pravděpodobně

jasnější. Podle výsledků naší *in vivo* studie zaměřené na jednotlivé CYP u experimentálních zvířat a stejně tak podle výsledků studií vlivu brusinkového džusu na metabolismus různých léčiv u člověka (shrnutí v<sup>181</sup>) se nezdá, že by mohlo dojít ke klinicky významným lékovým interakcím, pokud jsou dávky jak léčiva, tak ovoce v rozsahu běžného nebo doporučeného použití. Změny v potravě mohou nicméně vždy ovlivnit expresi a aktivitu jaterních enzymů.

Cílem *in vivo* studie, která se zabývala vlivem katechinů ze zeleného čaje v různých dávkách na CYP u myši, bylo přinést komplexní informace o interakcích studovaných CYP s extraktem ze zeleného čaje v jaterní i střevní mikrosomální frakci normálních a obézních myši. Pro tento experiment byla použita komerčně dostupná forma extraktu ze zeleného čaje, Polyfenon 60 (P), který byl schválen pro klinické studie (pro simulaci konzumace nápoje ze zeleného čaje a/nebo doplňků stravy obsahujících P). Katechiny jsou obvykle užívány orálně, a proto byla tato cesta vybrána jako nejvhodnější. Tři testované dávky reprezentovaly tři možné situace: pravidelná konzumace 2–3 šálků zeleného čaje za den (10 mg katechinů/kg tělesné váhy, tj. přibližně 800 mg/člověka) a nadměrná konzumace extraktu ze zeleného čaje v doplňcích stravy (100 mg katechinů/kg tělesné váhy, tj. přibližně 8 g/člověka) po dlouhou (28 dní) nebo krátkou (3 dny) dobu. Jedna kapsle doplňku stravy může obsahovat až 1 000 mg katechinů, zatímco jeden šálek zeleného čaje obsahuje 200–300 mg katechinů<sup>194</sup>. U starší populace je pravděpodobnější užívání doplňků stravy a/nebo přírodních produktů<sup>195</sup>, a proto byly sedmiměsíční myši použity jako model této populace.

Všechny polyfenoly v potravě, včetně katechinů, jsou v lidském těle značně metabolizovány působením biotransformačních enzymů<sup>196,197</sup>, a tímto způsobem mohou katechiny soutěžit s jinými substráty (např. léky, jinými xenobiotiky a některými endogenními sloučeninami). Kromě toho katechiny mohou inhibovat biotransformační enzymy také nekompetitivním mechanismem<sup>198,199</sup>. Navíc katechiny jsou schopné zvyšovat expresi různých biotransformačních enzymů prostřednictvím několika signálních transdukčních drah. Z tohoto důvodu může vysoký příjem katechinů ovlivnit metabolismus a účinnost léčiv a jiných xenobiotik. V důsledku výše uvedených skutečností byla modulace hladin těchto enzymů vlivem katechinů a možných lékových interakcí intenzivně studována<sup>200</sup>.

Jaterní a střevní vzorky byly studovány současně, abychom obdrželi komplexnější informace, a také proto, že většina dřívějších studií, které se zabývaly vlivem katechinů, se zaměřila pouze na jaterní vzorky, zatímco střevní byly vynechány.



U skupiny NDP28, která simuluje pravidelnou konzumaci zeleného čaje, bylo zjištěno zvýšení aktivit jaterních enzymů CYP u normálních myši, ortologů lidských CYP1A2, CYP2E1 a CYP3A4 oproti kontrole. Myši z této skupiny vykazovaly také zvýšenou aktivitu myšního enzymu CYP2A5 ve střevních vzorcích. Vzhledem k tomu, že pozorované změny v aktivitách biotransformačních enzymů u normálních jedinců byly mírné, dá se předpokládat, že pravidelná konzumace zeleného čaje nebude mít vliv na farmakokinetiku a účinnost léčiv u normálních (hubených) pacientů. V souladu s touto skutečností extrakt ze zeleného čaje (přibližně 10 mg/kg/den, po dobu 14 dní) významně nezměnil vlastnosti CYP3A4 a CYP2D6 u lidských dobrovolníků<sup>201</sup>.

Naopak aktivity jaterních forem CYP u obézních myši, forem ortologních k lidským CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP2E1 byly signifikantně sníženy ve srovnání s kontrolou. Snížení hodnot aktivit CYP by mohlo odrážet jejich inhibici vlivem katechinů, která byla obdržena *in vitro*<sup>199</sup>. Nicméně aktivity jaterního a stejně tak střevního enzymu CYP3A, nejdůležitější formy CYP v metabolismu léčiv<sup>103</sup>, byly významně zvýšeny a odpovídaly indukcii mRNA *Cyp3a11* a *Cyp3a13* v játrech. Expres a aktivita CYP3A byla signifikantně vyšší u obézních myši ve srovnání s normálními myši (výsledky v grafu 14 a 15); zvýšená expres a aktivita CYP3A vlivem P by mohla vést k selhání léčby a/nebo k vyššímu výskytu vedlejších účinků u obézních jedinců, kteří pravidelně pijí zelený čaj, protože forma CYP3A4 je zodpovědná za biotransformaci přibližně 50 % všech podávaných léčiv. Navíc zvýšení aktivity lidského CYP3A4 může přispívat ke zvýšenému výskytu potratů u obézních žen, protože CYP3A a také CYP2C jsou podskupiny CYP, které jsou zodpovědné za metabolickou inaktivaci progesteronu, což je hormon podporující těhotenství<sup>202</sup>. Jaterní expres genů *Cyp1a2*, *Cyp2a5*, *Cyp2c29*, ale také expres genů *Cyp2a5*, *Cyp2e1* a *Cyp3a11* ve střevech byla podstatně zvýšená. Naopak expres jaterní formy *Cyp2e1* byla významně snížena. Aktivity a expres mRNA ostatních studovaných biotransformačních enzymů nebyly ovlivněny pravidelným příjmem NDP.

Hubené myši ze skupiny VDP28, která představuje chronické předávkování doplňky stravy s vysokým obsahem katechinů, vykazovaly zvýšení aktivit příslušných ortologů lidských CYP1A2, CYP2C19 a CYP2E1 v jaterních mikrosomech. Aktivity ostatních studovaných jaterních biotransformačních enzymů se od kontrolních vzorků nelišily. U této skupiny ve střevních vzorcích bylo zaznamenáno zvýšení aktivit myšního CYP2A5 (o 180 %) a CYP3A (o 346 %) ve srovnání s kontrolními zvířaty. Tyto výsledky naznačují, že chronická konzumace katechinů v zeleném čaji v extrémně vysokých dávkách by mohla

signifikantně ovlivnit zejména střevní metabolismus xenobiotik. Z tohoto důvodu by mohlo dojít k modulaci biologické dostupnosti a účinnosti některých léků a jiných xenobiotik.

U obézních myší vedlo chronické předávkování katechiny k signifikantnímu snížení aktivit jednotlivých enzymů CYP ortologních k lidským CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP2E1 v jaterních vzorcích. Na úrovni mRNA byla zjištěna indukce *Cyp2a5* a *Cyp2e1* ve vzorcích tenkého střeva. Získané výsledky naznačují, že zejména střevní metabolismus různých léčiv může být ovlivněn extrémně vysokými dávkami katechinů v zeleném čaji, pokud jsou podávány obézním jedincům.

Krátkodobý (3 dny) příjem vysokých dávek katechinů (VDP3) vedl k signifikantnímu nárůstu aktivit jaterních enzymů, ortologů k lidským CYP1A2, CYP2A6, CYP2C19, CYP2E1 a CYP3A4 oproti kontrole. V tenkém střevě byla zjištěna výrazná indukce aktivit ortologů lidských forem CYP2A6, CYP2C19 a především CYP3A4. Tyto výsledky upozorňují na to, že krátkodobá konzumace vysokých dávek katechinů u normálních jedinců by mohla ovlivnit metabolismus léčiv a jiných xenobiotik, zejména v tenkém střevě. Je zajímavé, že dlouhodobý příjem vysokých dávek katechinů má méně výrazný účinek než krátkodobý.

U obézních myší VDP3 zapříčinila signifikantní snížení aktivit jaterních CYP ortologních k lidským CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6. Naopak aktivita a exprese mRNA jaterní CYP3A, respektive *Cyp3a13* byly podstatně zvýšeny. Zatímco mRNA *Cyp2a5* (v játrech a tenkém střevě), *Cyp2c29* (v játrech) a *Cyp2e1* (v tenkém střevě) bylo zvýšeno; mRNA střevních *Cyp2c29*, *Cyp2d22* a *Cyp3a13* bylo sníženo. Aktivity a/nebo exprese dalších biotransformačních enzymů nebyly krátkodobým příjmem VDP ovlivněny. Stejně jako v případě pravidelné konzumace zeleného čaje by jedinci s akutním předávkováním katechinů mohli čelit zvýšenému výskytu vedlejších účinků léčby a/nebo jejímu selhání<sup>103</sup>.

Poslední část této disertace se zabývala vlivem experimentálně navozené obezity na aktivity a exprese hlavních enzymů metabolizující léčiva, tj. jednotlivých forem CYP. Jako model byl použit již zmíněný model myší, jímž byla obezita navozena aplikací GS.

Studie o vlivu obezity na expresi CYP u experimentálních modelů a u lidí se v literatuře vyskytují pouze vzácně. Nejobsáhlejší přehled na toto téma u lidí, jak již bylo zmíněno, byl vypracován autory Brill a kol.<sup>95</sup>. Nebyly ale prezentovány žádné studie, které by systematicky analyzovaly změny mRNA, exprese proteinu a enzymové aktivity jednotlivých CYP a možné důsledky pro metabolismus léčiv u obézních jedinců. V této části

disertace byly sledovány současné změny v mRNA a proteinové expresi a stejně tak změny v aktivitě CYP v myši jaterní a střevní mikrosomální frakci. V tlustém střevě byly pro srovnání stanoveny pouze hladiny mRNA, a to z důvodu nedostatku experimentálního materiálu.

Výsledky ukázaly signifikantní nárůst mRNA jaterní formy *Cyp2a5* odpovídající expresi proteinu CYP2A5 a stejně tak zvýšení enzymové aktivity. Dále byl zjištěn také trend zvyšující se exprese proteinu CYP3A a CYP2E1. Nejasný trend zvyšování exprese proteinu, mRNA a aktivity byl zjištěn u CYP1A. Podle dřívějších údajů z literatury může u hlodavčích modelů obezity, jako jsou myši *ob/ob* nebo obézní Zucker potkani se změnou funkcí leptinového receptoru, dojít ke změně exprese enzymů CYP právě vlivem rozvinuté obezity. Watson a kol.<sup>140</sup> zjistili zvýšenou aktivitu enzymu CYP2A a CYP3A, což je v souladu s našimi daty, zatímco výsledky pro CYP2E1 nebyly jednoznačné. V experimentu s obézními Zucker potkany<sup>139</sup> bylo rovněž zjištěno zvýšení exprese jaterního proteinu a aktivity CYP3A. Souvislost mezi obezitou, genotypem CYP2A6 a kouřením u lidí, konkrétně u čínské populace naznačuje možnou souhru těchto faktorů při rozvoji diabetu II. typu<sup>203</sup>.

Mechanismus indukce enzymu CYP2A u obézních myší je zřejmě složitější. Nedávná zjištění ukazují, že exprese mRNA *Cyp2a5* u myší je zvýšená po expozici různým chemickým hepatotoxinům a také za patofyziologických podmínek (např. za změněného stavu lipidů a energie homeostázy nebo za zvýšené hladiny bilirubinu), v nichž jsou hladiny většiny CYP buď beze změny nebo sníženy<sup>204,205</sup>. Geny myšího *Cyp2a5* a lidského ortologa *Cyp2a6* jsou regulovány složitým a výjimečným způsobem, kde promotorové geny interagují s mnoha transkripčními faktory aktivovanými stresem, jako jsou hnRNP A1 (z angl. heterologous nuclear ribonucleoprotein A1), Nrf2 (z angl. nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2), HNF4 $\alpha$  (z angl. hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ ) nebo AhR (z angl. aryl hydrocarbon receptor)<sup>206</sup>.

Pokud jde o zaznamenané zvýšení exprese mRNA a proteinu jaterního CYP2E1, jakož i o zvýšení odpovídající enzymové aktivity u modelu GS myší, mělo by být zmíněno, že u lidí došlo k významnému zvýšení clearance různých substrátů CYP2E1 u obézních pacientů ve srovnání s pacienty, kteří obezitou netrpí, což naznačuje, i když nepřímo, indukci aktivity CYP2E1 u obézních jedinců<sup>95</sup>. V této souvislosti je třeba připomenout, že aktivita a hladina této formy CYP je regulována kromě transkripční aktivace také posttranslačními mechanismy<sup>207,208</sup>. Zvýšená exprese CYP2E1 byla pozorována po zvýšení spotřeby tuků a sacharidů u potkanů, což vede k metabolickému syndromu a obezitě<sup>209</sup>.

## 7 ZÁVĚRY

Předkládaná disertační práce se zabývá vlivem přírodních látek (zlatobýlu obecného, brusnice borůvky, ibišku súdánského, klikvy velkoplodé a zeleného čaje), ale také vlivem velmi závažné metabolické poruchy, kterou je obezita, na aktivitu, popřípadě proteinovou a genovou expresi nejdůležitějších enzymů I. fáze biotransformace, tj. enzymů CYP.

Z výsledků jednotlivých experimentů vyplývají následující poznatky a závěry:

- Užívání extraktu, odvaru nebo výluhu ze zlatobýlu obecného pravděpodobně významně neovlivňuje metabolismus současně podávaných léčiv za účasti studovaných enzymů CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4.
- Ve vzorku brusnice borůvky bylo zjištěno 10 antokyanů (DEL-glu, DEL-gala, DEL-ara, KYA-gala, KYA-ara, PET-glu, PET-gala, MAL-glu, MAL-gala, PEO-glu) a nejméně 4 antokyanidiny (DEL, KYA, PET, MAL). Inhibiční pokusy ukázaly, že běžná konzumace brusnice borůvky pravděpodobně nevede ke klinicky závažným efektům, nicméně zvýšená konzumace brusnice borůvky by mohla ovlivnit metabolismus léčiv, který je zprostředkován zejména enzymy CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4.
- 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). Užívání odvaru a výluhu z ibišku súdánského pravděpodobně nemá signifikantní vliv na metabolismus warfarinu zprostředkovaný enzymy CYP1A2 a CYP2C9. I když v případě aktivity CYP3A4 byla inhibice zaznamenána, nelze s úplnou jistotou konstatovat, že by tato inhibice byla klinicky významná pro člověka, a to vzhledem k tomu, že warfarin není specifickým substrátem pro CYP3A4 a výsledky nebyly zatím ověřeny.
- V játrech normálních myší krměných extraktem z brusinky byly zjištěny signifikantní změny, konkrétně zvýšení proteinové a genové exprese a aktivity CYP3A a CYP2E1; naproti tomu, v tenkém střevě normálních myší bylo u mRNA

exprese a proteinové exprese pozorováno snížení CYP3A. Na druhou stranu bylo zjištěno, že tyto změny nejsou s největší pravděpodobností klinicky významné u člověka, protože by bylo pravděpodobně potřeba dlouhodobé konzumace brusinek ve velkém množství.

- U modelu GS myši krmených extraktem z brusinky byla stanovena pro hlavní formy CYP proteinová exprese, exprese mRNA a enzymová aktivita. Výsledky studovaných vlastností enzymů CYP v játrech vykazovaly s výjimkou CYP3A, kde došlo ke zvýšení exprese mRNA a aktivity, nesignifikantní změny.
- Podávání extraktu ze zeleného čaje normálním myším *in vivo* v nízkých dávkách způsobilo pouze mírné změny některých aktivit enzymů metabolizujících léčiva. Každodenní konzumace zeleného čaje v rozumném množství se proto zdá být bezpečná a nedají se také předpokládat žádné významné interakce mezi katechiny obsaženými v zeleném čaji a současně podávanými léčivy. Na druhou stranu konzumace vysokého množství P ze zeleného čaje může vést k významné indukci některých biotransformačních enzymů, zejména CYP3A v tenkém střevě a mohla by tedy ovlivnit farmakokinetiku a účinnost podávaných léčiv.
- U modelu GS myši došlo po ovlivnění extraktem ze zeleného čaje k signifikantním změnám (s výjimkou CYP3A k poklesům) některých aktivit a/nebo exprese enzymů metabolizujících léčiva, zejména v játrech, které by mohly mít vliv na farmakokinetiku a účinnost současně užívaných léčiv a jiných xenobiotik.
- mRNA, proteinová exprese a enzymová aktivita CYP u myšího GS modelu jsou ovlivněny obezitou zřejmě složitým způsobem, který může u lidí vést ke změně farmakokinetice léčiv. Model GS myši vykazoval signifikantně zvýšenou expresi a aktivitu myšího CYP2A5 v játrech a trend ke zvýšení byl pozorován také u forem CYP2E1 a CYP3A.

## 8 SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI

### Prvoautorské práce přímo se vztahující k disertaci:

1. Matoušková P, Bártíková H, Boušová I, Szotáková B, Martin J, Skorkovská J, Hanušová V, Tománková V, Anzenbacherová E, Lišková B, Anzenbacher P, Skálová L. Effect of defined green tea extract in various dosage schemes on drug-metabolizing enzymes in mice *in vivo*. *J Funct Foods* 2014; 10: 327–335. IF<sub>2014</sub>: 3,574
2. Tománková V, Lišková B, Skálová L, Bártíková H, Boušová I, Jourová L, Anzenbacher P, Ulrichová J, Anzenbacherová E. Altered cytochrome P450 activities and expression levels in liver and intestines of monosodium glutamate-induced mouse model of human obesity. *Life Sci* 2015; 133: 15–20. IF<sub>2015</sub>: 2,702
3. Tománková V, Vlčková A, Anzenbacher P, Bachleda P, Anzenbacherová E. Užívání přípravků ze zlatobýlu obecného (*Solidago virgaurea*) neovlivňuje metabolismus současně podávaných léčiv. *Klin Farmakol Farm* 2016; 30(1): 5–10.
4. Tománková V, Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Effects of obesity on liver cytochromes P450 in different animal models. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, v recenzním řízení.
5. Lišková B, Anzenbacher P, Tománková V, Jourová L, Boušová I, Skálová L, Matoušková P, Martin J, Anzenbacherová E. Effect of cranberry extract on hepatic and intestinal cytochromes P450 in normal and obese mice – *in vivo* study. *Nutr Res*, v recenzním řízení

### Další spoluautorské publikace z oboru:

1. Briolotti P, Chaloin L, Balaguer P, Da Silva F, Tománková V, Pascussi JM, Duret C, Fabre JM, Ramos J, Klieber S, Maurel P, Daujat-Chavanieu M, Gerbal-Chaloin S. Analysis of glycogen synthase kinase inhibitors that regulate cytochrome P450 expression in primary human hepatocytes by activation of  $\beta$ -catenin, aryl

- hydrocarbon receptor and pregnane X receptor signaling. *Toxicol Sci* 2015; 148(1): 261–275. IF<sub>2015</sub> = 3,854
2. Srovnalová A, Vanduchová A, Švecarová M, Anzenbacherová E, Tománková V, Anzenbacher P, Dvořák Z. Effects of sulforaphane and its S- and R-enantiomers on the expression and activities of human drug-metabolizing cytochromes P450. *J Funct Foods* 2015; 14: 487–501. IF<sub>2015</sub>: 3,574
  3. Vanduchová A, Tománková V, Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Influence of sulforaphane metabolites on activities of human drug-metabolizing cytochrome P450 and determination of sulforaphane in human liver cells. *J Med Food* 2016; 19(12): 1141–1146. IF<sub>2015</sub>: 1,844
  4. Boušová I, Matoušková P, Bártíková H, Szotáková B, Hanušová V, Tománková V, Anzenbacherová E, Lišková B, Anzenbacher P, Skálová L. Influence of diet supplementation with green tea extract on drug-metabolizing enzymes in a mouse model of monosodium glutamate-induced obesity. *Eur J Nutr* 2016; 55(1): 361–371. IF<sub>2015</sub>: 3,467

**Prezentace na konferencích:**

1. Jourová L, Tománková V, Anzenbacherová E, Bártíková H, Boušová I, Anzenbacher P. The influence of cranberry on the activity of cytochromes P450 in mouse liver microsomes. *18<sup>th</sup> Interdisciplinary Czech-Slovak Toxicology Conference (TOXCON 2013)*, 19. – 21.6.2013, Hradec Králové, Česká republika.
2. Anzenbacherová E, Bachleda P, Tománková V, Ulrichová J. Pelargonidin, a typical anthocyanidin, is interacting with cytochrome P450 1A2 in human hepatocytes. *18<sup>th</sup> International Conference on Cytochrome P450*, 18. – 22.6.2013. Seattle, Washington, USA.
3. Ulrichová J, Jourová L, Tománková V, Kosina P, Kopečná-Zapletalová M, Anzenbacherová E. Effect of the procyanidin A2 on activity of cytochromes P450 in human hepatocytes. *54<sup>th</sup> Natural Products Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy*, 13. – 17.7.2013, St. Louis, Missouri, USA.

4. Tománková V, Jourová L, Anzenbacherová E, Bártíková H, Boušová I, Anzenbacher P. The influence of polyphenon E on the activity of cytochromes P450 in mouse liver microsomes. *13<sup>th</sup> International Nutrition & Diagnostics Conference (INDC 2013)*, 26. – 29.8.2013, Olomouc, Česká republika.
5. Anzenbacher P, Jourová L, Tománková V, Bártíková H, Boušová I, Anzenbacherová E. Obese and normal mice differ in enzyme activities of cytochromes P450 after administration of green tea extract. *49<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2013)*, 1. – 4.9.2013, Interlaken, Švýcarsko.
6. Anzenbacher P, Lišková B, Nekvindová J, Tománková V, Jourová L, Bártíková H, Boušová I, Skálová L, Anzenbacherová E. Influence of cranberry and polyphenon E on gene expression of cytochromes P450 (CYP) in mouse liver. *63<sup>rd</sup> Czech and Slovak Pharmacological Days*, 11. – 13.9.2013, Olomouc, Česká republika.
7. Tománková V, Jourová L, Anzenbacherová E, Bártíková H, Boušová I, Anzenbacher P. Normal and obese mice: comparison of activities of liver microsomal cytochromes P450. *20<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO 2014)*, 18. – 22.5.2014, Stuttgart, Německo.
8. Lišková B, Anzenbacher P, Tománková V, Jourová L, Bártíková H, Boušová I, Skálová L, Anzenbacherová E. Influence of american cranberry on gene expression and activity of cytochromes P450 (CYP) in mouse liver. *20<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO 2014)*, 18. – 22.5.2014, Stuttgart, Německo.
9. Kosina P, Pivodová V, Jourová L, Tománková V, Hrbáč J, Anzenbacherová E, Ulrichová J. Vliv flavonolignanů ostropestřce mariánského na vybrané biochemické parametry v *in vivo* studii na králících. *XXIV. Biochemický sjezd*, 18. – 21.9.2014, Bratislava, Slovenská republika.
10. Lišková B, Anzenbacher P, Tománková V, Jourová L, Anzenbacherová E, Bártíková H, Boušová I, Skálová L. Influence of American cranberry on gene



- expression and activity of cytochromes P450 (CYP) in liver of monosodium glutamate-induced mouse. *19<sup>th</sup> Interdisciplinary Czech-Slovak Toxicology Conference (TOXCON 2014)*, 23. – 26.9.2014, Stará Lesná, Slovenská republika.
11. Anzenbacher P, Tománková V, Jourová L, Bártíková H, Boušová I, Skálová L, Anzenbacherová E, Lišková B. Influence of green tea extract in various dosage schemes on gene expression of cytochromes P450 (CYP) in mouse liver. *XXVIII. Xenobiochemické sympóziu*, 17. – 19.6.2015, Kremnica, Slovenská republika.
  12. Tománková V, Ulrichová J, Anzenbacherová E, Anzenbacher P. Little effect of *Solidago virgaurea* L. extract on phase I. biotransformation enzymes in human hepatocytes and human liver microsomes. *13<sup>th</sup> European Meeting of the International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX 2015)*, 22. – 25.6.2015, Glasgow, Skotsko, Spojené království.
  13. Vanduchová A, Tománková V, Anzenbacherová E, Anzenbacher P. HPLC method for determination of sulforaphane in human liver cells treated with this compound *in vitro*. *65<sup>th</sup> Czech and Slovak Pharmacological Days*, 16. – 18.9.2015, Praha, Česká republika.
  14. Tománková V, Vlčková A, Anzenbacher P, Anzenbacherová E. The effect of anthocyanins in blueberry extract on activity of liver cytochromes P450. *21<sup>st</sup> Interdisciplinary Czech-Slovak Toxicology Conference (TOXCON 2016)*, 22. – 24.6.2016, Stará Lesná, Slovenská republika.
  15. Tománková V, Anzenbacher P, Lišková B, Bártíková H, Boušová I, Anzenbacherová E. Navozená obezita ovlivňuje vlastnosti jaterních cytochromů P450. *Konference vědeckých prací studentů DSP*, 14.9.2016, Olomouc, Česká republika.
  16. Anzenbacherová E, Tománková V, Anzenbacher P, Lišková B, Bártíková H, Boušová I. Difference in cytochrome P450 2A5 activity in liver microsomes after application of polyphenols (cranberry and green tea extract). Effect of obesity in monosodium glutamate model of obese mice. *21<sup>st</sup> International Symposium*

*on Microsomes and Drug Oxidations* (MDO 2016), 2. – 6.10.2016, Davis,  
California, USA.

## 9 REFERENCE

1. Stoimenova A. Food supplements in central and eastern European countries. *Acta Med Bulg* 2010;37(1):71-7.
2. Rios-Hoyo A, Gutierrez-Salmean G. New Dietary Supplements for Obesity: What We Currently Know. *Curr Obes Rep* 2016;5(2):262-70.
3. Custodio JM, Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60(6):717-33.
4. Malhotra S, Bailey DG, Paine MF, Watkins PB. Seville orange juice-felodipine interaction: comparison with dilute grapefruit juice and involvement of furocoumarins. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69(1):14-23.
5. Schmidt LE, Dalhoff K. Food-drug interactions. *Drugs* 2002;62(10):1481-502.
6. Saxena A, Parijat Tripathi K, Roy S, Khan F, Sharma A. Pharmacovigilance: Effects of herbal components on human drugs interactions involving Cytochrome P450. *Bioinformation* 2008;3(5):198-204.
7. Mandlekar S, Hong JL, Kong AN. Modulation of metabolic enzymes by dietary phytochemicals: a review of mechanisms underlying beneficial versus unfavorable effects. *Curr Drug Metab* 2006;7(6):661-75.
8. Paine MF, Widmer WW, Hart HL, Pusek SN, Beavers KL, Criss AB, Brown SS, Thomas BF, Watkins PB. A furanocoumarin-free grapefruit juice establishes furanocoumarins as the mediators of the grapefruit juice-felodipine interaction. *Am J Clin Nutr* 2006;83(5):1097-105.
9. Lown KS, Bailey DG, Fontana RJ, Janardan SK, Adair CH, Fortlage LA, Brown MB, Guo W, Watkins PB. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J Clin Invest* 1997;99(10):2545-53.
10. Cencic A, Chingwaru W. The Role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health. *Nutrients* 2010;2(6):611-25.
11. Morrish GA, Pai MP, Green B. The effects of obesity on drug pharmacokinetics in humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011;7(6):697-706.
12. Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. In: *Sbírka zákonů*. 24.4.1997. ISSN 1211-1244.

13. Halsted CH. Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin? *Am J Clin Nutr* 2003;77(4 Suppl):1001S-7S.
14. Česká asociace pro speciální potraviny: Zdravotnické noviny-Trh s potravními doplňky loni stále rostl [online]. [cit. 20.1.2017]. Dostupné z: <http://www.casonline.cz/zdravotnicke-noviny-trh-s-potravnimi-doplanky-loni-dale-rostl>
15. Encyklopedie SÚKL: Jaký je rozdíl mezi lékem a doplňkem stravy? [online]. [cit. 21.2.2017] Dostupné z: <http://www.olecich.cz/encyklopedie/jaky-je-rozdil-mezi-lekem-a-doplankem-stravy>.
16. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 2001;74(4):418-25.
17. Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi M, Krishna D. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol* 2001;33(1):2-16.
18. Tapas AR, Sakarkar D, Kakde R. Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Trop J Pharm Res* 2008;7(3):1089-99.
19. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal* 2013;2013.
20. Erdman JW, Jr., Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, Harnly J, Hollman P, Keen CL, Mazza G, Messina M, Scalbert A, Vita J, Williamson G, Burrowes J. Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. *J Nutr* 2007;137(3 Suppl 1):718S-37S.
21. Tsimogiannis D, Samiotaki M, Panayotou G, Oreopoulou V. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules* 2007;12(3):593-606.
22. Middleton E, Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 1998;439:175-82.
23. Moon YJ, Wang X, Morris ME. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* 2006;20(2):187-210.
24. D'Archivio M, Filesì C, Vari R, Scaccocchio B, Masella R. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *Int J Mol Sci* 2010;11(4):1321-42.
25. De Souza JE, Casanova LM, Costa SS. Bioavailability of phenolic compounds: a major challenge for drug development? *Revista Fitos Eletrônica* 2015;9(1):55-67.

26. Velderrain-Rodriguez GR, Palafox-Carlos H, Wall-Medrano A, Ayala-Zavala JF, Chen CY, Robles-Sanchez M, Astiazaran-Garcia H, Alvarez-Parrilla E, Gonzalez-Aguilar GA. Phenolic compounds: their journey after intake. *Food Funct* 2014;5(2):189-97.
27. Lodhia P, Yaegaki K, Khakbaznejad A, Imai T, Sato T, Tanaka T, Murata T, Kamoda T. Effect of green tea on volatile sulfur compounds in mouth air. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2008;54(1):89-94.
28. Requena T, Monagas M, Pozo-Bayón MA, Martín-Álvarez PJ, Bartolomé B, del Campo R, Ávila M, Martínez-Cuesta MC, Peláez C, Moreno-Arribas MV. Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota. *Trends Food Sci Tech* 2010;21(7):332-44.
29. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79(5):727-47.
30. Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr* 2000;130(11):2765-71.
31. Cassidy A, Minihane A-M. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am J Clin Nutr* 2017;105(1):10-22.
32. Thilakarathna SH, Rupasinghe HPV. Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. *Nutrients* 2013;5(9):3367-87.
33. Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 2001;8(7):797-807.
34. Zanotti I, Dall'Asta M, Mena P, Mele L, Bruni R, Ray S, Del Rio D. Atheroprotective effects of (poly)phenols: a focus on cell cholesterol metabolism. *Food Funct* 2015;6(1):13-31.
35. Neto CC. Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol Nutr Food Res* 2007;51(6):652-64.
36. Hisano M, Bruschini H, Nicodemo AC, Srougi M. Cranberries and lower urinary tract infection prevention. *Clinics (Sao Paulo)* 2012;67(6):661-8.
37. Neto CC, Vinson JA. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, (Eds.). Chapter 6: Cranberry. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor and Francis 2011.
38. Howell AB, Vorsa N, Der Marderosian A, Foo LY. Inhibition of the adherence of P-fimbriated *Escherichia coli* to uroepithelial-cell surfaces by proanthocyanidin extracts from cranberries. *N Engl J Med* 1998;339(15):1085-6.

39. Sobel JD. Bacterial etiologic agents in the pathogenesis of urinary tract infection. *Med Clin North Am* 1991;75(2):253-73.
40. Kowalska K, Olejnik A. Beneficial effects of cranberry in the prevention of obesity and related complications: Metabolic syndrome and diabetes – A review. *J Funct Foods* 2016;20:171-81.
41. Chow HH, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Cordova CA, Chew WM, Xu MJ, Hsu CH, Ranger-Moore J, Alberts DS. Effects of repeated green tea catechin administration on human cytochrome P450 activity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(12):2473-6.
42. Rains TM, Agarwal S, Maki KC. Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review. *J Nutr Biochem* 2011;22(1):1-7.
43. Hara Y. Tea catechins and their applications as supplements and pharmaceuticals. *Pharmacol Res* 2011;64(2):100-4.
44. Maliakal PP, Coville PF, Wanwimolruk S. Tea consumption modulates hepatic drug metabolizing enzymes in Wistar rats. *J Pharm Pharmacol* 2001;53(4):569-77.
45. Seeram NP. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J Agric Food Chem* 2008;56(3):627-9.
46. Kowalczyk E, Krzesinski P, Kura M, Szmigiel B, Blaszczyk J. Anthocyanins in medicine. *Pol J Pharmacol* 2003;55(5):699-702.
47. Bagchi D, Sen CK, Bagchi M, Atalay M. Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry (Mosc)* 2004;69(1):75-80.
48. Cravotto G, Boffa L, Genzini L, Garella D. Phytotherapeutics: an evaluation of the potential of 1000 plants. *J Clin Pharm Ther* 2010;35(1):11-48.
49. McAnulty SR, McAnulty LS, Morrow JD, Khardouni D, Shooter L, Monk J, Gross S, Brown V. Effect of daily fruit ingestion on angiotensin converting enzyme activity, blood pressure, and oxidative stress in chronic smokers. *Free Radic Res* 2005;39(11):1241-8.
50. Gehring A. *The homesteading handbook*. New York: Skyhorse 2011.
51. Chu WK, Cheung SCM, Lau RAW, Benzie IFF. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, (Eds.). Chapter 4, Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor and Francis 2011.
52. Mungole A, Chaturvedi A. Hibiscus sabdariffa L a rich source of secondary metabolites. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2011;6(1):83-7.

53. Kolawole JA, Maduenyi A. Effect of zobo drink (*Hibiscus sabdariffa* water extract) on the pharmacokinetics of acetaminophen in human volunteers. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2004;29(1):25-9.
54. Johnson SS, Oyelola FT, Ari T, Juho H. In vitro inhibitory activities of the extract of *Hibiscus sabdariffa* L. (family Malvaceae) on selected cytochrome P450 isoforms. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2013;10(3):533-40.
55. Ndu OO, Nworu CS, Ehiemere CO, Ndukwe NC, Ochiogu IS. Herb-drug interaction between the extract of *Hibiscus sabdariffa* L. and hydrochlorothiazide in experimental animals. *J Med Food* 2011;14(6):640-4.
56. Kalembe D. Constituents of the essential oil of *Solidago virgaurea* L. *Flavour Fragr J* 1998;13(6):373-6.
57. Dobjanschi L, Antonescu A, Zdrinca M, Muresan M, Vicas L, Micle O, Vicas S. HPLC-MS analysis of flavonoids obtained from *Solidago* sp.(Asteraceae). *Analele Universității din Oradea, Fascicula: Protecția Mediului* 2012;19:75-9.
58. Tománková V, Vlčková A, Anzenbacher P, Bachleda P, Anzenbacherová E. Užívání přípravků ze zlatobýlu obecného (*Solidago virgaurea*) neovlivňuje metabolismus současně podávaných léčiv. *Klin Farmakol Farm* 2016;30(1):5-10.
59. Thiem B, Wesolowska M, Skrzypczak L, Budzianowski J. Phenolic compounds in two *Solidago* L. species from in vitro culture. *Acta Pol Pharm* 2001;58(4):277-81.
60. Grace D, Abraham S, Varghese A, Sathianarayanan S. Absorption and metabolism of xenobiotics: An overview. *Internet J Nutr Wellness* 2008;7(1).
61. Parkinson A. *Biotransformation of Xenobiotics*. New York: McGraw-Hill 2001.
62. Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Drug-Metabolizing Enzymes-An Overview. In: Anzenbacher P, Zanger UM, (Eds.). *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*, Chapter 1, Weinheim: Wiley-VCH; 2012, 1-25.
63. Omiecinski CJ, Vanden Heuvel JP, Perdew GH, Peters JM. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol Sci* 2011;120 Suppl 1:S49-75.
64. Hoffmann MF, Preissner SC, Nickel J, Dunkel M, Preissner R, Preissner S. The Transformer database: biotransformation of xenobiotics. *Nucleic Acids Res* 2014;42(Database issue):D1113-7.
65. Xu C, Li CY, Kong AN. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 2005;28(3):249-68.

66. Perdomo VG, Rigalli JP, Villanueva SS, Ruiz ML, Luquita MG, Echenique CG, Catania VA. Modulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(10):4894-902.
67. Lin L, Yee SW, Kim RB, Giacomini KM. SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14(8):543-60.
68. Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol* 2012;165(5):1260-87.
69. Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 2001;58(5-6):737-47.
70. Furge LL, Guengerich FP. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism and chemical toxicology: An introduction. *Biochem Mol Biol Educ* 2006;34(2):66-74.
71. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1958;75(2):376-86.
72. Garfinkel D. Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* 1958;77(2):493-509.
73. Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* 1962;237:1375-6.
74. Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, Holla V, Helvig C, Falck JR, Farrell G. Human cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 1999;20(1):1-137.
75. Munro AW, Girvan HM, McLean KJ. Variations on a (t)heme--novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Nat Prod Rep* 2007;24(3):585-609.
76. Bell LC, Guengerich FP. Oxidation kinetics of ethanol by human cytochrome P450 2E1. Rate-limiting product release accounts for effects of isotopic hydrogen substitution and cytochrome b5 on steady-state kinetics. *J Biol Chem* 1997;272(47):29643-51.
77. Cederbaum AI. Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. *Redox Biol* 2015;4:60-73.
78. Dorokhov YL, Shindyapina AV, Sheshukova EV, Komarova TV. Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev* 2015;95(2):603-44.
79. Zanger U, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 2013;138(1):103-41.



80. Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, et al. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 1987;6(1):1-11.
81. Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician* 2007;76(3):391-6.
82. Guengerich F. Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv* 2003;3(4):194-204.
83. Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2006;2(6):875-94.
84. Ogu CC, Maxa JL. Drug interactions due to cytochrome P450. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2000;13(4):421-23.
85. Chiney MS, Schwarzenberg SJ, Johnson LA. Altered xanthine oxidase and N-acetyltransferase activity in obese children. *Br J Clin Pharmacol* 2011;72(1):109-15.
86. Ghose R. Clinical consequences of altered drug disposition in obesity. *J Clin Trials* 2012;1:e107.
87. Raunio H, Juvonen R, Pasanen M, Pelkonen O, Paakko P, Soini Y. Cytochrome P4502A6 (CYP2A6) expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998;27(2):427-32.
88. Raunio H, Rahnasto-Rilla M. CYP2A6: genetics, structure, regulation, and function. *Drug Metabol Drug Interact* 2012;27(2):73-88.
89. Raunio H, Rautio A, Gullstén H, Pelkonen O. Polymorphisms of CYP2A6 and its practical consequences. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52(4):357-63.
90. Xu C, Goodz S, Sellers EM, Tyndale RF. CYP2A6 genetic variation and potential consequences. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54(10):1245-56.
91. Abu-Bakar A, Arthur DM, Wikman AS, Rahnasto M, Juvonen RO, Vepsäläinen J, Raunio H, Ng JC, Lang MA. Metabolism of bilirubin by human cytochrome P450 2A6. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;261(1):50-8.
92. Cheng Q, Aleksunes LM, Manautou JE, Cherrington NJ, Scheffer GL, Yamasaki H, Slitt AL. Drug-metabolizing enzyme and transporter expression in a mouse model of diabetes and obesity. *Mol Pharm* 2008;5(1):77-91.
93. Turpeinen M, Zanger UM. Cytochrome P450 2B6: function, genetics, and clinical relevance. *Drug Metabol Drug Interact* 2012;27(4):185-97.

94. Yamanaka H, Nakajima M, Fukami T, Sakai H, Nakamura A, Katoh M, Takamiya M, Aoki Y, Yokoi T. CYP2A6 AND CYP2B6 are involved in nornicotine formation from nicotine in humans: interindividual differences in these contributions. *Drug Metab Dispos* 2005;33(12):1811-8.
95. Brill MJ, Diepstraten J, van Rongen A, van Kralingen S, van den Anker JN, Knibbe CA. Impact of obesity on drug metabolism and elimination in adults and children. *Clin Pharmacokinet* 2012;51(5):277-304.
96. Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52(4):349-55.
97. Johannessen SI, Landmark CJ. Antiepileptic drug interactions - principles and clinical implications. *Curr Neuropharmacol* 2010;8(3):254-67.
98. Steimer W, Zopf K, von Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, Popp J, Messner B, Kissling W, Leucht S. Amitriptyline or not, that is the question: pharmacogenetic testing of CYP2D6 and CYP2C19 identifies patients with low or high risk for side effects in amitriptyline therapy. *Clin Chem* 2005;51(2):376-85.
99. Bertilsson L, Dahl ML, Dalen P, Al-Shurbaji A. Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 2002;53(2):111-22.
100. Jain R, Chung SM, Jain L, Khurana M, Lau SW, Lee JE, Vaidyanathan J, Zadezensky I, Choe S, Sahajwalla CG. Implications of obesity for drug therapy: limitations and challenges. *Clin Pharmacol Ther* 2011;90(1):77-89.
101. Matalova P, Urbanek K, Anzenbacher P. Specific features of pharmacokinetics in children. *Drug Metab Rev* 2016;48(1):70-9.
102. Dostalek M, Court MH, Yan B, Akhlaghi F. Significantly reduced cytochrome P450 3A4 expression and activity in liver from humans with diabetes mellitus. *Br J Pharmacol* 2011;163(5):937-47.
103. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002;360(9340):1155-62.
104. Tomankova V, Liskova B, Skalova L, Bartikova H, Bousova I, Jourova L, Anzenbacher P, Ulrichova J, Anzenbacherova E. Altered cytochrome P450 activities and expression levels in the liver and intestines of the monosodium glutamate-induced mouse model of human obesity. *Life Sci* 2015;133:15-20.

105. Tracy TS, Chaudhry AS, Prasad B, Thummel KE, Schuetz EG, Zhong XB, Tien YC, Jeong H, Pan X, Shireman LM, Tay-Sontheimer J, Lin YS. Interindividual Variability in Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism. *Drug Metab Dispos* 2016;44(3):343-51.
106. Zuber R, Anzenbacherova E, Anzenbacher P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med* 2002;6(2):189-98.
107. Muruganandan S, Sinal CJ. Mice as clinically relevant models for the study of cytochrome P450-dependent metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83(6):818-28.
108. Pasanen M. Species differences in CYP enzymes. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia* 2004;63-90.
109. Boroujerdi M. *Pharmacokinetics and Toxicokinetics*. Boca Raton, New York: CRC Press/Taylor & Francis 2015.
110. Guengerich FP. Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem Biol Interact* 1997;106(3):161-82.
111. Su T, Ding X. Regulation of the cytochrome P450 2A genes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;199(3):285-94.
112. Lewis DF, Lake BG. Species differences in coumarin metabolism: a molecular modelling evaluation of CYP2A interactions. *Xenobiotica* 2002;32(7):547-61.
113. Martignoni M, de Kanter R, Moscone A, Grossi P, Monshouwer M. Lack of strain-related differences in drug metabolism and efflux transporter characteristics between CD-1 and athymic nude mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;55(2):129-35.
114. Abraham BK, Adithan C. Genetic polymorphism of CYP2D6. *Indian J Pharmacol* 2001;33(3):147-69.
115. Aueviriyavit S, Kobayashi K, Chiba K. Species differences in mechanism-based inactivation of CYP3A in humans, rats and mice. *Drug Metab Pharmacokinet* 2010;25(1):93-100.
116. Martignoni M, Groothuis G, de Kanter R. Comparison of mouse and rat cytochrome P450-mediated metabolism in liver and intestine. *Drug Metab Dispos* 2006;34(6):1047-54.
117. Pelkonen O, Maenpaa J, Taavitsainen P, Rautio A, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* 1998;28(12):1203-53.
118. Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol* 2008;82(10):667-715.

119. De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. *J Obes* 2013;2013:291546.
120. Tahergorabi Z, Khazaei M. The relationship between inflammatory markers, angiogenesis, and obesity. *ARYA atheroscler* 2013;9(4):247.
121. Blouin RA, Warren GW. Pharmacokinetic considerations in obesity. *J Pharm Sci* 1999;88(1):1-7.
122. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003;348(17):1625-38.
123. Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, Trogon JG, Pan L, Sherry B, Dietz W. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *Am J Prev Med* 2012;42(6):563-70.
124. Kanasaki K, Koya D. Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:197636.
125. Kim S, Sohn I, Ahn JI, Lee KH, Lee YS, Lee YS. Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet-induced obesity mouse model. *Gene* 2004;340(1):99-109.
126. Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol* 2012; Chapter 5:Unit 5.61.
127. Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 1992;71(7):1195-204.
128. Chen D, Garg A. Monogenic disorders of obesity and body fat distribution. *J Lipid Res* 1999;40(10):1735-46.
129. O'Rahilly S. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature* 2009;462(7271):307-14.
130. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E. Animal models of obesity. *Obes Rev* 2007;8 Suppl 1:55-61.
131. Fowler MJ. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clin Diabetes* 2008;26(2):77-82.
132. Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 2004;81(2):243-8.
133. Nilsson C, Raun K, Yan FF, Larsen MO, Tang-Christensen M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol Sin* 2012;33(2):173-81.
134. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 2010;23(2):270-99.

135. Lin S, Thomas T, Storlien L, Huang X. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C 57 Bl/6 J mice. *Int J Obes* 2000;24(5):639-46.
136. Islam MS, Wilson RD. Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. *Methods Mol Biol* 2012;933:161-74.
137. Lobato NS, Filgueira FP, Akamine EH, Davel AP, Rossoni LV, Tostes RC, Carvalho MH, Fortes ZB. Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: role of NO and prostanoids. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21(10):808-16.
138. Cherala G, Thornburg K, Edelman A. Birthweight and cytochrome P450A4/5 activity in obese women. *Br J Clin Pharmacol* 2013;75(1):275-6.
139. Irizar A, Barnett CR, Flatt PR, Ioannides C. Defective expression of cytochrome P450 proteins in the liver of the genetically obese Zucker rat. *Eur J Pharmacol* 1995;293(4):385-93.
140. Watson AM, Poloyac SM, Howard G, Blouin RA. Effect of leptin on cytochrome P-450, conjugation, and antioxidant enzymes in the ob/ob mouse. *Drug Metab Dispos* 1999;27(6):695-700.
141. Sweeney BP, Bromilow J. Liver enzyme induction and inhibition: implications for anaesthesia. *Anaesthesia* 2006;61(2):159-77.
142. Khemawoot P, Yokogawa K, Shimada T, Miyamoto K. Obesity-induced increase of CYP2E1 activity and its effect on disposition kinetics of chlorzoxazone in Zucker rats. *Biochem Pharmacol* 2007;73(1):155-62.
143. Wang T, Shankar K, Ronis M, Mehendale H. Mechanisms and outcomes of drug-and toxicant-induced liver toxicity in diabetes. *Crit Rev Toxicol* 2007;37(5):413-59.
144. Yoshinari K, Takagi S, Yoshimasa T, Sugatani J, Miwa M. Hepatic CYP3A expression is attenuated in obese mice fed a high-fat diet. *Pharm Res* 2006;23(6):1188-200.
145. Ghose R, Omoluabi O, Gandhi A, Shah P, Strohacker K, Carpenter KC, McFarlin B, Guo T. Role of high-fat diet in regulation of gene expression of drug metabolizing enzymes and transporters. *Life Sci* 2011;89(1-2):57-64.
146. Donato MT, Jimenez N, Serralta A, Mir J, Castell JV, Gomez-Lechon MJ. Effects of steatosis on drug-metabolizing capability of primary human hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 2007;21(2):271-6.
147. Pichard L, Gillet G, Fabre I, Dalet-Beluche I, Bonfils C, Thenot JP, Maurel P. Identification of the rabbit and human cytochromes P-450III A as the major enzymes involved in the N-demethylation of diltiazem. *Drug Metab Dispos* 1990;18(5):711-9.

148. Lake B. Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. Oxford: IRL Press 1987.
149. Ma T, Hu N, Ding C, Zhang Q, Li W, Suo Y, Wang H, Bai B, Ding C. In vitro and in vivo biological activities of anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. fruits. *Food Chem* 2016;194:296-303.
150. Hu Y, Deng L, Chen J, Zhou S, Liu S, Fu Y, Yang C, Liao Z, Chen M. An analytical pipeline to compare and characterise the anthocyanin antioxidant activities of purple sweet potato cultivars. *Food Chem* 2016;194:46-54.
151. Durst RW, Wrolstad RE. Separation and characterization of anthocyanins by HPLC. *Curr Protoc Food Anal Chem* 2001.
152. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150(1):76-85.
153. Schenkman JB, Jansson I. Spectral analyses of cytochromes P450. *Methods Mol Biol* 2006;320:11-8.
154. Bronner WE, Beecher GR. Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1998;805(1-2):137-42.
155. Wu X, Prior RL. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *J Agric Food Chem* 2005;53(7):2589-99.
156. Chang TK, Waxman DJ. Catalytic assays for human cytochrome P450: an introduction. *Methods Mol Biol* 2006;320:73-83.
157. Chang TK, Waxman DJ. Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 with 7-ethoxyresorufin as substrate. *Methods Mol Biol* 2006;320:85-90.
158. Waxman DJ, Chang TK. Spectrofluorometric analysis of CYP2A6-catalyzed coumarin 7-hydroxylation. *Methods Mol Biol* 1998;107:111-6.
159. Locatelli I, Kmetec V, Mrhar A, Grabnar I. Determination of warfarin enantiomers and hydroxylated metabolites in human blood plasma by liquid chromatography with achiral and chiral separation. *J Chromatogr B* 2005;818(2):191-8.
160. Crespi CL, Chang TK, Waxman DJ. Determination of CYP2C9-catalyzed diclofenac 4'-hydroxylation by high-performance liquid chromatography. *Methods Mol Biol* 1998;107:129-33.

161. cypex.co.uk.: Cypex CYP2C19 QC Assays [online]. [cit. 19.1.2017]. Dostupné z: <http://cypex.co.uk/2c19info.htm>
162. Crespi CL, Chang TKH, Waxman DJ. CYP2D6-dependent bufuralol 1'-hydroxylation assayed by reverse-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, In: Phillips IR, Shephard EA, Ortiz de Montellano PR (Eds.). *Cytochrome P450 Protocols*. Chapter 16, Totowa, NJ: Humana 1998.
163. Lucas D, Ferrara R, Gonzalez E, Bodenez P, Albores A, Manno M, Berthou F. Chlorzoxazone, a selective probe for phenotyping CYP2E1 in humans. *Pharmacogenetics* 1999;9(3):377-88.
164. Guengerich F, Martin M, Beaune P, Kremers P, Wolff T, Waxman D. Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem* 1986;261(11):5051-60.
165. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
166. Matouskova P, Bartikova H, Bousova I, Hanusova V, Szotakova B, Skalova L. Reference genes for real-time PCR quantification of messenger RNAs and microRNAs in mouse model of obesity. *PLoS One* 2014;9(1):e86033.
167. Sieuwerts AM, Klijn JG, Peters HA, Foekens JA. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33(11):813-23.
168. Fernandes I, Faria A, Calhau C, de Freitas V, Mateus N. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *J Funct Foods* 2014;7:54-66.
169. Ohnishi N, Yokoyama T. Interactions between medicines and functional foods or dietary supplements. *Keio J Med* 2004;53(3):137-50.
170. Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol* 2013;4:177.
171. Maliakal PP, Wanwimolruk S. Effect of herbal teas on hepatic drug metabolizing enzymes in rats. *J Pharm Pharmacol* 2001;53(10):1323-9.
172. Chacko SM, Thambi PT, Kuttan R, Nishigaki I. Beneficial effects of green tea: A literature review. *Chin Med* 2010;5:13.

173. Yamaura K, Shimada M, Ueno K. Anthocyanins from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) alleviate pruritus in a mouse model of chronic allergic contact dermatitis. *Pharmacognosy Res* 2011;3(3):173-7.
174. Hanley MJ, Masse G, Harmatz JS, Cancalon PF, Dolnikowski GG, Court MH, Greenblatt DJ. Effect of blueberry juice on clearance of buspirone and flurbiprofen in human volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2013;75(4):1041-52.
175. Woll F. In vitro inhibition of CYP1A and CYP3A by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) phenolic, in male and female porcine microsomes: Master Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Food Science, Uppsala, 2015.
176. Dreiseitel A, Schreier P, Oehme A, Locher S, Hajak G, Sand PG. Anthocyanins and their metabolites are weak inhibitors of cytochrome P450 3A4. *Mol Nutr Food Res* 2008;52(12):1428-33.
177. Prommetta P, Phivthong-ngam L, 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. *Thai J Pharm Sci* 2006;30:8-18.
178. Ngo N, Yan Z, Graf TN, Carrizosa DR, Kashuba AD, Dees EC, Oberlies NH, Paine MF. Identification of a cranberry juice product that inhibits enteric CYP3A-mediated first-pass metabolism in humans. *Drug Metab Dispos* 2009;37(3):514-22.
179. Ngo N, Brantley SJ, Carrizosa DR, Kashuba AD, Dees EC, Kroll DJ, Oberlies NH, Paine MF. The warfarin-cranberry juice interaction revisited: A systematic in vitro-in vivo evaluation. *J Exp Pharmacol* 2010;2010(2):83-91.
180. Ushijima K, Tsuruoka SI, Tsuda H, Hasegawa G, Obi Y, Kaneda T, Takahashi M, Maekawa T, Sasaki T, Koshimizu TA, Fujimura A. Cranberry juice suppressed the diclofenac metabolism by human liver microsomes, but not in healthy human subjects. *B J Clin Pharmacol* 2009;68(2):194-200.
181. Srinivas NR. Cranberry juice ingestion and clinical drug-drug interaction potentials; review of case studies and perspectives. *J Pharm Pharm Sci* 2013;16(2):289-303.
182. Canivenc-Lavier MC, Bentejac M, Miller ML, Leclerc J, Siess MH, Latruffe N, Suschetet M. Differential effects of nonhydroxylated flavonoids as inducers of cytochrome P450 1A and 2B isozymes in rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;136(2):348-53.
183. Ciolino HP, Yeh GC. The flavonoid galangin is an inhibitor of CYP1A1 activity and an agonist/antagonist of the aryl hydrocarbon receptor. *Br J Cancer* 1999;79(9-10):1340-6.



184. Ciolino HP, Wang TT, Yeh GC. Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity. *Cancer Res* 1998;58(13):2754-60.
185. Lin JH, Lu AY. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 1998;35(5):361-90.
186. Shih H, Pickwell GV, Quattrochi LC. Differential Effects of Flavonoid Compounds on Tumor Promoter-Induced Activation of the Human CYP1A2 Enhancer. *Arch Biochem Biophys* 2000;373(1):287-94.
187. Hodek P, Trefil P, Stiborova M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem Biol Interact* 2002;139(1):1-21.
188. Murtomaa-Hautala M, Korkalainen M, Pelkonen O, Hegde N, Pohjanvirta R, Huitu O, Henttonen H, Rautio A, Viitala P, Viluksela M. Significant interspecies differences in induction profiles of hepatic CYP enzymes by TCDD in bank and field voles. *Environ Toxicol Chem* 2012;31(3):663-71.
189. Braeuning A, Kohle C, Buchmann A, Schwarz M. Coordinate regulation of cytochrome P450 1a1 expression in mouse liver by the aryl hydrocarbon receptor and the beta-catenin pathway. *Toxicol Sci* 2011;122(1):16-25.
190. Gerbal-Chaloin S, Dume AS, Briolotti P, Klieber S, Raulet E, Duret C, Fabre JM, Ramos J, Maurel P, Daujat-Chavanieu M. The WNT/beta-catenin pathway is a transcriptional regulator of CYP2E1, CYP1A2, and aryl hydrocarbon receptor gene expression in primary human hepatocytes. *Mol Pharmacol* 2014;86(6):624-34.
191. Raucy JL. Regulation of CYP3A4 expression in human hepatocytes by pharmaceuticals and natural products. *Drug Metab Dispos* 2003;31(5):533-9.
192. Mitschke D, Reichel A, Fricker G, Moenning U. Characterization of cytochrome P450 protein expression along the entire length of the intestine of male and female rats. *Drug Metab Dispos* 2008;36(6):1039-45.
193. Mejia-Garcia A, Sanchez-Ocampo EM, Galindo-Gomez S, Shibayama M, Reyes-Hernandez O, Guzman-Leon S, Gonzalez FJ, Elizondo G. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin enhances CCl4-induced hepatotoxicity in an aryl hydrocarbon receptor-dependent manner. *Xenobiotica* 2013;43(2):161-8.
194. Renouf M, Marmet C, Guy PA, Beaumont M, Lepage M, Williamson G, Dionisi F. Dose-response plasma appearance of green tea catechins in adults. *Mol Nutr Food Res* 2013;57(5):833-9.

195. Messerer M, Johansson SE, Wolk A. Sociodemographic and health behaviour factors among dietary supplement and natural remedy users. *Eur J Clin Nutr* 2001;55(12):1104-10.
196. Lambert JD, Sang S, Yang CS. Biotransformation of green tea polyphenols and the biological activities of those metabolites. *Mol Pharm* 2007;4(6):819-25.
197. Lewandowska U, Szewczyk K, Hrabec E, Janecka A, Gorlach S. Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. *J Agric Food Chem* 2013;61(50):12183-99.
198. Misaka S, Kawabe K, Onoue S, Werba JP, Giroli M, Tamaki S, Kan T, Kimura J, Watanabe H, Yamada S. Effects of green tea catechins on cytochrome P450 2B6, 2C8, 2C19, 2D6 and 3A activities in human liver and intestinal microsomes. *Drug Metab Pharmacokinet* 2013;28(3):244-9.
199. Weng Z, Greenhaw J, Salminen WF, Shi Q. Mechanisms for epigallocatechin gallate induced inhibition of drug metabolizing enzymes in rat liver microsomes. *Toxicol Lett* 2012;214(3):328-38.
200. Yang CS, Pan E. The effects of green tea polyphenols on drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012;8(6):677-89.
201. Donovan JL, Chavin KD, Devane CL, Taylor RM, Wang JS, Ruan Y, Markowitz JS. Green tea (*Camellia sinensis*) extract does not alter cytochrome p450 3A4 or 2D6 activity in healthy volunteers. *Drug Metab Dispos* 2004;32(9):906-8.
202. Yamazaki H, Shimada T. Progesterone and Testosterone Hydroxylation by Cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in Human Liver Microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1997;346(1):161-9.
203. Liu T, Chen WQ, David SP, Tyndale RF, Wang H, Chen YM, Yu XQ, Chen W, Zhou Q, Ling WH. Interaction between heavy smoking and CYP2A6 genotypes on type 2 diabetes and its possible pathways. *Eur J Endocrinol* 2011;165(6):961-7.
204. Kim SD, Antenos M, Squires EJ, Kirby GM. Cytochrome P450 2A5 and bilirubin: mechanisms of gene regulation and cytoprotection. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013;270(2):129-38.
205. Kirby GM, Nichols KD, Antenos M. CYP2A5 induction and hepatocellular stress: an adaptive response to perturbations of heme homeostasis. *Curr Drug Metab* 2011;12(2):186-97.
206. Abu-Bakar A, Hakkola J, Juvonen R, Rahnasto-Rilla M, Raunio H, Lang MA. Function and regulation of the Cyp2a5/CYP2A6 genes in response to toxic insults in the liver. *Curr Drug Metab* 2013;14(1):137-50.

207. Guengerich F. Human cytochrome P450 enzymes. Kluwer Academic/Plenum: New York 2005.
208. Zangar RC, Hernandez M, Novak RF. Posttranscriptional elevation of cytochrome P450 3A expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231(1):203-5.
209. Murray M. Altered CYP expression and function in response to dietary factors: potential roles in disease pathogenesis. *Curr Drug Metab* 2006;7(1):67-81.