

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie



Bc. Evgeniia Kurshakova

**Působení směsí potravinových doplňků na vybrané biotransformační
enzymy**

Effect of food supplement mixtures on selected biotransformation enzymes

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Helena Dračínská, Ph.D.

Praha 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Heleny Dračínské, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

Podpis:

Abstrakt

Potravinové suplementy jsou celosvětově užívané produkty, které byly navrženy k doplnění stravy o dodatečné živiny. Obsahují široké spektrum biologicky aktivních látek: aminokyseliny, vitamíny, minerály, bylinné extrakty atd. Vzhledem k popularitě a nadměrné konzumaci potravinových suplementů roste nutnost výzkumu jejich možných vzájemných interakcí a vlivu na lidské zdraví.

Určité potravinové suplementy jsou metabolizovány enzymy ze skupiny cytochromů P450, které hrají klíčovou roli v biotransformaci exogenních substrátů. Některé biologicky aktivní látky mohou zároveň ovlivňovat jejich aktivitu. Předkládaná diplomová práce byla věnována studiu vlivu několika nejpopulárnějších složek potravinových doplňků na cytochromy P450 3A4 a 1A1 vyskytující se v gastrointestinálním traktu. Byl zkoumán vliv kovových iontů Zn^{2+} a Mg^{2+} , askorbátu ze skupiny vitamínů a kurkuminu ze skupiny polyfenolů.

Byl potvrzen silný inhibiční účinek kurkuminu na aktivitu obou zkoumaných isoform *in vitro*. Reakce 6 β -hydroxylace testosteronu katalyzovaná CYP3A4 byla přidavkem kurkuminu výrazně potlačena, stanovená hodnota IC_{50} činila 4,7 μM . Bylo také pozorováno významné snížení rychlosti *O*-deethylace resorufinu potkaní a lidskou isoformou CYP1A1 ($IC_{50} = 1,1 \mu M$, resp. 2,7 μM). Inhibiční vliv byl pozorován i u askorbátu a zinečnatých iontů, zatímco přidavek hořečnatých iontů neměl vliv na aktivitu žádné ze zkoumaných isoform.

Ukázalo se, že CUR ponechaný 30 min inkubovat při 37 °C v prostředí fosfátového pufru (pH 7,4) před přidáním do reakční směsi částečně ztrácí svůj inhibiční účinek na obě zkoumané isoformy CYP. V případě stejné preinkubace kurkuminu ve směsi s askorbátem a kovovými ionty ke snížení inhibičního potenciálu nedochází. Zachování inhibičního účinku bylo pozorováno i při použití kombinace kurkuminu pouze se samotným askorbátem nebo s jedním z kovových iontů. Podání kurkuminu s dalšími složkami potravinových suplementů (askorbátem nebo kovovými ionty) může tedy ovlivnit jeho schopnost inhibovat sledované isoformy CYP.

Klíčová slova: doplňky stravy, kurkumin, askorbát, hořečnaté ionty, zinečnaté ionty, cytochromy P450 1A1 a 3A4, inhibice

Abstract

Dietary supplements are globally used products designed to complement nutrition with additional nutrients. They contain a wide range of biologically active compounds: amino acids, vitamins, minerals, herbal extracts, etc. Due to the popularity and excessive consumption of food supplements, there is a growing need to research their potential interactions and impact on human health.

Certain dietary supplements are metabolized by enzymes from the cytochrome P450 group, which play a key role in the biotransformation of exogenous substrates. Some biologically active compounds may also affect their activity. The presented thesis was focused on studying the influence of several popular components of dietary supplements on cytochromes P450 3A4 and 1A1 expressed in the gastrointestinal tract. The influence of metal ions Zn^{2+} and Mg^{2+} , ascorbate from the vitamin group, and curcumin from the polyphenol group was examined.

A strong inhibitory effect of curcumin on the activity of both investigated isoforms was confirmed. The reaction of 6 β -hydroxylation of testosterone catalyzed by CYP3A4 was significantly suppressed by the addition of curcumin, with the determined IC_{50} value being 4,7 μM . A significant decrease in the rate of resorufin *O*-deethylation by rat and human CYP1A1 isoforms was also observed ($IC_{50} = 1.1 \mu M$ and 2.7 μM , respectively). Inhibitory effects were also observed with ascorbate and zinc ions, while the addition of magnesium ions had no effect on the activity of any of the investigated isoforms.

It was shown that CUR incubated for 30 minutes at 37°C in a phosphate buffer environment (pH 7.4) before being added to the reaction mixture partially loses its inhibitory effect on both studied CYP isoforms. In the case of the same preincubation of curcumin in a mixture with ascorbate and metal ions, there was no decrease in inhibitory potential. The preservation of the inhibitory effect was also observed when using a combination of curcumin with only ascorbate or with one of the metal ions. Therefore, the administration of curcumin with other components of dietary supplements (ascorbate or metal ions) may affect its ability to inhibit the studied CYP isoforms.

Key words: food supplements, curcumin, ascorbate, magnesium ions, zinc ions, cytochromes P450 1A1 and 3A4, inhibition

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D. za všestrannou pomoc, laskavý přístup, trpělivost a ochotu, které mi během zpracování této práce věnovala.

Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům a snoubenci za podporu a pomoc během celého studia.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1 TEORETICKÝ ÚVOD.....	10
1.1 CYTOCHROMY P450	11
1.1.1 Struktura cytochromů P450	11
1.1.2 Nomenklatura a polymorfismus cytochromů P450	13
1.1.3 Cytochromy P450 v gastrointestinálním traktu	14
1.1.3.1 Cytochrom P450 1A1	14
1.1.3.2 Cytochrom P450 2C9.....	16
1.1.3.3 Cytochrom P450 3A4	17
1.2 BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY.....	18
1.2.1 Kurkumin.....	19
1.2.1.1 Chemická struktura a vlastnosti kurkuminu	19
1.2.1.2 Reaktivita kurkuminu.....	21
1.2.1.3 Klinický význam kurkuminu	22
1.2.1.4 Biotransformace kurkuminu	23
1.2.1.5 Vliv kurkuminu na extrahepatální isoformy cytochromu P450	24
1.2.2 Vitamín C	26
1.2.2.1 Antioxidační účinek vitamínu C	27
1.2.2.2 Biologické funkce vitamínu C	28
1.2.2.3 Biotransformace vitamínu C.....	29
1.2.2.4 Vliv vitamínu C na zkoumané isoformy cytochromu P450.....	30
1.2.3 Vzájemné interakce kurkuminu a askorbátu	30
1.2.4 Biochemická role iontů kovů.....	31
1.2.4.1 Funkce hořečnatých iontů	32
1.2.4.2 Funkce zinečnatých iontů	32
1.2.4.3 Vliv Mg^{2+} a Zn^{2+} iontů na cytochrom P450.....	33
2 CÍL PRÁCE.....	35
3 MATERIÁL A METODY.....	36
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL	36
3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	37
3.3 POUŽITÉ METODY.....	39
3.3.1 Izolace mikrosomální frakce	39

3.3.2 Stanovení aktivity cytochromu P450 1A1 –	40
O-deethylace 7-ethoxyresorufinu	40
3.3.3 Stanovení aktivity cytochromů P450 3A4 –	42
6 β -hydroxylace testosteronu	42
3.3.3.1 Příprava reakčních směsí	42
3.3.3.2 Separace 6 β -hydroxytestosteronu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie	44
3.3.4 Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy	44
3.3.5 Měření absorpčních spekter kurkuminu	45
4 VÝSLEDKY	46
4.1 VLIV KURKUMINU	46
4.1.1 Sledování aktivity lidské a potkaní isoformy cytochromu P450 1A1	46
4.1.2 Sledování aktivity NADPH:cytochromP450-oxidoreduktasy	48
4.1.3 Sledování aktivity cytochromu P450 3A4	48
4.2 VLIV ASKORBÁTU	51
4.2.1 Sledování aktivity lidské a potkaní isoformy cytochromu P450 1A1	51
4.2.2 Sledování aktivity cytochromu P450 3A4	52
4.2.3 Stanovení vlivu pH na aktivitu cytochromů P450 1A1 a 3A4	53
4.3 VLIV KOVOVÝCH IONTŮ	54
4.3.1 Sledování aktivity lidské a potkaní isoformy cytochromu P450 1A1	55
4.3.2 Sledování aktivity cytochromu P450 3A4	57
4.4 VLIV SMĚSI POTRAVINOVÝCH DOPLŇKŮ	58
4.4.1 Sledování aktivity lidské a potkaní isoformy cytochromu P450 1A1	58
4.4.2 Sledování aktivity cytochromu P450 3A4	63
5 DISKUZE	65
6 ZÁVĚR	71
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	72

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AhR	aryluhlovodíkový receptor
ARNT	AHR jaderný translokátor
Asc	askorbát
AscA	aniont kyseliny askorbové
AscQ	kyselina dehydroaskorbová
AscSQ	askorbyl-radikál
BMC	bisdemethoxykurkumin
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CUR	kurkumin
CYP	cytochrom P450
DMC	demethoxykurkumin
DMSO	dimethylsulfoxid
GIT	gastrointestinální trakt
GR	glukokortikoidní receptor
GS	NADPH-generující systém
HIF	hypoxií indukovaný faktor
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IC ₅₀	koncentrace způsobující 50% inhibici enzymu
K _i	inhibiční konstanta
MFO	oxygenasy se smíšenou funkcí
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
POR	NADPH:cytochrom-P450 oxidoreduktasa
PXR	pregnanový X receptor
ROS	reaktivní formy kyslíku
V _{max}	maximální reakční rychlost
XRE	xenobiotický responzivní element

1 Teoretický úvod

Zdravé stravovací návyky a správný výběr potravin patří do základních environmentálních faktorů v prevenci chronických onemocnění a zdravotních komplikací v průběhu života [1]. K doplnění potřebných živin, které nemusí být v dostatečném množství přijímány v běžné stravě, byly navrženy potravinové suplementy. Jedná se o produkty obsahující různé biologicky aktivní látky jako jsou např. vitamíny, minerály a aminokyseliny. V dnešní době se užívání potravinových suplementů stalo běžnou součástí životního stylu mnoha lidí [2,3].

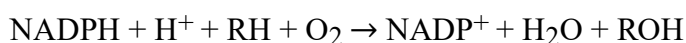
Otázka kvality a bezpečnosti potravinových doplňků je však kontroverzním a důležitým tématem, které vyžaduje zvýšenou pozornost. Vědecký výzkum vlivu potravinových doplňků na lidský organismus a informace o jejich efektivitě a bezpečnosti byly až donedávna poměrně omezené [2,4]. Dostupnost, popularita a celosvětová spotřeba potravinových suplementů zvyšují nutnost vědeckého výzkumu jejich účinků na lidské zdraví [4,5,6]. Předpokládá se, že doplňky stravy poskytující fyziologický nebo farmakologický efekt pravděpodobně mohou vyvolovat i nežádoucí účinky. Právě proto studium jejich možných vzájemných interakcí a vlivu na lidský metabolismus tvoří populární odvětví současného výzkumu [4,7].

Prokazování efektivity a bezpečnosti potravinových suplementů obvykle závisí na řadě výzkumných přístupů, od základního výzkumu mechanismu působení *in vitro* až po klinické studie na zvířatech a lidech [4]. Tato diplomová práce je věnována studiu vlivu tří zástupců nejužívanějších složek potravinových doplňků na vybrané biotransformační enzymy *in vitro*. Jsou to kurkumin ze skupiny polyfenolů, askorbát ze skupiny vitamínů a dva kovové ionty Zn^{2+} a Mg^{2+} .

1.1 Cytochromy P450

Jak léky, tak potravinové suplementy jsou převážně metabolizovány enzymy ze skupiny cytochromů P450 (CYP) [8]. Tyto enzymy jsou většinou exprimovány v jaterních tkáních, existují ale i extrahepatální isoformy vyskytující se po celém těle: např. v tenkém střevě, plicích, kůži, ledvinách, nadledvinkách a mozku [8, 9]. Na buněčné úrovni se nacházejí v mitochondriálních membránách nebo membránách hladkého endoplazmatického retikula [9]. Cytochromy P450 jsou zapojeny do širokého spektra reakcí biotransformace léčiv, polutantů životního prostředí, karcinogenů a řady endogenních substrátů, jako jsou např. eikosanoidy a steroidy [10,11]. Za jednu z nejdůležitějších fyziologických funkcí CYP je považována katalýza oxidačních reakcí zvyšujících polaritu příslušných xenobiotik v rámci 1. fáze biotransformace pro účinnější vyloučení z organismu a zabránění jejich případné bioakumulaci. Během biotransformace však může docházet i ke vzniku toxických, mutagenních nebo karcinogenních derivátů [9].

Nyní je známo, že cytochromy P450 se podílejí na metabolické oxidaci, resp. redukci 95% všech organických látek, pro které jsou takové reakce známy. Nejedná se však o cytochromy v pravém smyslu, neboť nepřenášejí elektrony na jiné proteiny. Jsou považovány za monooxygenasy nebo oxygenasy se smíšenou funkcí (angl. MFO: „Mixed function oxidases“), protože přenášejí elektrony na kyslík a katalyzují oxidaci organických látek [10, 12]. Reakci hydroxylace uhlovodíků lze stechiometricky vyjádřit následovně [10]:

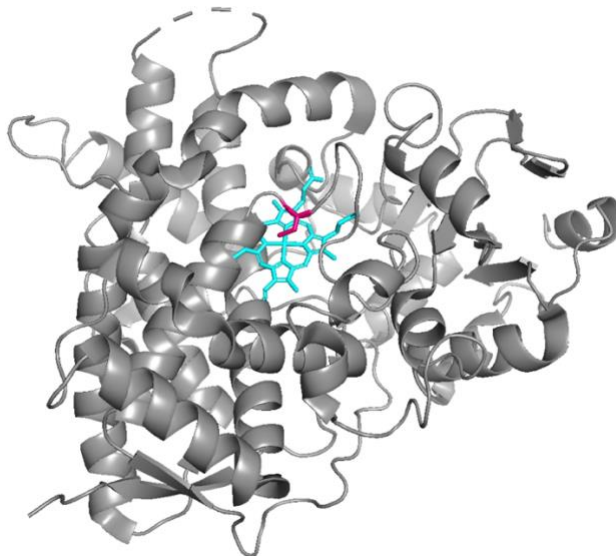


Uvedená reakce je považována za typickou pro cytochromy P450. Stejným mechanismem však katalyzují i další typy reakcí, do kterých patří např. oxidace aldehydů a ketonů, dehydrogenace alkylového řetězce, štěpení C-C vazby, dehalogenace halogenalkanů, dealkylace a oxidace heteroatomů, epoxidace, cyklizace a přeskupování oxidovaných metabolitů, jako jsou např. prostaglandiny [11-14].

1.1.1 Struktura cytochromů P450

Všechny cytochromy P450 mají společné strukturní prvky a vykazují na základní úrovni určitou podobnost. V aktivním centru obsahují silně konzervovanou specifickou sekvenci aminokyselin, v jejíž oblasti je vázán porfyrinový skelet hemu (Obr. 1.1 na str. 12), a to prostřednictvím thiolátové síry cysteinového zbytku, vázané jako axiální pátý ligand iontu

železa v hemu, a hydrofobních interakcí [11, 12]. Pozoruhodné je to, že cystein v aktivním centru je vázán dvěma vodíkovými můstky. Tato architektura je nutná ke stabilizaci thiolátového ligandu dodržováním H-vazebných vzdáleností od sousedících peptidových NH-skupin, ačkoli podobná geometrie vodíkových můstků není nejoptimálnější [15].



Obrázek 1.1: Ukázka prostorové struktury cytochromu P450 3A4. PyMOL 2.5.2, PDB kód 1TQN [16]. Struktura hemu je označena modře, zbytek cysteinu růžově.

Právě složení a orientace aktivního centra je nejkonzervovanějším prvkem všech CYP. Z katalytického hlediska lze popsané uspořádání považovat za rozhodující, neboť přítomnost dvou vodíkových můstků umožňuje udržování dostatečně vysokého redoxního potenciálu pro katalýzu oxidačních reakcí. Předpokládá se, že vhodné elektrostatické prostředí kolem thiolátového ligandu je nezbytné pro udržování redoxního potenciálu ve fyziologicky přístupném rozsahu, a tedy pro plnění katalytických funkcí enzymu [15].

Popsaná struktura je příčinou specifického spektrálního chování cytochromů P450: komplex redukováného železa hemu (Fe^{II}) s navázaným oxidem uhelnatým má absorpční maximum při vlnové délce cca 450 nm [17]. Některé enzymy, např. NO-synthasa, prostacyklinsynthasa a některé peroxidasy vykazují podobné spektrální vlastnosti a katalytické reakce nebo také mají v aktivním centru axiální thiolátový ligand. Nejsou však klasifikovány jako cytochromy P450 z důvodu rozdílné katalytické specifity a zcela odlišných terciárních struktur [12,15].

Ačkoli CYP mají vysoce konzervovanou architekturu, jejich aktivní centra projevují dostatečnou strukturální rozmanitost, která umožňuje vazbu substrátů různých velikostí a tvarů na příslušné isoformy s různým stupněm specifity. Některé cytochromy P450 vykazují výraznou regio- a stereospecifitu vůči svým substrátům, zatímco jiné, jako je lidský CYP3A4, neselektivně metabolizuje více než 50% ze všech známých léků [17].

1.1.2 Nomenklatura a polymorfismus cytochromů P450

U lidí bylo identifikováno a popsáno 57 funkčních genů kódujících cytochromy P450. CYP jsou zastoupeny v lidském organismu v různých isoformách, které byly rozděleny do 18 rodin a 44 podrodin na základě sekvenční podobnosti jejich primární struktury [18,19]. Do stejné rodiny řadíme cytochromy P450 vykazující víc než 40% sekvenční podobnost, do podrodiny jsou pak seskupeny enzymy s víc než 60% sekvenční podobností. Jednotlivé rodiny jsou označeny zkratkou CYP s číslem, podrodiny se pak označují velkým písmenem [9, 18].

Převážná většina rodin cytochromů P450 plní endogenní funkce, jako jsou např. metabolismus žlučových kyselin, eikosanoidů a steroidů. Zásadní roli v biotransformaci xenobiotik hraje poměrně malá skupina enzymů patřících do rodin CYP1, CYP2 a CYP3 [18, 19].

Do geneticky nejvariabilnějších enzymů patří právě CYP metabolizující exogenní látky. Předpokládá se, že je to důsledkem nízkého evolučního tlaku, neboť tyto isoformy postrádají základní endogenní funkci [18]. Do hlavních zdrojů individuální variability aktivity CYP u různých jedinců patří vlivy prostředí (inhibice nebo indukce léky a kontaminanty životního prostředí), biologické faktory (pohlaví a fyziologické determinanty, jako je hormonální stav, případné onemocnění, cirkadiánní rytmy, genetický polymorfismus samotných genů a jejich regulátorů). Mezi jednotlivými isoformami CYP existují velké rozdíly, pokud jde o jejich náchylnost ke změnám uvedených faktorů [20].

Polymorfismus CYP je hlavní příčinou pozorovaných rozdílů v metabolismu podaných léků a jejich účinku u pacientů různého etnického původu. Je zřejmé, že aktivita jednotlivých isoform cytochromů P450 může determinovat reakci pacienta na podané léčivo [21]. Efektivita léčiva může záviset na aktivitě CYP i z hlediska toho, že v řadě případů může být metabolizováno na farmakologicky účinný produkt pouze některými isoformami cytochromů P450. V tomto případě účinnost podaného léčiva bude bezprostředně ovlivněna zvýšenou, resp. sníženou expresí příslušného CYP. Právě proto informace o substrátových preferencích jednotlivých isoform a jejich výskytu u různých skupin pacientů je z klinického hlediska nepostradatelná [9,20].

1.1.3 Cytochromy P450 v gastrointestinálním traktu

Většina cytochromů P450 účastníci se biotransformace xenobiotik je soustředěna v játrech (kromě 1A1, 1B1, 2A6). Některé z těchto enzymů jsou však také exprimovány v extrahepatálních tkáních, např. ve střevním epitelu [11]. Střevní epitel obsahuje velké množství enzymů schopných ovlivňovat absorpci, resp. exkreci léčiv a potravinových doplňků. Přispívají k presystémové eliminaci, tedy snižují biologickou dostupnost léčiv při perorálním podání tím, že je biotransformují dříve, než se dostanou do systémové cirkulace [22]. Mezi enzymy přeměňující exogenní substráty a exprimované v tenkém střevě patří cytochromy P450, UDP-glukuronosyltransferasy, sulfotransferasy, flavinové monooxygenasy, carboxylesterasy, N-acetyltransferasy, glutathion-S-transferasy a alkoholdehydrogenasa [23]. Cytochromy P450 hrají zásadní roli v primární biotransformaci xenobiotik v gastrointestinálním traktu. Důsledkem takové chemické přeměny je buď detoxikace xenobiotika a usnadněné vylučování z organismu, nebo bioaktivace a celkové zvýšení jeho toxicity [24]. Studie naznačují, že v lidském tenkém střevě jsou nejvíce exprimovány následující isoformy cytochromů P450: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2J2, CYP3A4, CYP3A5, CYP4F2. U kuřáků je také významně indukována exprese isoformy CYP1A1 [9,23]. Je známo, že isoforma CYP3A4 vykazuje nejvyšší úroveň exprese v GIT (GIT: "Gastrointestinální trakt"), představuje téměř 78% celkového obsahu CYP v tenkém střevě a má dominantní postavení v biotransformaci xenobiotik. Další nejvíce exprimovanou isoformou je CYP2C9, který také hraje významnou roli v procesu přeměny exogenních substrátů a představuje 9,5 % celkového obsahu CYP v GIT [15, 23].

1.1.3.1 Cytochrom P450 1A1

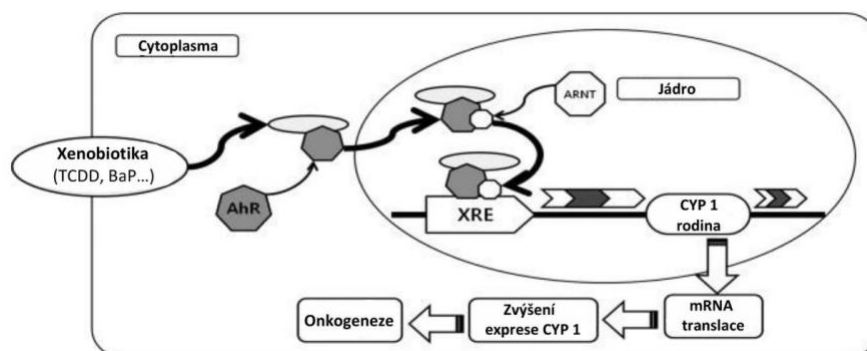
Cytochrom P450 1A1 je jedním ze tří členů rodiny CYP1. Je převážně exprimován v extrahepatálních tkáních a primárně se podílí na metabolismu exogenních látek [25]. CYP1A1 hraje důležitou roli jak při biotransformaci environmentálních karcinogenů, tak při metabolické aktivaci potravinových doplňků a léčiv majících onkoprotektivní účinky. Příspěvek CYP1A1 k progresi nebo prevenci rakoviny může záviset na rovnováze aktivace/detoxikace prokarcinogenů a míře extrahepatálního metabolismu jednotlivých látek s protikarcinogenním účinkem [25].

Lidský CYP1A1 je hlavně exprimován v plicním epitelu, kůži a gastrointestinálním traktu. Může být také detekován v placentě, plodu a embryu [26]. CYP1A1 je jedním z nejdůležitějších enzymů podílejících se na onkogenezi iniciované polutanty životního

prostředí. Studie také naznačují určitou korelaci mezi genetickými variantami lidského genu CYP1A1 a náchylností k rakovině plic a prsu. Vzhledem k významnému vlivu této isoformy na lidskou onkogenezi byla modulace jeho aktivity považována za potenciální nástroj v chemoprevenci nádorových onemocnění [25,27].

Kromě exogenních substrátů se CYP1A1 podílí na biotransformaci i endogenních sloučenin. Endogenní substráty zahrnují hormony 17β -estradiol a melatonin a mediátory zánětu, jako jsou kyselina arachidonová a kyselina eikosapentaenová. K exogenním substrátům patří léčiva, potravinové suplementy a polutanty životního prostředí [28,29]. Řady studií ukazují, že CYP1A1 je spojen s aktivací většiny karcinogenních polycyklických aromatických uhlovodíků (angl. PAH: „Polycyclic aromatic hydrocarbons“) prostřednictvím jejich přeměny na epoxidové meziprodukty, ze kterých působením epoxidhydrolasy dále vznikají reaktivnější diol-epoxydy [30]. Předpokládá se, že epoxidační reakce v rámci extrahepatální biotransformace jsou hlavní příčinou karcinogeneze vyvolané CYP1A1. Klinické studie naznačují, že vznikající metabolity zasahují do struktury DNA a narušují její integritu u lidí a experimentálních zvířat. Polycyklické aromatické uhlovodíky, jako jsou např. benzo[*a*]pyren běžně se nacházející v tabákovém kouři nebo imunosupresor dimethylbenzo[*a*]antracen, nevystupují pouze jako substráty CYP1A1, ale zároveň působí jako ligandy aryluhlovodíkového receptoru (angl. AhR: „Aryl hydrocarbon receptor“) [28].

AhR působí jako ligandem-aktivovaný transkripční faktor, který řídí transkripci genu pro CYP1A1. Ve svém inaktivovaném stavu se AhR nachází v cytosolu v komplexu s chaperonovými proteiny [28,31]. Po vazbě polycyklických aromatických uhlovodíku na tento receptor dochází k disociaci navázaných chaperonových proteinů, což umožňuje translokaci komplexu AhR s navázaným ligandem do jádra. Následně se tento komplex váže na jaderný přenašeč (angl. ARNT: „Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“). Vznikající komplex nasedá na xenobiotický responzivní element (angl. XRE: „Xenobiotic responsive element“). XRE představuje specifickou oblast promotoru určitého genu, jehož aktivace umožňuje zvýšenou expresi některých proteinů včetně cytochromu P450 1A1 (Obr. 1.2 na str. 16) [28,31].



Obrázek 1.2: Mechanismus modulace exprese CYP1A1 prostřednictvím navázání komplexu AhR a ARNT na xenobiotický responzivní element (XRE). (Převzato a upraveno z [31].)

Vzhledem k tomu, že aktivace aryluhlovodíkového receptoru působením PAH vyvolává zvýšenou expresi CYP1A1, je přítomnost těchto sloučenin spojena se zvýšenou hladinou mRNA pro CYP1A1, o čemž svědčí přítomnost této isoformy v plicním epitelu kuřáků ve srovnání s její nedetekovatelnými hladinami u nekuřáků [28, 31]. Studie na potkanech naznačují, že působením řady induktorů (β -naftoflavon, diallyldisulfid) dochází k významnému zvýšení exprese CYP1A1 v tenkém střevě [32]. Zvýšení exprese isoformy CYP1A1 je také spojeno s onkogenezí iniciované aktivací endogenních substrátů, jako je např. 17 β -estradiol, který je přeměňován na 16-hydroxyestradiol schopný se kovalentně vázat na estrogenové receptory, histony a DNA [28, 31, 33].

1.1.3.2 Cytochrom P450 2C9

Cytochrom P450 2C9 je druhým nejvíce exprimovaným enzymem ze všech CYP u lidí. Má vysokou hladinu v játrech, ale je také exprimován extrahepatálně, např. v gastrointestinálním traktu [34, 35]. CYP2C9 je jedním z nejdůležitějších enzymů CYP z hlediska substrátové rozmanitosti. Odhaduje se, že přispívá k biotransformaci přibližně 15% všech léků, které jsou přeměňovány enzymy CYP. Je známo, že CYP2C9 metabolizuje antikoagulant warfarin, antikonvulziva fenytoin a kyselinu valproovou, kardiovaskulární léky rosuvastatin a losartan a řadu nesteroidních protizánětlivých léčiv [18, 20]. Mnoho z těchto léků má nízký terapeutický index, tedy úzký bezpečnostní profil. Aktivita CYP2C9 v rámci jejich biotransformace je běžným faktorem ovlivňujícím pravděpodobnost vzniku nežádoucích účinků [20,34].

Cytochrom P450 2C9 vykazuje vysoký polymorfismus, který výrazně ovlivňuje jeho enzymovou aktivitu *in vitro* a *in vivo* [34]. V posledních letech bylo identifikováno několik substitučních bodových mutací v genu pro CYP2C9. V současné době je známo nejméně šest

alel genu CYP2C9. Nejčastěji se vyskytující alela je označena jako *CYP2C9*1* a je považována za alelu divokého typu. Vzhledem k tomu, že lidské alely *CYP2C9*1*, *2 a *3 byly objeveny jako první, jejich aktivita byla důkladně prozkoumána jak *in vitro*, tak *in vivo*. Objev genetického polymorfismu CYP2C9 stimuloval řadu výzkumů stanovujících funkční vztahy mezi alelou *CYP2C9* a jeho metabolickou aktivitou. Studie *in vitro* naznačují, že alely *CYP2C9*2* a *3 jsou spojeny s významným potlačením biotransformace různých substrátů CYP2C9 ve srovnání s alelou *CYP2C9*1*. Kromě toho výzkumy *in vivo* prokázaly, že jedinci s alespoň jednou variantou těchto alel vykazují významné snížení metabolické aktivity CYP2C9, tedy i snížení požadavků na dávkování určitých léků vystupujících jako substráty pro tento enzym [18,36]. Expresí nefunkčních a slabě funkčních alel cytochromu P450 2C9 vedou ke zvýšené expozici jeho substrátům, což může zvětšit riziko závažných nežádoucích účinků, včetně neurotoxicity vyvolané fenytoinem, gastrointestinálního krvácení a nepříznivých kardiovaskulárních účinků u nesteroidních protizánětlivých léků a bradykardie u siponimodu [37].

Promotorová oblast genu pro CYP2C9 obsahuje několik prvků reagujících na jaderné receptory (např. pro pregnanový X receptor (PXR), konstitutivní androstanový receptor (CAR), glukokortikoidní receptor (GR)), které se podílejí na transkripční regulaci jeho exprese. Pro přesný odhad terapeutického účinku léčiv metabolizovaných CYP2C9 je potřeba uvažovat jak genetické (polymorfismus), tak negenetické (přítomnost sloučenin zasahujících do procesu regulace transkripce) faktory ovlivňující jeho aktivitu [38].

1.1.3.3 Cytochrom P450 3A4

CYP3A4 je považován za nejvíce exprimovaný cytochrom P450 v lidském tenkém střevě. Je převážně exprimován v enterocytech klků střevního epitelia. Studie ukazují, že některé orálně podávané léky vystupující jako substráty pro CYP3A4 podléhají významné presystémové eliminaci v enterocytech. [39]. CYP3A4 je nejvíce prostudovanou isoformou podrodiny CYP3A, má nejvyšší hladinu v tenkém střevě a játrech. Je také zodpovědný za většinu metabolických aktivit připisovaných podrodině CYP3A [40]. Cytochrom P450 3A4 přispívá k biotransformaci cca 50 % klinicky používaných léků, do jeho substrátů patří např. benzodiazepiny, blokátory kalciových kanálů, cyklosporiny, makrolidová antibiotika, opioidy a několik statinů. Je inhibován širokou škálou xenobiotik, jako jsou erythromycin, furanokumariny z grapefruitové šťávy, ketokonazol a inhibitory HIV proteasy [18]. Kromě biotransformace léčiv hraje CYP3A4 důležitou roli také v metabolismu několika endogenních

látek, včetně testosteronu, progesteronu, androstendionu a žlučových kyselin. Bylo prokázáno, že CYP3A4 katalyzuje 4 β -hydroxylaci cholesterolu a produkt byl navržen jako *in vivo* biomarker jeho aktivity. Přispívá také k bioaktivaci a detoxikaci chemických karcinogenů, např. aflatoxinu B1 [20,41].

Předpokládá se, že hlavní příčinou širokého substrátového spektra CYP3A4 je velikost a flexibilita jeho aktivního centra, která umožňuje navázání a přeměnu mnoha různých lipofilních sloučenin s poměrně velkými strukturami [21].

Výzkumy ukazují, že exprese lidského cytochromu P450 3A4 může být indukována prostřednictvím aktivace PXR a CAR různými látkami včetně léků, steroidů a polutantů životního prostředí [43]. CYP3A4 je jediným enzymem ze třídy cytochromů P450, který vykazuje významný rozdíl exprese u mužů a žen. Studie naznačují, že CYP3A4 je exprimován u žen 1,5- až 2-krát více než u mužů. To se projevuje rychlejším vylučováním některých typických substrátů této izoformy. Příčina pohlavních rozdílů v expresi cytochromu P450 3A4 pravděpodobně spočívá v odlišných profilech růstového hormonu v plazmě [20]. Uvádí se také, že hladina exprese CYP3A4 je výrazně vyšší u nádorových tkání než v příslušných zdravých orgánech. To vyvolává otázku, zda má CYP3A4 funkce ovlivňující vývoj a proliferaci buněk maligních nádorů, které by činily CYP3A4 slibným cílem lékové prevence nádorových onemocnění. Bylo zjištěno, že zvýšené hladiny CYP3A4 u některých karcinomů prsu skutečně mohou podporovat progresi nádoru, což má za následek nepříznivé prognózy vývoje onemocnění. Podobná korelace by mohla být následkem epoxygenasové aktivity CYP3A4, kvůli které je kyselina arachidonová přeměněna na kyselinu epoxyeikosatrienovou, která následně podporuje růst a proliferaci nádorových buněk [40,42].

1.2 Biologicky aktivní látky

Do biologicky aktivních látek patří složky běžných potravin nebo potravinových doplňků, které nejsou potřebné k uspokojení základních výživových potřeb člověka a které nejsou odpovědné za výrazné změny zdravotního stavu. Mohou mít pro lidský organismus příznivý efekt a představovat určitou zdravotní výhodu, pokud jsou konzumovány v bezpečných a účinných dávkách [3, 44]. Kromě nízkomolekulárních látek, které se běžně nacházejí v ovoci a zelenině, jako jsou základní vitamíny a minerály, patří do biologicky aktivních látek řada sloučenin rostlinného původu, včetně vlákniny, karotenoidů a fytosterolů. Dalšími důležitými fytochemikáliemi jsou polyfenoly (kurkumin, hesperidin), terpenoidy (karotenoidy), alkaloidy (kofein) a sulforafany [45]. Polyfenoly tvoří velice rozsáhlou skupinu

bioaktivních fytochemikálií, která zahrnuje podtřídy flavonoidů (kvercetin), stilbenů (resveratrol), fenolových kyselin (kys. gallová) a lignanů (sekoisolariciresinol) [45, 46]. Od popsanych rostlinných metabolitů bylo odvozeno široké spektrum klinicky používaných léčiv s prokázanou efektivitou. Klinická aplikace samotných fytochemikálií však nedosáhla použití v rámci léčby komplexních onemocnění [47]. Je známo, že nedostatek vitamínů může způsobovat patologické stavy, jako jsou kurděje, beriberi, pellagra a křivice. Obsah vitamínů v normální vyvážené stravě je však postačující k tomu, aby se vzniku těchto chorob zabránilo. Protichůdné výsledky z klinických studií zaměřených na stanovení účinku doplňků stravy jsou hlavním důvodem absence vědeckého konsensu ohledně jejich efektivity [44,48].

1.2.1 Kurkumin

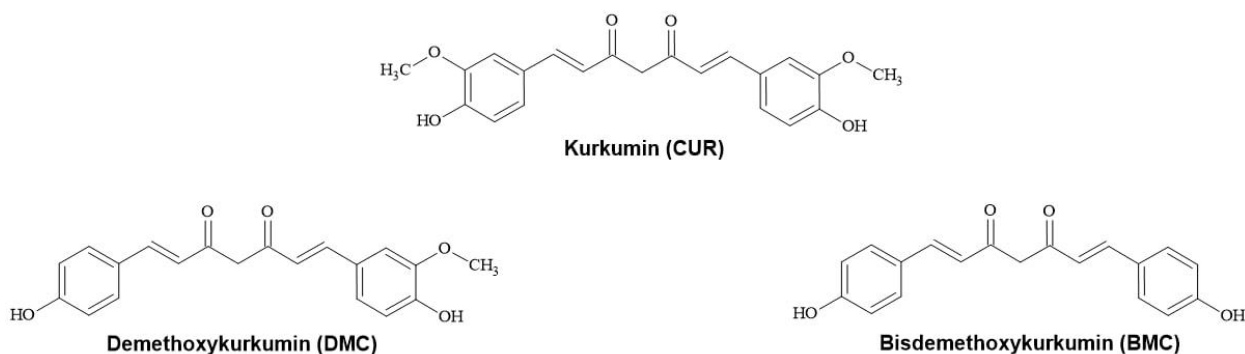
Kurkumin (CUR) je látka získaná z kořene rostliny kurkumovníku dlouhého (*Curcuma longa*). Jedná se o žlutý nebo oranžový pigment, u kterého se ukázalo, že má i léčivé účinky. Kurkumin je znám od starověku a byl hojně používán v tradiční indické medicíně již před více než 2500 lety. Používá se dodnes k léčbě mnoha zdravotních problémů, jako jsou hojení ran, akné, popáleniny, různá kožní onemocnění, oční infekce, sinusitida, revmatismus, deprese, stres a dyspepsie. Studie naznačují, že CUR vykazuje celou řadu biologických účinků [49]. Uvádí se, že protizánětlivý účinek CUR může být potenciálně využit v prevenci a léčbě nádorů, neboť zánět je považován za jeden z faktorů rozvoje rakoviny [50]. Byla také prokázána schopnost CUR působit na několik biologických cílů včetně transkripčních faktorů, růstových faktorů, zánětlivých mediátorů, cytokinů, proteinových kinas a enzymů regulujících apoptózu a buněčný cyklus, tedy modulovat některé buněčné dráhy. Je známo, že CUR potlačuje růst nádoru regulací několika signálních drah, jako jsou např. tumor supresorové a kaspasové dráhy, kinasové kaskády a dráhy receptorů smrti [51].

Kurkumin a jeho přírodní deriváty demethoxykurkumin (DMC) a bisdemethoxykurkumin (BMC) patří do skupiny tzv. kurkuminoidů (Obr. 1.3 na str. 20). Kurkuminoidy spolu s vitaminy tvoří 3 až 5 % celkového chemického obsahu kurkumovníku. 77 % všech kurkuminoidů v kořenech představuje právě CUR. DMC a BMC tvoří ostatních 17 a 6 % [51,52].

1.2.1.1 Chemická struktura a vlastnosti kurkuminu

Kurkumin je symetrickou molekulou obsahující dva aromatické kruhy s *o*-methoxyfenolickými skupinami spojené sedmiuhlíkatým řetězcem obsahujícím

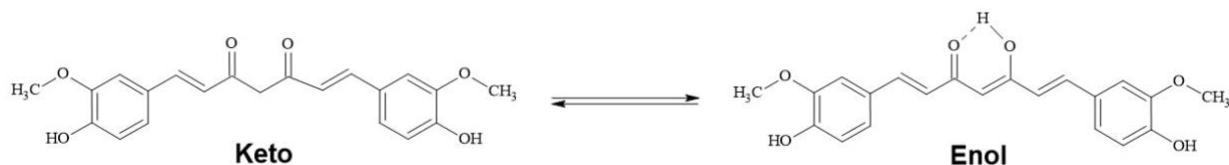
β -diketonovou skupinu. Na základě své struktury byl zařazen do skupiny polyfenolů. Má nomenklaturní název 1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-hepta-1,6-dien-3,5-dion [52, 53].



Obrázek 1.3: Chemická struktura kurkuminoidů (vytvořeno v programu ChemSketch).

Ačkoli extrakce a separace CUR z kurkumového prášku byla hlášena již v roce 1815, stále se objevují vylepšené a pokročilé extrakční metody. Extrakce organickým rozpouštědlem následovaná kolonovou chromatografií je nejčastěji používanou metodou pro izolaci kurkuminu [53]. Při neutrálním pH má CUR tři labilní protony, z nichž jeden je enolický a dva jsou fenolické. Ve vodných roztocích za pokojové teploty je kurkumin prakticky nerozpustný při neutrálním a kyselém pH. Vzhledem k lipofilní povaze vykazuje mnohem vyšší rozpustnost v organických rozpouštědlech, jako je methanol, ethanol, aceton a dimethylsulfoxid [53,54].

Ze struktury kurkuminu je patrné, že podléhá keto-enol tautomerii vzhledem k přítomnosti diketonové skupiny (Obr.1.4). Keto forma převládá jak při neutrálním, tak při kyselém pH, zatímco enol tautomer je přítomen výhradně v alkalických podmínkách, při kterých může být struktura stabilizována prostřednictvím intramolekulární vodíkové vazby. Rozpustnost kurkuminu ve vodném roztoku se tak zvyšuje za alkalických podmínek [51, 55].



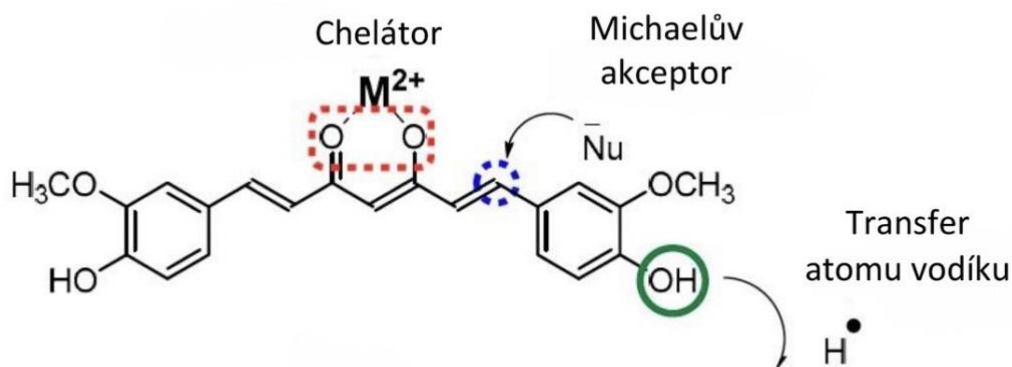
Obrázek 1.4: Chemické struktury keto- a enol- tautomeru kurkuminu (vytvořeno v programu ChemSketch).

Absorpční spektrum kurkuminu má dva výrazné absorpční pásy, jeden ve viditelné oblasti s maximem v rozmezí od 410 do 430 nm a další pásmo v UV oblasti s maximem při vlnové délce 265 nm [53]. První absorpční pás vykazuje zvýšenou variabilitu, neboť závisí na rozpouštědle a protonaci molekuly. Kurkumin rozpuštěný v methanolu tak vykazuje absorpční pík při 430 nm, v acetonu se poloha píku posunuje do vlnových délek 415-420 nm.

V alkalických podmínkách ($\text{pH} > 10$) je CUR plně deprotonován a vykazuje maximální absorpenci při 467 nm [53,54,56].

1.2.1.2 Reaktivita kurkuminu

Kurkumin má primárně tři reaktivní centra znázorněné na obrázku 1.5: donor atomu vodíku, Michaelův akceptor a kovový chelátor.



Obrázek 1.5: Reaktivní místa ve struktuře kurkuminu přispívající k jeho biodostupnosti a chemické aktivitě. Červeně je označena oblast odpovídající za chelataci kovových iontů, modře označený Michaelův akceptor přijímá elektron v rámci nukleofilní adice od nukleofilu (Nu^-), jeden z potenciálních donorů protonu je označen zeleně (převzato a upraveno z [51]).

α,β -nenasyčená β -diketonová část CUR je účinné chelatační činidlo a tvoří komplexy s několika známými kovovými ionty. Schopnost kurkuminu chelatovat ionty kovů z něj dělá potenciální činidlo proti Alzheimerově chorobě, rakovině, depresi a artritidě [51,57]. CUR tvoří komplexy s ionty Al^{3+} podílející se na vzniku Alzheimerovy choroby, nebo se přímo váže na malé β -amyloidy a zabraňuje tím jejich agregaci a následné tvorbě plaků [58]. Prostřednictvím tvorby stabilních komplexů se kurkumin také podílí na detoxikaci těžkých kovů, jako jsou měď, chrom, arsen, rtuť, olovo a kadmium [59]. Diketonová část kurkuminu reaguje nejen jako kovový chelátor, ale také slouží jako Michaelův akceptor v nukleofilních adičních reakcích, ve kterých nukleofilem může vystupovat hydroxylová, thiolátová nebo selenomerkaptanová skupina [51]. Bylo prokázáno, že kurkumin reaguje zejména s glutathionem a thioredoxin-reduktasami [60]. Konjugáty kurkuminu s glutathionem byly skutečně izolovány v různých biologických systémech. Aktivní tvorba tohoto adičního produktu by pravděpodobně vedla k vyčerpání intracelulárních zásob glutathionu v buňkách, což by způsobilo snížení celkové antioxidační obrany [53]. Mnohem výrazněji se však projevuje antioxidační aktivita

kurkuminu. Bylo zjištěno, že účinně neutralizuje většinu reaktivních forem kyslíku (ROS) [53, 61]. Všechna tři aktivní místa kurkuminu mohou podstoupit oxidaci přenosem elektronů a odtržením vodíku. Například reakcí CUR s peroxylovými radikály vznikají fenoxylvé radikály, které jsou méně reaktivní a méně toxické [53,62]. Studie také naznačují, že kurkumin reaguje se superoxidovými radikály, čímž jsou superoxidy degradovány, přičemž kurkumin působí jako mimetikum superoxid dismutasy [53].

1.2.1.3 Klinický význam kurkuminu

Řada studií naznačuje, že kurkumin vykazuje protizánětlivé, antibakteriální, anti-HIV, antifungální, antiparazitické, antimutagenní, antidiabetické, antifibrinogenní, radioprotektivní, antioxidační, imunomodulační a antikarcinogenní účinky. Někteří považují CUR za zdroj průlomových terapeutik pro komplexní onemocnění vyžadující silnou ale neselektivní terapii [63].

Většina klinických studií věnovaných kurkuminu byla zaměřena hlavně na lidi se zdravotními problémy. Nedávná studie však sledovala účinek micelární formy kurkuminu na zdravé účastníky středního věku (40-60 let). Každodenní příjem 80 mg kurkuminu po dobu 4 týdnů způsobil pokles plazmatických hladin triacylglyceridů, β -amyloidů, alaninaminotransferasy a intercelulárních adhezních molekul (sICAM). Tyto výsledky naznačují, že CUR přispívá k podpoře zdraví i u lidí nevykazujících žádné patologické stavy [64, 65].

V rámci dalších studií u pacientů s kolorektálním karcinomem odolným vůči standardní chemoterapii denní dávka 3,6 g kurkuminu způsobila 60% pokles indukovatelné produkce prostaglandinu E2 [66].

Je známo, že kouření zvyšuje riziko mutagenity a rakoviny plic, což může být ovlivněno dietními faktory včetně příjmu kurkumy. V rámci výzkumu věnovaného stanovení antimutagenních účinků kurkuminu u chronických kuřáků bylo zjištěno, že po každodenním podání 1,5 g kurkumy po dobu 30 dnů se výrazně snižuje hladina mutagenů v moči, v kontrolní skupině nekuřáků však nebyly pozorovány žádné změny. Předpokládá se, že kurkumin by mohl působit jako účinný anti-mutagen u kuřáků a snižovat tedy riziko vzniku rakoviny plic [67].

Další studie věnovaná sledování hladin cholesterolu v krvi u zdravých dobrovolníků ukazuje, že kurkumin v dávce 0,5 g/den po době 7 dnů způsobil pokles celkové hladiny cholesterolu v krvi o 11,6 % a zvýšení hladiny HDL cholesterolu o 29%. Kvůli těmto

vlastnostem byl kurkumin považován za potenciální chemopreventivní činidlo proti ateroskleróze [64, 68].

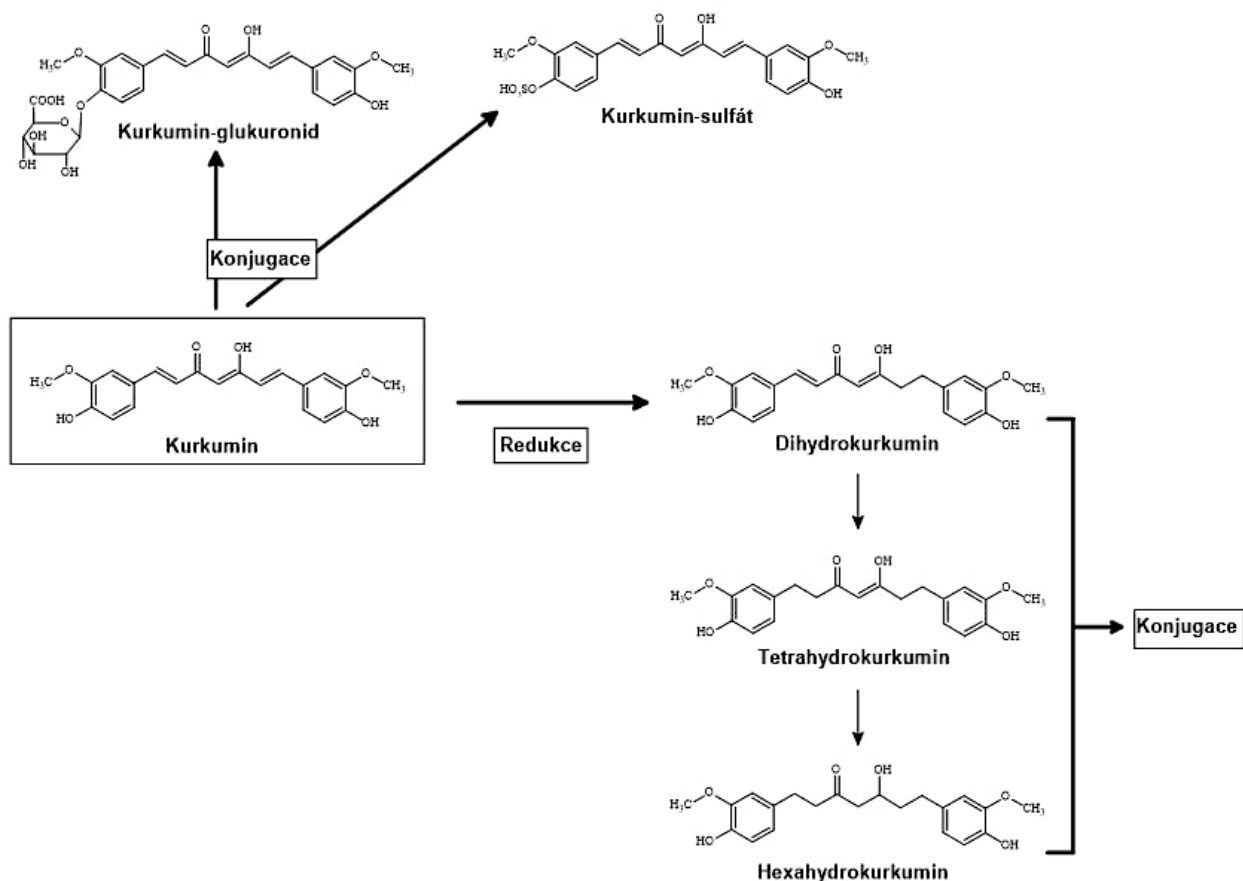
V placebem kontrolované klinické studii se sledováním účinnosti kurkuminu v prevenci vývoje diabetu 2. typu byl zjištěn jeho prospěšný účinek na funkci β -buněk v populaci s prediabetem [69]. Po 9 měsících léčby byl u 16,4 % účastníků ve skupině s placebem diagnostikován diabetes, zatímco ve skupině s každodenním podáním kurkuminu diabetes vůbec nebyl diagnostikován. Kromě toho účastníci skupiny léčené kurkuminem vykazovali lepší funkci β -buněk, nižší hladiny C-peptidu a nižší inzulinovou rezistenci ve srovnání s kontrolní skupinou. Autoři této studie dospěli k závěru, že kurkumin může být prospěšný v rámci prevence vývoje diabetu 2. typu u lidí s prediabetem [69].

V nekritickém pohledu na kurkumin jako na všelék je však jeho stinná stránka často ignorována. Je proto nesmírně důležité uvažovat i další vlastnosti této přírodní látky: její chemickou nestabilitu, slabou biodostupnost, potenciální toxikologické účinky a možné lékové interakce [63].

1.2.1.4 Biotransformace kurkuminu

Popsaný terapeutický potenciál kurkuminu je však zastíněn jeho nízkou biologickou dostupností, špatným farmakokinetickým profilem a rychlou degradací v gastrointestinálním traktu. Další výzvou pro CUR jako potenciální terapeutické činidlo je jeho nízká stabilita za fyziologických podmínek [51]. Při 37°C a neutrálním pH biologický poločas kurkuminu činí méně než 10 minut [51, 63]. *In vitro* studie věnovaná biotransformaci kurkuminu v lidských a potkaních jaterních mikrosomech naznačuje, že degradace kurkuminu je NADPH-dependentní, a že poločas jeho rozpadu se v lidských a potkaních mikrosomech výrazně liší (173,28 min, resp. 22,35 min) [70].

V metabolismu kurkuminu byly identifikovány dvě hlavní cesty, *O*-konjugace a redukce. Produkty *O*-konjugace jsou kurkumin-glukuronid a kurkumin-sulfát. Produkty redukce jsou nejčastěji dihydrocurcumin, tetrahydrocurcumin a hexahydrocurcumin, které mohou podléhat následné konjugaci za vzniku příslušných glukuronidů (Obr.1.6 na str. 24) [53, 72].



Obrázek 1.6: Hlavní dráhy biotransformace kurkuminu a jeho metabolity (vytvořeno v programu ChemSketch).

Malé množství kurkuminu absorbovaného tělem je detekováno v krvi ve formě konjugátů, ve volné formě CUR skoro není detekovatelný. Samotný kurkumin má nízkou chemickou stabilitu, což vede ke vzniku degradačních produktů. Například štěpením diketonové skupiny vznikají vanilin, kyselina ferulová a dihydroferulová. Oxidací kurkuminu vzniká bicyklopentadien. Předpokládá se, že produkty biodegradace a metabolity CUR se také mohou podílet na jeho terapeutickém účinku a celkové biologické aktivitě [71].

1.2.1.5 Vliv kurkuminu na extrahepatální isoformy cytochromu P450

Růst klinického významu kurkuminu vede ke zvýšení vědeckého zájmu o pochopení jeho možných lékových interakcí [72]. Například CUR má potenciál být částí terapií proti mnoha typům rakoviny, může tedy být použit v kombinaci s jinými chemoterapeutickými látkami, které jsou známými substráty CYP. Potenciální lékové interakce kurkuminu s jinými chemoterapeutiky a biotransformačními enzymy by však mohly mít závažné následky,

od toxických vedlejších účinků až po zánik terapeutického efektu v důsledku indukce nebo inhibice příslušných enzymů [73]. Známé efekty kurkuminu na vybrané isoformy CYP exprimované v GIT jsou shrnuty v následující tabulce 1.1:

Tabulka 1.1: Vliv kurkuminu na vybrané isoformy cytochromů P450.

Isoforma	Model	Výsledek	Odkaz
CYP1A1	Potkaní jaterní mikrosomy	Potlačení EROD aktivity, IC ₅₀ : 2 μM	74
		Potlačení EROD aktivity, IC ₅₀ : 20 μM	75
	Homogenát z buněk potkaního hepatomu	Inhibiční vliv, IC ₅₀ : 0,74 μM	76
	Bunky epitelálního karcinomu mléčné žlázy	Výrazné zvýšení hladiny mRNA kodující CYP1A1 prostřednictvím aktivace AhR indukční dráhy	77
CYP2C9	Lidské jaterní mikrosomy	Slabá inhibice, IC ₅₀ : 276,8 μM Nebyl pozorován žádný vliv na expresi	73
		Inhibiční vliv, IC ₅₀ : 15,3 μM	78
		^b Smišená inhibice, IC ₅₀ : 36,3 μM, K _i : 10,6 μM	79
	Lidské hepatocyty	50μM CUR vyvolal snížení relativní aktivity na 25,9%	80
	Lidský rekombinantní protein exprimovaný v <i>E.coli</i>	Nekompetitivní inhibice, IC ₅₀ : 4,3 μM, K _i : 11,5 μM	81
	Lidský rekombinantní protein exprimovaný v Supersomech TM	Inhibiční vliv, IC ₅₀ : 14,6 μM	82
		Inhibiční vliv, IC ₅₀ : 6 μM	83
		^a Inhibiční vliv, IC ₅₀ : 1,4 μM	
Člověk	Nebyla pozorována změna ve farmakodynamice metabolizovaného léčiva	84	
CYP3A4	Lidské jaterní mikrosomy	Inhibiční vliv, IC ₅₀ : 24,27 μM	70
		Nebyl pozorován ani inhibiční vliv, ani vliv na expresi	73
		^b Kompetitivní inhibice, IC ₅₀ : 20,3 μM, K _i : 11,0 μM	79
	Lidské hepatocyty	50μM CUR vyvolal snížení relativní aktivity na 61,9%	80
	Lidský rekombinantní protein exprimovaný v Supersomech TM	Inhibiční vliv, IC ₅₀ : 11,9 μM	82
	Lidský rekombinantní protein exprimovaný v <i>E.coli</i>	Kompetitivní inhibice, IC ₅₀ : 16,3 μM, K _i : 7,4 μM	81
	Lidský rekombinantní protein exprimovaný v Bakulosomech TM	10μM CUR vyvolal snížení relativní aktivity na 10%, jeho konjugací metabolity však způsobily významnou aktivaci	85
	Člověk	Nebyla pozorována změna ve farmakodynamice metabolizovaného léčiva	84
	Potkan	Nebyla pozorována změna biodostupnosti substrátu metabolizovaného ortologní formou CYP3A1	86

^aInhibice vyvolaná demethoxykurkuminem. ^bInhibice vyvolaná směsí kurkuminoidů (kurkuminem, demethoxykurkuminem a bisdemethoxykurkuminem).

Byl také pozorován inhibiční vliv směsi kurkuminoidů na aktivitu isoformy CYP2C19 v lidských jaterních mikrosomech, hodnota IC₅₀ činila 7,4 μM [79]. V další *in vitro* studii v lidských hepatocytech nebyl pozorován inhibiční vliv CUR na isoformu CYP2D6 a 58,3 μM kurkumin vyvolal snížení aktivity CYP2C8 o 22,5 % [73]. CUR také inhibuje další isoformy CYP, např. jeho 4,2μM koncentrace způsobila 50% snížení dealkylační aktivity 2B1

v potkaních jaterních mikrosomech. Bylo také zjištěno, že premedikace potkanů kurkuminem výrazně potlačila expresi CYP2B1 indukovanou fenobarbitalem [75]. *In vitro* studie na rekombinantních modelech naznačuje, že CUR vykazuje nejslabší inhibici vůči isoformě CYP1A2 (IC_{50} : 102 μ M) v porovnání s CYP2C9 a CYP3A4 [82]. V další *in vitro* studii na potkaních jaterních mikrosomech se ukázalo, že CUR je velmi slabým inhibitorem CYP2C11 ($IC_{50}>100$ μ M) [78].

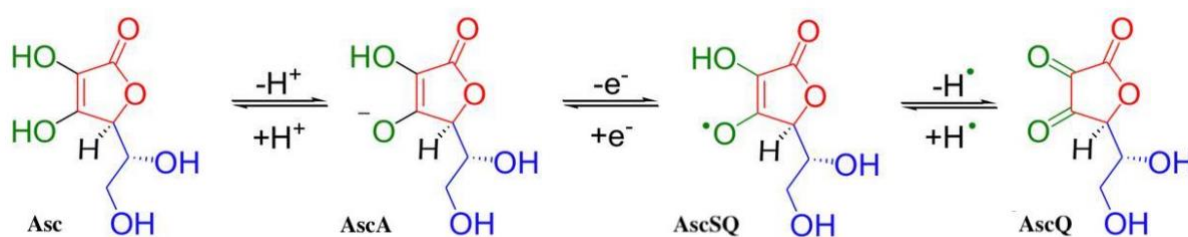
1.2.2 Vitamín C

Vitamín C (kyselina askorbová, Asc) je nízkomolekulární ve vodě rozpustný ketolakton se dvěma ionizovatelnými hydroxylovými skupinami. Díky své struktuře je v přírodě všudypřítomným a nezbytným dárcelem elektronů [87]. Rostliny a většina zvířat syntetizují askorbát z glukózy. U primitivních ryb, obojživelníků a plazů syntéza askorbátu probíhá v ledvinách, zatímco u savců je převážně syntetizován v játrech. Lidé, jiní primáti, morčata a několik druhů netopýrů konzumujících ovoce nemohou syntetizovat askorbát, protože nemají funkční gen kódující enzym potřebný pro poslední krok jeho syntézy - L-gulonolaktonoxidasu [88]. V důsledku toho tyto druhy závisí na dostatečném přísunu vitamínu C ze stravy. Ovoce a zelenina obsahují dostatečné množství askorbátu a ~90% jeho denního příjmu v běžné populaci pochází právě z těchto zdrojů. Obsah se u jednotlivých druhů liší, ale citrusové plody, kiwi, mango a zelenina, jako je brokolice, rajčata a paprika, se považují za bohaté zdroje vitamínu C [87].

Klinickým znakem závažného a dlouhodobého nedostatku vitamínu C jsou kurděje, které se projevují zhoršeným hojením ran, zánětem dásní, perifolikulárním krvácením, ekchymózou a petechií. Tyto projevy do značné míry souvisejí se zhoršenou kolagenovou biosyntézou. Ačkoli nedostatek vitamínu C je způsoben hlavně nevyváženou stravou, bylo identifikováno několik dalších rizikových faktorů, včetně kouření, těhotenství, genetické predispozice, namáhavého cvičení a klinických stavů spojených s metabolickým syndromem, jako je hypertenze, cukrovka a obezita [89]. Doporučená denní dávka vitamínu C pro dospělé ve věku 25–51 let je cca 100 mg [90]. Užívaná dávka askorbátu v potravinových suplementech pro dospělé má rozmezí 100-1000 mg. Při nachlazení může být dávka zvýšena až na 3000 mg denně [91].

1.2.2.1 Antioxidační účinek vitamínu C

Chemická struktura vitamínu C (Obr.1.7) je složena z laktonového kruhu, dvou enolických hydroxylových skupin a postranního řetězce obsahujícího primární a sekundární alkoholovou skupinu. Tvorba dvou mezimolekulárních vodíkových vazeb podstatně přispívá k celkové stabilitě askorbátu. Enolická forma α -ketolaktonu, známá jako (R)-3,4-dihydroxy-5-((S)-1,2-dihydroxyethyl)-furan-2(5H)-on, se snadno oxiduje za tvorby diketonu (kyseliny dehydroaskorbové) (Obr. 1.7) [92].



Obrázek 1.7: Redoxní cyklus a struktura vitamínu C. Laktonový kruh je označen červeně, enolické hydroxylové skupiny – zeleně, primární a sekundární alkoholové skupiny postranního řetězce – modře. Odštěpením protonu vzniká aniont kyseliny askorbové (AscA), po následném odevzdání elektronu vzniká její semichinonová forma (AscSQ, askorbyl-radikál), při odštěpení vodíkového radikálu v procesu oxidace vzniká chinonová forma vitamínu C (AscQ, kyselina dehydroaskorbová). (Převzato a upraveno z [103]).

V organismu hraje kyselina askorbová roli donoru elektronů, protože díky nízkému elektronovému potenciálu a rezonanční stabilitě má schopnost darovat atom vodíku a vytvořit relativně stabilní askorbyl-radikál (AscSQ). Přesto tato forma odštěpuje další dva elektrony z dvojné vazby laktonového kruhu. Díky popsaným vlastnostem má vitamín C schopnost snižovat hladinu reaktivních forem kyslíku a dusíku, čímž účinně udržuje intracelulární redoxní rovnováhu a minimalizuje oxidační poškození způsobené reaktivními formami kyslíku [93]. Bylo prokázáno, že askorbát neenzymaticky redukuje superoxidový (O^{2•-}), hydroxylový (HO[•]), alkoxylový (RO[•]), peroxylový (ROO[•]) a další radikály. Kyselina askorbová také potlačuje hladinu tokoferolového radikálu, vznikajícího při redukcí volných radikálů v lipidovém prostředí tokoferolem (vitaminem E). Popsané radikály odštěpují jeden atom vodíku z kyseliny askorbové a oxidují je na askorbyl-radikál [94].

V přítomnosti katalytických kovových iontů může však askorbát mít i prooxidační účinky. Askorbát má schopnost redukovat železité kationty (Fe³⁺) na železnaté (Fe²⁺) za vzniku askorbyl-radikálu [106]. V závislosti na koordinačním prostředí může Fe²⁺ snadno reagovat s kyslíkem a redukovat ho na superoxidový radikál, který dává vznik H₂O₂ a O₂. Železnatý iont následně reaguje s H₂O₂ za vzniku Fe³⁺ a velmi aktivního hydroxylového radikálu. Přítomnost

askorbátu umožňuje cyklickou přeměnu Fe^{3+} zpět na Fe^{2+} , což podporuje tvorbu vysoce reaktivních volných radikálů z molekuly peroxidu vodíku [95].

1.2.2.2 Biologické funkce vitamínu C

Za 80 let od objevu vitamínu C se seznam jeho biologických funkcí neustále rozšiřuje. Biologická role vitamínu C souvisí s jeho redukovanou formou a lze ji rozdělit na enzymové a neenzymové funkce. Enzymová funkce vitamínu C spočívá v tom, že vystupuje jako kofaktor pro dioxygenasy závislé na Fe^{2+} -2-oxoglutarátu podílející se na biosyntéze kolagenu. Askorbát také nepřímo moduluje vasodilataci zvýšením syntézy NO prostřednictvím redukce sapropterinu – kofaktoru pro endoteliální NO-synthasu [87, 96].

Askorbát se podílí na mnoha fyziologických a biochemických procesech zahrnujících enzymové reakce, které jsou katalyzovány enzymy z rodiny dioxygenas závislých na Fe^{2+} -2-oxoglutarátu [97, 98]. Je známo, že tyto enzymy zprostředkují správnou syntézu kolagenu. Jedná se o prolin-4-hydroxylasu a prolin-3-hydroxylasu, které se nacházejí v lumen endoplazmatického retikula a jsou zodpovědné za vložení hydroxylových skupin na zbytky prolinu, což je nezbytná modifikace v rámci biosyntézy kolagenu [99]. Tyto dioxygenasy používají 2-oxoglutarát jako kosubstrát a jako zdroj pro dva ze čtyř elektronů potřebných pro redukci kyslíku. Přenášejí jeden atom kyslíku z O_2 na 2-oxoglutarát za vzniku sukcinátu, druhý atom kyslíku je přenesen na proteinový substrát. Askorbát je pro tento proces nezbytnou složkou, neboť udržuje železo ve stavu s oxidačním číslem II, čímž je zajištěna plná aktivita popsané třídy enzymů [88, 98]. Kolagen v extracelulárním prostoru hraje důležitou roli fyzické bariéry proti šíření a metastazování rakovinných buněk. Bylo prokázáno, že askorbát stimuluje produkci kolagenu ve fibroblastech lidské kůže [88].

Studie také naznačují, že askorbát nepřímo snižuje hladinu hypoxií indukovaného faktoru (angl. HIF: «hypoxia-inducible factor»). V hypoxických podmínkách aktivovaný komplex HIF funguje jako transkripční faktor pro kontrolu exprese genů kódujících produkty zaměřené na obnovení buněčné homeostázy, jako jsou erythropoetin, vaskulární endoteliální růstový faktor a několik glykolytických enzymů. Aktivace HIF je považována za důležitou složku angiogeneze nádorových tkání [88,100]. Bylo prokázáno, že cytoplazmatické prolin-hydroxylasy regulují aktivitu HIF, který je stále přítomen v buňce nezávisle na parciálním tlaku kyslíku. V normoxii je HIF ale účinně hydroxylován těmito enzymy. Hydroxylovaný HIF se poté váže na komplex ubikvitin-ligasy, což vede k jeho ubikvitinaci a následné proteazomální degradaci. Jako členové rodiny Fe^{2+} -2-oxoglutarát-dependentních dioxygenas, HIF-prolin-hydroxylasy vyžadují pro svou funkci askorbát jako redukční činidlo k udržení železa

v železnatém stavu [101]. Studie *in vitro* naznačují, že velké dávky askorbátu skutečně potlačují tvorbu kapilár ve tkáních [102]. Tato důležitá zjištění naznačují, že vysoká hladina askorbátu v tkáni může chránit před aktivací hypoxií indukovaného faktoru a agresivní proliferací nádorových buněk [88,101].

Bylo také zjištěno, že askorbát má vliv na demethylaci histonů, která je také katalyzována enzymy závislými na Fe^{2+} -2-oxoglutarátu [103]. Předpokládá se, že příjem askorbátu může zlepšit funkci epigenetických modifikátorů, protože mnoho z nich patří do rodiny dioxygenas závislých na Fe^{2+} -2-oxoglutarátu [104]. Vzhledem k tomu, že hypermethylace DNA je spojena s vývojem rakoviny, askorbát by potenciálně mohl snižovat pravděpodobnost maligní transformace modulací složek systémů nastavujících epigenetický kód [105].

Kyselina askorbová je také vyžadována jako redukční činidlo pro dopamin- β -monooxygenasu, která hydroxyluje dopamin za vzniku noradrenalinu. Začleňuje jeden atom molekulárního kyslíku do substrátu a druhý redukuje na H_2O , pro tento proces jsou zapotřebí dvě molekuly kyseliny askorbové, z nichž každá daruje jeden atom vodíku pro vznik molekuly vody [106,107].

Kromě svých rolí ve výše uvedených enzymových procesech je askorbát silným antioxidantem se schopností redukovat (pato)fyziologicky významné volné radikály a reaktivní formy kyslíku. Askorbát také regeneruje vitamin E (α -tokoferol) z jeho oxidované formy (α -tokoferoxylového radikálu), čímž nepřímo potlačuje peroxidaci lipidů. Askorbát může také redukovat urát a glutathionové radikály jako součást antioxidační sítě v buňkách a extracelulárních tekutinách. Je známo, že vitamin C účinně chrání biologické makromolekuly před oxidačním poškozením, které by jinak mohlo přispět k zahájení a progresi několika chronických a akutních onemocnění [87, 88].

1.2.2.3 Biotransformace vitamínu C

Nízkomolekulární léčiva a xenobiotika jsou normálně metabolizována působením kombinace biotransformačních enzymů. Biotransformace vede k tvorbě oxidovaných a konjugovaných metabolitů, které vykazují zvýšenou hydrofilitu podmiňující jejich lepší vylučování z organismu [108]. Askorbát se účastní mnoha fyziologických oxidačně-redukčních reakcí jako donor elektronů, což je základem cyklického charakteru jeho biotransformace v organismu. Působí jako specifický kofaktor nebo antioxidant a tím se oxiduje na askorbyl radikál, který následně může podstoupit dismutaci za vzniku recyklované molekuly askorbátu a kyseliny dehydroaskorbové [109]. Přestože má kyselina dehydroaskorbová poločas rozpadu jen několik minut, je normálně enzymově redukována zpět na askorbát, což je intracelulární

proces, který je u zdravých jedinců účinný i detekovatelný. Ukázalo se však, že uvedený proces recyklace askorbátu může mít sníženou účinnost u pacientů trpících řadou onemocnění a například u kuřáků, což se projevuje v jeho zvýšené potřebě. Zvýšený příjem vitamínu C tedy může být nezbytný k dosažení homeostázy u pacientů z rizikových skupin [108, 110]. Jak již bylo zmíněno, produkt antioxidačního účinku askorbátu - kyselina dehydroaskorbová je řadou buněk zpátky redukována na askorbát, čímž je jeho homeostatická úroveň efektivně zachována. Obrat vitamínu C je proto zvláště spojen s katabolismem kyseliny dehydroaskorbové, v němž dochází k její hydrolýze na kyselinu 2,3-diketogulonovou a dekarboxylaci na l-xylonát a l-lyxonát, které mohou vstoupit do pentózové dráhy pro následnou degradaci [111].

1.2.2.4 Vliv vitamínu C na zkoumané isoformy cytochromu P450

V rámci *in vitro* studie v homogenátu z buněk potkaního hepatomu bylo pozorováno nevýrazné potlačení dealkylační aktivity cytochromů P450 podrodiny 1A askorbátem, jehož 5 μ M koncentrace způsobila snížení relativní aktivity o 7 % [76]. Další *in vitro* studie prokázala, že askorbyl palmitát, biologicky dostupnější forma askorbátu, působí v lidských jaterních mikrosomech jako kompetitivní reverzibilní inhibitor CYP3A4 [112]. Byl však pozorován i aktivační vliv askorbátu na rekombinantní CYP3A4. Přídavek vitamínu C vyvolával zvýšení katodického píku enzymu v přítomnosti diklofenaku (typického substrátu pro tuto isoformu), což svědčí o možném vlivu elektrokatalýzy a stimulačním efektu askorbátu [113]. Jeho aktivační vliv byl také pozorován v další *in vitro* studii, kde lidské rekombinantní CYP2C9 a CYP2D6 po přidání vitamínu C do inkubační směsi vykazovaly zvýšení hodnoty V_{max} . Předpokládá se, že přídavek antioxidantu zvyšuje stabilitu enzymu prostřednictvím efektivnějšího odstranění volných radikálů vznikajících během katalýzy, což se projevuje rostoucí hodnotou maximální rychlosti [114]. V rámci jedné klinické studie byl stanoven vliv vitamínu C na aktivitu CYP3A4 pomocí erytromycinového dechového testu. Suplementace vitamínem C nevyvolala konzistentní účinek v studované populaci jako celku, u mužů však bylo pozorováno statisticky významnější zvýšení průměrné aktivity CYP3A4 o 21,9% [115].

1.2.3 Vzájemné interakce kurkuminu a askorbátu

Antioxidanty představují přirozenou složku obranného mechanismu živých organismů. Likvidují toxické volné radikály, čímž podporují zachování homeostázy. Kurkumin je známým antioxidantem, stejně jako askorbát vykazuje ochranný účinek proti oxidačnímu poškození vyvolanému volnými radikály. Existuje řada *in vivo* studií věnovaných antioxidačnímu účinku

samotného kurkuminu a vitamínu C na experimentálních zvířatech s chemicky vyvolaným oxidačním stresem. V současné době je však poměrně málo studií věnovaných účinku kombinace těchto dvou antioxidantů. Ukázalo se, že podání kurkuminu spolu s askorbátem před působením kadmia vyvolávajícího hepatotoxicitu by mohlo silněji podpořit reparační procesy a poskytnout větší ochranu než premedikace samotným kurkuminem nebo askorbátem. [116]. Další studie naznačují, že předléčba poškození jater vyvolaného methotrexátem pomocí kombinace vitamínu C a kurkuminu vyvolává významnější snížení sérových hladin alanintransaminázy, aspartáttransaminázy, alkalické fosfatázy a laktátdehydrogenázy a významné zvýšení tkáňové hladiny superoxiddismutázy a glutathionu. Bylo také pozorováno významné snížení hladin malondialdehydu a celkové zlepšení histopatologických změn v jaterních tkáních, což potvrzuje potenciální hepatoprotektivní účinky kombinované terapie [117]. Ukázalo se také, že kombinace kurkuminu, askorbátu a glycyrrhizínu může být užitečná při regulaci imunitní odpovědi v boji proti infekci SARS COV-2 a potlačení nadměrné zánětlivé reakce, aby se zabránilo nástupu cytokinové bouře [118].

Rovněž se předpokládalo, že interakce polyfenolů s askorbátem může představovat podobný synergický mechanismus, jako v případě redoxního cyklu mezi vitamínem C a α -tokoferolem [119]. V rámci podrobnější studie byl však prokázán opak: kurkumin vykazoval antagonistický účinek v kombinaci s kyselinou askorbovou při kvantitativním sledování jejich redoxní aktivity. Navíc měl významně vyšší antioxidační aktivitu než askorbát [120].

1.2.4 Biochemická role iontů kovů

Kovové ionty hrají esenciální roli v biologických systémech. Změna distribuce jednotlivých iontů v buňce ovlivňuje celou řadu biochemických procesů [121]. Některé ionty kovů vystupují jako signální a katalytické faktory nebo představují důležité strukturní složky biologických makromolekul. Významně ovlivňují biosystém a hrají zásadní roli ve fyziologických procesech, jako jsou udržování buněčné homeostázy, regulace metabolických drah, biosyntéza, přenos signálů a energetická přeměna [122,123]. Nadbytek, deficience nebo abnormální distribuce kovových iontů narušuje vitální buněčné funkce, což se projevuje nejenom poruchou metabolismu, ale i buněčnou smrtí. To naznačuje možné aplikace kovových iontů v protinádorové léčbě. Ve srovnání s tradičními chemoterapeutickými léky lze většinu kovových iontů využít proti širokému spektru nádorů s vysokou účinností a bez vzniku lékové rezistence [123]. V současné době je deficience minerálních látek poměrně vzácná, existují však rizikové skupiny jedinců, pro jejichž klinický stav je potřeba přísně sledovat dostatečný

příjem některých iontů kovů, jako je např. hořčík, zinek, měď a železo [124]. Mezi seniory jsou ionty kovů nejčastěji využívány pro podporu funkce štítné žlázy, imunitního systému a prevenci kardiovaskulárních onemocnění a osteoporózy [125, 126]. Tato diplomová práce je věnována studiu Mg^{2+} a Zn^{2+} iontů. Hořečnaté ionty jsou užívány v rámci léčby nespavosti [127] a zlepšení funkcí kosterního svalstva [128], zatímco užívání zinečnatých iontů je spojeno s podporou kognitivních funkcí, mineralizace kostí a srážení krve [129].

1.2.4.1 Funkce hořečnatých iontů

Hořčík ve formě dvojmocného kationu (Mg^{2+}) je druhý nejvíce zastoupený ion v eukaryotické buňce po draslíku. Hraje nezbytnou roli v řadě fyziologických a biochemických procesů [130]. Mg^{2+} působí především prostřednictvím vazby na biomolekuly, jako jsou proteiny, nukleové kyseliny a nukleotidy [131]. Podílí se jako kofaktor na více než 600 enzymových reakcích, které jsou většinou závislé na adenosintrifosfátu. Zasahuje do cest degradace makroživin, oxidační fosforylace, proteosyntézy a replikace DNA. Reguluje neuromuskulární excitabilitu, sekreci parathormonu a svalovou kontrakci, také ovlivňuje tonus cév a krevní tlak. Chronický deficit Mg^{2+} zvyšuje riziko arytmií a kardiovaskulárních komplikací v důsledku rozvoje aterosklerózy [130]. Hořčík je fyziologický antagonist vápníkových kanálů, reguluje propustnost membrán interakcí s fosfolipidy a stabilizuje membránové struktury [130,132]. Je zastoupen ve svalových buňkách, měkkých tkáních, krevním séru a erythrocytech. Nejvyšších koncentrací dosahuje intracelulárně a v matrici kostí. Mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem projevuje Mg^{2+} poměrně slabý koncentrační gradient [133]. Doporučená denní dávka hořčíku pro dospělé ve věku 25–51 let je 350 mg [134]. Běžně užívaná dávka v potravinových suplementech je 500-750 mg [135]. Předpokládá se, že je intestinálně absorbováno pouze 30-40% konzumovaného Mg^{2+} [136].

1.2.4.2 Funkce zinečnatých iontů

Zinek (Zn^{2+}) je stopový prvek regulující řadu fyziologických procesů. Je nezbytný pro růst a vývoj organismu a je považován za antioxidační prvek [137]. Vyskytuje se ve formě kofaktoru ve stovkách enzymů a v tisících proteinových domén. Na buněčné úrovni reguluje proliferaci, diferenciaci a apoptózu. Mezi fyziologickými funkcemi vyžadujícími Zn^{2+} patří imunitní odpověď, intermediární metabolismus, replikace a oprava DNA, reprodukce, vidění a chuť. Kromě toho je zinek nezbytný pro neurogenezi, synaptogenezi, růst neuronů a proces neurotransmise. Je uložen ve specifických synaptických vezikulech glutamínergních neuronů

a je uvolňován jako neuromodulátor [138]. Zn^{2+} moduluje stabilitu biologických membrán a uspořádání multiproteinových komplexů. Ovlivňuje funkční kapacitu buněk ve vrozeném a adaptivním imunitním systému, má regulační účinek na produkci cytokinů, aktivitu komplementu a produkci protilátek [139].

Zinek je považován za redoxně inertní kov, neboť se bezprostředně neúčastní redoxních reakcí. Funkce zinku jako antioxidantu je popsána dvěma různými mechanismy: (i) ochranou thiolových skupin proteinů před působením volných radikálů a (ii) potlačením tvorby ROS na základě antagonismu s redoxně aktivními přechodnými kovy, jako jsou železo a měď [140]. Bylo zjištěno, že zinek chrání proteiny obsahující thiolové skupiny, například dihydroorotasu. Antagonismus Zn^{2+} vůči redoxně aktivním kovům spočívá v podobnosti jejich elektronových obalů, což umožňuje vytlačení iontů železa či mědi z vazebného místa a jejich následné nahrazení zinkem. Vytlačený redoxně aktivní kov pak může opustit buňku, čímž se sníží jeho schopnost katalyzovat Fentonovou reakci vedoucí k tvorbě hydroxylových radikálů [141]. Klinické studie naznačují, že nedostatek zinku je spojen se zvýšenou úrovní oxidačního stresu, včetně zvýšené oxidace lipidů, bílkovin a DNA [141,142]. Doporučená denní dávka zinku pro dospělé je 10 mg [143], zatímco běžná denní dávka zinečnatých iontů v suplementech činí 15-25 mg [144]. Suplementace zinkem byla účinná v rámci prevence infekčních onemocnění u starších pacientů se srpkovitou anémií a má příznivý účinek při léčbě infekčních onemocnění dýchacích cest u dětí [141].

1.2.4.3 Vliv Mg^{2+} a Zn^{2+} iontů na cytochrom P450

Vzhledem k tomu, že CYP patří k metaloproteinům, jeho katalytická schopnost je bezprostředně závislá na koordinačním okolí železitého iontu v hemu. Lze předpokládat, že přítomnost dalších iontů kovů v blízkosti aktivního centra se může projevit i na enzymové aktivitě. Studie naznačují, že kovové ionty mají významný vliv na proces přenosu elektronů v rámci katalytické reakce a změnu redoxních potenciálů jejich účastníků [145]. Dřívější studie ukázala, že ionty kovů alkalických zemin (např. Mg^{2+}) vyvolávají ve struktuře CYP101 konformační změnu a distorzi v aktivním centru. Bylo stanoveno, že přítomnost Mg^{2+} iontů usnadňovala vazbu substrátu a tvorbu vysokospinové formy železa v hemu [146]. Byl také pozorován stimulační vliv hořečnatých iontů na CYP3A4 v lidských jaterních mikrosomech. Předpokládá se, že podobný efekt je dán zesílením elektronového přenosu v důsledku interakce Mg^{2+} s cytochromem b_5 a P450-reduktasou, na jejichž aktivitě je CYP závislý [147]. V rámci další *in vitro* studie na lidských jaterních mikrosomech nebyl pozorován žádný signifikantní vliv hořečnatých iontů na aktivitu CYP [148]. V *in vitro* studii přidavek zinečnatých iontů

vyvolal potlačení přeměny testosteronu rekombinantní isoformou CYP3A4, hodnota IC_{50} činila 27 μM [149]. Předpokládá se, že inhibiční účinek Zn^{2+} může být spojen s jeho vlivem na cytochrom b₅, který přispívá k přenosu elektronů v katalytickém procesu [149,145].

2 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce je stanovení vlivu několika složek potravinových doplňků a jejich směsí na aktivitu cytochromů P450 *in vitro*. Studie byla zaměřena na CYP3A4 a CYP1A1 vyskytující se v GIT.

Hlavní cíle:

- Provedení literární rešerše věnované CYP1A1, CYP3A4, CYP2C9 a vlivu vybraných biologicky aktivních látek na jejich aktivitu
- Stanovení vlivu askorbátu, hořečnatých a zinečnatých iontů na rychlost enzymových reakcí katalyzovaných CYP1A1, CYP3A4 a CYP2C9.
- Určení hodnoty IC₅₀ (koncentrace způsobující 50% inhibici) pro kurkumin vůči každé z uvedených isoform CYP.
- Stanovení případného inhibičního vlivu kurkuminu na aktivitu NADPH:cytochrom-P450 oxidoreduktasy.
- Stanovení vlivu směsí obsahujících kurkumin, askorbát a zinečnaté, resp. hořečnaté ionty na aktivitu uvedených isoform s předběžnou 30-minutovou inkubací při 37 °C v prostředí pufru a bez ní.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použité chemikálie a biologický materiál

Chemapol, ČR: chlorid hořečnatý

Cypex BioIVT, USA: lidský rekombinantní CYP3A4LR v Baktosomech™ s nízkým obsahem P450-reduktasy (low reductase)

Fluka, Švýcarsko: tokoferol (Vit. E)

Gentest BD Bioscience, USA: lidský rekombinantní CYP1A1v Supersomech™

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK: játra potkanů premedikovaných Sudanem I, kurkumin (95% čistota)

Lach:Ner, ČR: chlorid draselný, chlorid sodný, dihydrogenfosforečnan draselný, EDTA, ethylacetát, glycerol, kyselina askorbová

Lachema, ČR: pyrofosfát sodný, uhličitan sodný

Linde, ČR: kapalný dusík

NZYtech, USA: Tris-base

Penta, ČR: hydroxid draselný

Roche GmbH, Německo: NADPH

Sigma-Aldrich, USA: dimethylsulfoxid, chlorid zinečnatý, cytochrom c, 7-ethoxyresorufin, fenacetin, resorufin, 6 β -hydroxytestosteron, testosteron

ThermoFisher Scientific, USA: Microplate BCA Protein Assay Kit

VWR Chemicals, Francie: acetonitril (HPLC), methanol (HPLC)

3.2 Použité přístroje

Analytické váhy:

40SM-200A, Pesa, Švýcarsko

Automatické pipety:

Eppendorf, Německo

Centrifugy:

Centrifuga 5418, úhlový rotor, Eppendorf, Německo

Minicentrifuga SpectrafugeTM, úhlový rotor, Labnet, Korea

Centrifuga Hermle Z 383 K, výkyvný rotor, Hermle LaborTechnik Německo

Centrifuga Allegra X-30, úhlový rotor F0630, Beckman Coulter (USA)

Ultracentrifuga Optima XPN-90, úhlový rotor 45Ti, Beckman Coulter (USA)

Filtrační zařízení na pufry:

Millipore StericupTM filtration system, Sigma-Aldrich, USA

HPLC systém:

HPLC systém Agilent Technologies 1200 Series, Agilent Technologies, USA

Pumpa: Agilent 1200 Series Quaternary Pump

Autosampler: Automated Sample Injector ALS G1329A

Detektor: Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector (G4212A)

Vakuový odplyňovač G1322

Termobox pro kolonu: LCO 101, ECOM, ČR

Předkolona: Nucleosil 8×4 mm, 100–5, C₁₈, Macherey-Nagel, Německo

Kolona: Nucleosil 250×4 mm, C₁₈, 100–5, HD, Macherey-Nagel, Německo

Program: ChemStation Online 1

Inkubátor:

Thermomixer Compact, Eppendorf, Německo

Magnetická míchačka:

C-MAG MS 4, IKA, Německo

Variomag, Monotherm, Německo

Předvážky:

EW 600-2M, Kern, Německo

pH-metr:

pH metr ATI Orion 211 s kombinovanou elektrodou, ATI Orion, USA

Spektrofotometr

DeNovix DS-11+, NanoDrop Technologies, Inc, USA

Agilent Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies, USA

Spektrofotometr + fluorimetr:

Infinite M200 PRO Multimode Microplate Reader, TECAN, Švýcarsko

Vakuová odparka:

CentriVap Benchtop vacuum concentrator, Labconco, USA

Vortex:

MS1 Minishaker, IKA, Německo

3.3 Použité metody

3.3.1 Izolace mikrosomální frakce

Izolace mikrosomů byla provedena diferenční centrifugací modifikovaným postupem podle Lindström-Seppä [150]. Mikrosomální frakce byla izolována ze spojených jater čtyř potkanů premedikovaných Sudanem I, který je známým induktorem CYP1A [151] postupem dle Stiborové [151]. Premedikace potkanů a odběr tkáně nebyl součástí předkládané diplomové práce, odebraná tkáň byla uskladněna v mrazícím boxu při -80 °C.

Celá procedura probíhala v chlazené místnosti při teplotě 5°C, všechny materiály a roztoky byly předem vychlazeny. Pro izolaci mikrosomů byly používány následující pufrы:

Pufr P1: 150 mM KCl; 50 mM TRIS; 1 mM EDTA; 20 μM vitamin E; pH 7,4

Pufr P2: 100 mM Na₄P₂O₇·10 H₂O; 1 mM EDTA; pH 7,2

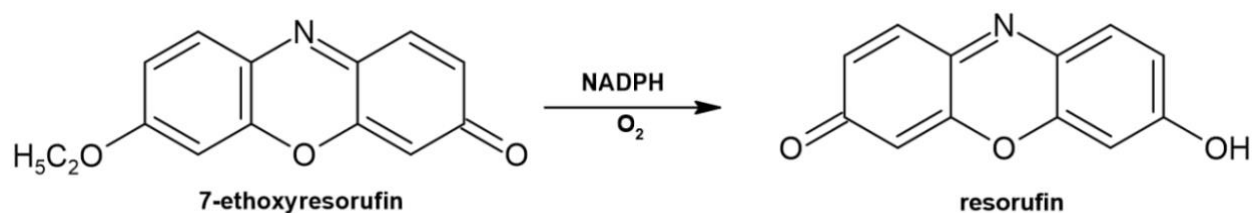
Pufr P3: 150 mM KCl; 50 mM TRIS; 1 mM EDTA; 20% v/v glycerol; pH 7,4

Tkáň určená k izolaci byla zvážena, nejemno nastříhána, a několikrát promyta v pufru P1, jehož objem odpovídal přibližně 2-násobku hmotnosti tkáně. Odkrvené kousky tkáně byly poté v malých dávkách dvakrát homogenizovány v Potter-Elvehjemově homogenizátoru (nejprve ve volnějším, potom v těsnějším). Na homogenizaci byl použit pufr P1 o objemu odpovídajícímu čtyřnásobku hmotnosti tkáně. Vzniklý homogenát byl přefiltrován přes 3 vrstvy gázy a centrifugován 10 minut při 620 g a teplotě 0 - 5°C (centrifuga Hermle Z 383K, výkyvný rotor 4 × 70 ml, 2 000 RPM). Získaný supernatant byl centrifugován po dobu 20 minut při 15 000 g a teplotě 0 - 5°C (centrifuga Allegra X-30R, úhlový rotor F0630 6 × 35 ml, 11 500 RPM). Supernatant byl následně oddělen od sedimentu lehce sedlé vrstvy a centrifugován po dobu 90 minut při 123 000 g a teplotě 4 °C (ultracentrifuga Beckman Optima XPN-90, úhlový rotor 45 Ti 6 × 94 ml, 45 000 RPM). Vzniklá peleta byla resuspendována a homogenizována v pufru P2, jehož objem přibližně odpovídal ½ objemu homogenizačního pufru P1. Získaná suspenze byla poté znovu odstředěna po dobu 50 minut při teplotě 5°C (ultracentrifuga Beckman Optima XPN-90, úhlový rotor 70 Ti 8 × 39 ml, 59 000 RPM). Po centrifugaci byl sediment s mikrosomální frakcí resuspendován v pufru P3, jehož objem odpovídal čtvrtině původní hmotnosti jater. Připravený preparát mikrosomální frakce byl rozpipetován na alikvoty, které byly následně zmrazeny v kapalném dusíku a uskladněny v hlubokomrazícím boxu při -80 °C.

Koncentrace proteinů v izolovaných jaterních potkaních mikrosomech byla stanovena podle návodu komerční sady Microplate BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, USA).

3.3.2 Stanovení aktivity cytochromu P450 1A1 – *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu

O-deethylace 7-ethoxyresorufinu je považována za specifickou markerovou reakci pro měření aktivity isoformy CYP1A1. Tato reakce poskytuje produkt resorufin (Obr. 3.1), po jehož excitaci zářením o vlnové délce 530 nm je emitováno fluorescenční záření o vlnové délce 585 nm [152]. Díky popsané vlastnosti resorufinu lze průběh enzymové reakce kontinuálně sledovat fluorimetricky.



Obrázek 3.1: *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu – markerová reakce isoformy CYP1A1 (vytvoreno v programu ChemSketch).

Pomocí markerové reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu byl sledován vliv složek potravinových doplňků (resp. jejich směsí) jak na CYP1A1 v potkaních jaterních mikrosomech, tak na rekombinantní lidský CYP1A1 v SupersomechTM.

Před měřením byly SupersomyTM a mikrosomy optimálně ředěny pufrům tak, aby nárůst fluorescence způsobený vznikem resorufinu byl lineární s časem.

Byly připraveny inkubační směsi o objemu 200 μ l o celkovém složení:

- 0,1 M fosfátový pufr ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4)
- 2 μ M 7-ethoxyresorufin (0,4mM zásobní roztok v methanolu)
- Rekombinantní lidská isoforma CYP1A1 o koncentraci 7,5 pmol/ml (1 nmol/ml v SupersomechTM) nebo potkaní jaterní mikrosomy o koncentraci proteinů 0,05 mg/ml (zásobní koncentrace 15 mg/ml)
- 0,5 mM NADPH (5 mM zásobní roztok ve fosfátovém pufru)
- Složka potravinových suplementů (resp. směs složek) o příslušné koncentraci, resp. odpovídající množství příslušného rozpouštědla pro neinhibovaný vzorek:
 - Kurkumin v rozmezí koncentrací 0,05-50 μ M
(200x koncentrovanější zásobní roztoky v dimethylsulfoxidu (DMSO))
 - Vitamín C v rozmezí koncentrací 0,02-10 mM
(10x koncentrovanější zásobní roztoky ve fosfátovém pufru)
 - $\text{ZnCl}_2/\text{MgCl}_2$ v rozmezí koncentrací 0,4-1000 μ M
(10x koncentrovanější zásobní roztoky v deionizované vodě)

- Směs obsahující 1 μM CUR (zásobní roztok v DMSO o koncentraci 200 μM) a jednu z následujících kombinací: 1mM Asc + 0,1mM ZnCl₂ /MgCl₂; 200 μM Asc + 20 μM ZnCl₂/MgCl₂; 50 μM Asc + 5 μM ZnCl₂/ MgCl₂ (10x koncentrovanější zásobní roztoky v deionizované vodě)
- Ekvimolární směs obsahující CUR, Asc a ZnCl₂, resp. MgCl₂ v koncentračním rozmezí 0,5-10 μM

Nejprve byla připravena preinkubační směs obsahující CYP, pufr a 7-ethoxyresorufin. Po 5-minutové preinkubaci při 37 °C a 400 RPM na termobloku (Thermomixer compact) byla směs pipetována do jamek mikrotitrační destičky. Následně byly přidány roztoky složek potravinových doplňků, resp. jejich směsi. Do kontrolního neinhibovaného vzorku a slepého vzorku bez NADPH bylo přidáno odpovídající množství příslušného rozpouštědla. Obsah organických rozpouštědel nepřesahoval 1 % celkového objemu reakční směsi. Reakce byla zahájena přidáním 20 μl 5mM roztoku NADPH, do jamky obsahující slepý vzorek bylo přidáno 20 μl pufru.

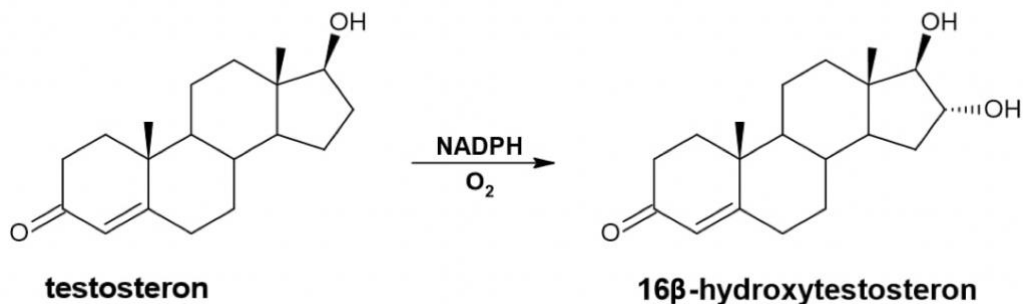
Při sledování vlivu směsí na enzymovou aktivitu byla také provedena předběžná inkubace všech složek potravinových doplňků (CUR, Asc, ZnCl₂/MgCl₂). Požadovaný objem zásobního roztoku CUR nebo směsi složek byl přidán do jamky, roztok byl doplněn pufrům do objemu 100 μl a nechán inkubovat ve fluorimetru po dobu 30 minut při 37 °C. Posléze bylo přidáno 80 μl preinkubační směsi obsahující potřebné množství CYP a 7-ethoxyresorufinu v pufru, které byly předem temperovány 3 min na 37 °C. Reakce byla startována roztokem NADPH.

Nejprve byla sestrojena kalibrační křivka reprezentující závislost intenzity fluorescence na množství standardu resorufinu. Nárůst fluorescence po zahájení enzymové reakce byl měřen během 5 minut v časových intervalech 15 sekund při excitační vlnové délce 530 nm a emisní vlnové délce 585 nm. Ze směrnice přímky závislosti fluorescence na čase bylo pomocí kalibrační křivky kvantifikováno množství vznikajícího produktu. Pozorována rychlost reakce vyjádřená jako látkové množství vzniklého resorufinu za minutu byla vztahena na pmol CYP, resp. mg proteinů v mikrosomech. Rychlost reakce vzorku s přidanou složkou potravinových suplementů (resp. s přidanou směsí) byla porovnána s rychlostí reakce neinhibovaného vzorku představujícího 100% reakční rychlost. Tímto způsobem byla vypočtena relativní aktivita vyjádřená v procentech.

Statistická významnost získaných výsledků byla vyhodnocena pomocí T-testu v MS Excel.

3.3.3 Stanovení aktivity cytochromů P450 3A4 – 6β-hydroxylace testosteronu

Markerová reakce přeměny testosteronu na 6β-hydroxytestosteron (Obr. 3.2) se běžně používá ke stanovení aktivity isoformy CYP3A4 [153].



Obrázek 3.2: 6β-hydroxylace testosteronu – markerová reakce isoformy CYP3A4 (vytvořeno v programu ChemSketch).

V rámci této diplomové práce byla 6β-hydroxylace testosteronu využita pro sledování vlivu složek potravinových suplementů na aktivitu rekombinantního CYP3A4 exprimovaného v Baktosomech™.

3.3.3.1 Příprava reakčních směsí

Inkubační směsi o objemu 500μl obsahovaly následující složky:

- 0,1 M fosfátový pufr ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4)
- 20 μM testosteron (zásobní roztok v methanolu o koncentraci 4 mM)
- CYP3A4 o koncentraci 30 pmol/ml (3 nmol/ml v Baktosomech™)
- 1 mM NADPH (zásobní roztok ve fosfátovém pufru o koncentraci 10 mM)
- Složka potravinových suplementů (resp. směs složek) o příslušné koncentraci, resp. odpovídající množství příslušného rozpouštědla pro neinhibovaný vzorek:
 - Kurkumin v rozmezí koncentrací 0,5-50 μM (200x koncentrovanější zásobní roztoky v DMSO)
 - Vitamín C v rozmezí koncentrací 0,02-10 mM (10x koncentrovanější zásobní roztoky ve fosfátovém pufru)
 - ZnCl_2 v rozmezí koncentrací 5-250 μM (10x koncentrovanější zásobní roztoky v deionizované vodě)
 - MgCl_2 o koncentraci 5-250 μM (10x koncentrovanější zásobní roztok v deionizované vodě)
 - Směs obsahující 5μM CUR (zásobní roztok v DMSO o koncentraci 1 mM)

a jednu z následujících kombinací: 1mM Asc + 0,1mM ZnCl₂ /MgCl₂; 50μM Asc + 5μM ZnCl₂ /MgCl₂ (10x koncentrovanější zásobní roztoky v deionizované vodě)

V tripletech byly připraveny preinkubační směsi obsahující všechny složky kromě NADPH. Celkový obsah organických rozpouštědel v reakčních směsích nepřesahoval 1 %. Připravené preinkubační směsi byly vloženy do termobloku (Thermomixer compact) a nechány inkubovat po dobu 5 minut při 37 °C a 400 RPM. Reakce byla zahájena přidáním 50 μl zásobního roztoku NADPH do každého vzorku ve stejných časových intervalech. Do prvního slepého vzorku bylo místo roztoku NADPH přidáno 50 μl fosfátového pufru. V dalším slepém vzorku byly proteiny ještě před zahájením reakce denaturovány přidavkem „stop-roztoku“ obsahujícího 2M NaCl a 1M Na₂CO₃. Otevřené zkumavky obsahující reakční směs byly vloženy do termobloku, inkubace probíhala po dobu 10 minut při 37 °C za stálého třepání při 300 RPM. Následně byla reakce zastavena přidavkem 100 μl stop-roztoku a každý vzorek byl následně vortexován 10 sekund. Do výsledných směsí bylo přidáno 5 μl roztoku vnitřního standardu obsahujícího 1mM fenacetin v methanolu a 1 ml ethylacetátu pro následnou extrakci. Extrakce byla provedena za intenzivního třepání po dobu 3 min při 1400 RPM (Thermomixer compact), vzorky byly následně centrifugovány po dobu 5 min při 13000g. Po centrifugaci byla horní organická fáze odebrána do skleněných vialek a dosucha odpařena ve vakuové odparce při 37°C. Popsaný postup extrakce byl proveden dvakrát, odebrané organické fáze byly spojeny do jedné vialky.

Při sledování vlivu směsí na enzymovou aktivitu byla také provedena předběžná inkubace samotného CUR a směsi všech složek potravinových doplňků (CUR, Asc, ZnCl₂) ve fosfátovém pufru. Příslušné složky byly přidány do zkumavky, roztok byl doplněn pufrům do 250 μl a nechán inkubovat v termobloku po dobu 30 minut při 37 °C a 400 RPM. Následně byly přidány ostatní složky reakční směsi a vzorky byly připraveny výše popsáním způsobem.

3.3.3.2 Separace 6β-hydroxytestosteronu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Výše popsanou markerovou reakcí vzniká produkt 6β-hydroxytestosteron, který byl stanoven pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Odparek získaný extrakcí byl rozpuštěn v 40 μl methanolu. Separace produktu reakce a vnitřního standardu byla provedena při 35°C a průtoku 0,6 ml/min na koloně Nucleosil 250×4 mm, C₁₈, 100–5, HD. Nástřik na kolonu činil 20 μl. Analýza probíhala po dobu 35 minut s gradientovou elucí. Mobilní fáze obsahovala 50% a 75% methanol v různých poměrech podle koncentračního gradientu, který je uveden v následující tabulce 3.1:

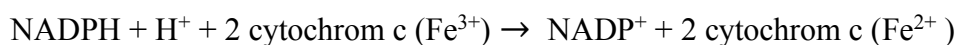
Tabulka 3.1. Koncentrační gradient složek mobilní fáze při separaci 6β-hydroxytestosteronu. Mobilní fáze A – 50% methanol, B – 75% methanol.

Čas, [min]	Mobilní fáze A, [%]	Mobilní fáze B, [%]
00:00	100	0
27:00	0	100
30:00	100	0
35:00	100	0

Metabolit byl detekován při 254 nm v čase 12 min odpovídajícímu elučnímu času standardu 6β-hydroxytestosteronu. Při stejné vlnové délce byl také detekován vnitřní standard fenacetin v elučním čase 9 minut. Produkt byl kvantifikován vztažením jeho plochy píku k ploše píku vnitřního standardu; takto vypočtená relativní plocha píku byla úměrná rychlosti sledované reakce. Hodnoty relativních ploch píků 6β-hydroxytestosteronu pro vzorky s přidanou složkou potravinových suplementu (resp. s přidanou směsí) byly porovnány s relativní plochou píku kontrolního vzorku bez přidaných látek představující 100 % aktivity.

3.3.4 Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy

Aktivita NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy (POR) byla stanovena pomocí markerové reakce redukce cytochromu c, který je známým přirozeným akceptorem elektronu [154]. Tato reakce je vyjádřena následující rovnicí:



Redukovaný cytochrom c absorbuje záření o vlnové délce 550 nm, což je využito pro kontinuální sledování aktivity POR. Do skleněné kyvety o optické dráze 1 cm byla přidána reakční směs o celkovém objemu 1 ml o následujícím složení:

- 300mM fosfátový pufr ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,7)
- Cytochrom c o koncentraci 0,5 mg/ml (zásobní roztok 10 mg/ml v 10mM fosfátovém pufru, pH 7,7)
- Potkání jaterní mikrosomy o koncentraci 0,15 mg/ml
- Kurkumin v koncentračním rozmezí 0,1-20 μM (200x koncentrovanější zásobní roztoky v DMSO) / DMSO pro kontrolní vzorek
- 0,1 mM NADPH (10 mM zásobní roztok ve vodě)

Nejprve byly přidány a zamíchány všechny složky kromě NADPH pro změření „blanku“. Objem organických rozpouštědel v reakční směsi nepřesahoval 1 % celkového objemu.

Po zahájení reakce přidáním 10 μl roztoku NADPH byl obsah kvivety důkladně promíchán a pomocí spektrofotometru DeNovix DS-11+ byl po dobu 2 minut sledován nárůst absorbance při 550 nm. Ze změřených hodnot změn absorbance byla následně pomocí molárního absorpčního koeficientu cytochromu c ($21,01 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{ml}$) vypočtena aktivita POR vyjádřena jako látkové množství vzniklého produktu za minutu vztažené na mg mikrosomálního proteinů. Aktivita vzorku s přidáním kurkuminem byla vztažená na hodnotu aktivity kontrolního vzorku s DMSO, která představovala 100%.

3.3.5 Měření absorpčních spekter kurkuminu

Pro stanovení teplotní stability CUR byla změřena jeho absorpční spektra před a po 30-minutové inkubaci při 37 °C. Byly připraveny dva roztoky o celkovém objemu 2 ml obsahující 0,1M fosfátový pufr o pH 7,4, methanol (0,5% v/v) a kurkumin o koncentraci 5 nebo 50 μM (200x koncentrovanější zásobní roztok v DMSO). Organická fáze představovala přesně 1% celkového objemu směsi. Z čerstvě připravených roztoků byl odebrán 1 ml a změřeno absorpční spektrum (Agilent Cary 60 UV-Vis) neinkubovaného kurkuminu. Zbytek byl nechán inkubovat 30 min na termobloku při 37 °C, poté byla změřena spektra roztoku s kurkuminem po inkubaci. Slepý vzorek obsahoval místo kurkuminu rozpouštědlo DMSO.

4 Výsledky

Pro sledování vlivu vybraných biologicky aktivních látek na katalytickou schopnost CYP1A1 *in vitro* byly jako první model zvoleny jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I, induktorem této isoformy [151]. Nejprve byly tyto mikrosomy izolovány a v nich stanovena koncentrace proteinů – 15 mg/ml. Dalším modelem pro sledování aktivity lidské isoformy byly SupersomyTM představující hmyzí mikrosomy obsahující rekombinantní lidský CYP1A1. Aktivita potkaního a lidského CYP1A1 byla kontinuálně měřena prostřednictvím markerové reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu s fluorimetrickým stanovením produktu. Pro sledování aktivity CYP3A4 byl zvolen model BaktosomůTM, což jsou membrány izolované z *E.coli* exprimující rekombinantní CYP3A4. Pomocí markerové reakce 6 β -hydroxylace testosteronu byl stanoven vliv složek potravinových doplňků na aktivitu CYP3A4. Množství vznikajícího produktu bylo v tomto případě kvantifikováno metodou HPLC. Isoforma CYP2C9 nebyla z časových důvodu prozkoumána.

Nejprve byl stanoven vliv samotných biologicky aktivních látek (kurkuminu, askorbátu, nebo iontů kovů Zn²⁺ či Mg²⁺), následně bylo sledováno jejich společné působení na každou z uvedených isoform CYP.

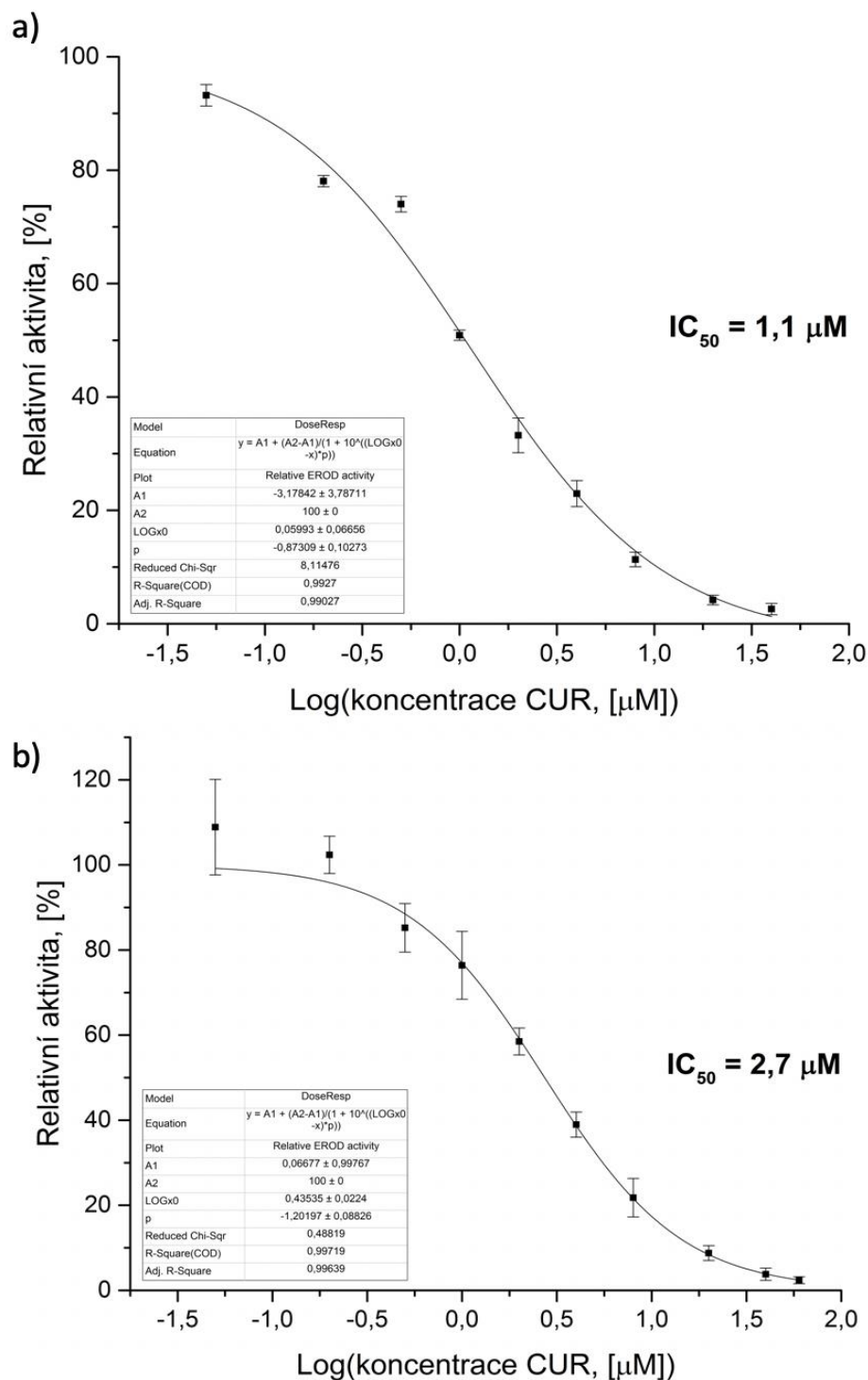
4.1 Vliv kurkuminu

Pomocí tří markerových reakcí byl *in vitro* stanoven vliv kurkuminu na aktivitu CYP1A1, CYP3A4 a POR, která je jejich známým redoxním partnerem. Získané hodnoty reakčních rychlostí pro vzorky obsahující kurkumin byly vždy vztaheny k reakční rychlosti neinhibovaného vzorku, do kterého místo CUR bylo přidáno jeho rozpouštědlo DMSO. Změřená reakční rychlost byla tak převedena na hodnoty relativní aktivity.

4.1.1 Sledování aktivity lidské a potkaní isoformy cytochromu P450 1A1

Pomocí markerové reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu byla stanovena aktivita lidské a potkaní isoformy CYP1A1. Pro sledování inhibičního vlivu kurkuminu byly použity koncentrace 0,05; 0,2; 0,5; 1; 2; 4; 8; 20; 40; 60 μ M. Pomocí logaritmického výnosu byly stanoveny hodnoty IC₅₀ pro kurkumin vůči potkaní a lidské isoformě CYP1A1, která činila 1,1 μ M, resp. 2,7 μ M (Obr. 4.1 na str. 47). Nejnižší přidaná koncentrace kurkuminu způsobila snížení aktivity CYP1A1 v potkaních jaterních mikrosomech na 93 %, 40 μ M CUR způsobil skoro úplnou inhibici. Při sledování aktivity lidské isoformy cytochromu P450 1A1 byl použit rekombinantní enzym

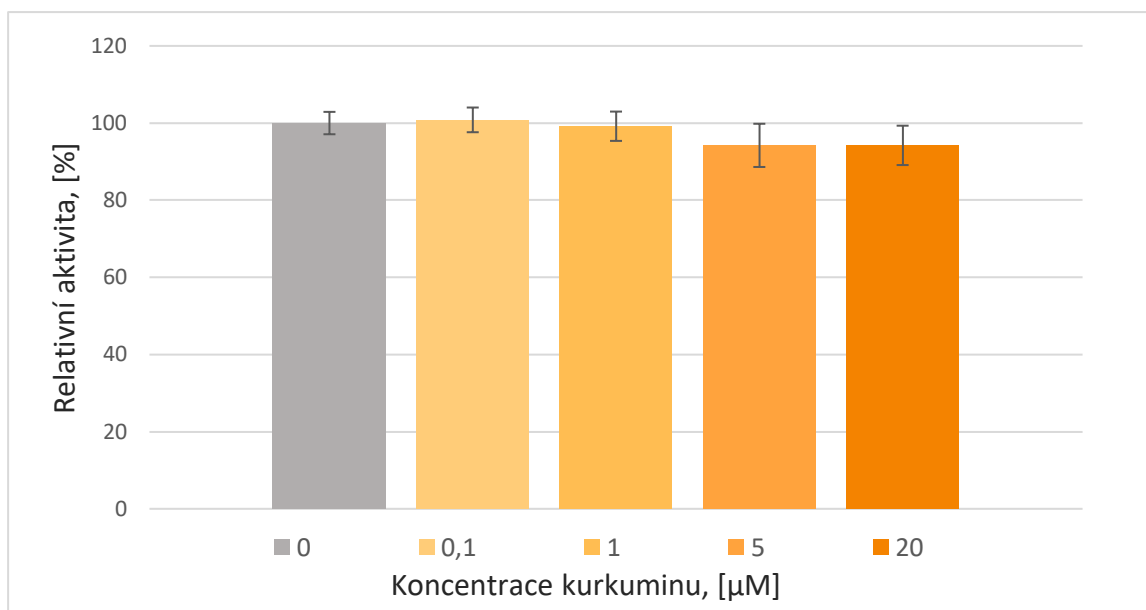
exprimovaný v Supersomech™. 1 μM koncentrace CUR představující IC₅₀ pro potkaní CYP1A1 vyvolala potlačení aktivity na 76 %.



Obrázek 4.1: Logaritmický výnos závislosti aktivity (a) potkaní a (b) lidské isoformy CYP1A1 na koncentraci přidaného kurkuminu (CUR). Aktivita byla stanovena pomocí markerové reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu. Koncentrace 7-ethoxyresorufinu v reakční směsi činila 2 μM. Koncentrace mikrosomálních proteinů byla ^a0,05 mg/ml, resp. koncentrace CYP1A1 ^b7,5 pmol/ml. Procenta reprezentují aktivitu enzymu v přítomnosti CUR vztahovanou na aktivitu neinhibovaného vzorku (100%). Zobrazené hodnoty představují průměry a směrodatné odchylky ze tří měření. Graf byl sestaven pomocí programu Origin 2016 (OriginLab, USA) s proložení dat sigmoidní funkcí.

4.1.2 Sledování aktivity NADPH:cytochromP450-oxidoreduktasy

Následně byla ověřena specifita pozorované inhibice. Snížení reakční rychlosti v přítomnosti CUR mohlo být způsobeno přímou inhibicí CYP, nebo jejich obligátního redoxního partnera NADPH:cytochrom-P450-oxidoreduktasy (POR). Pomocí markerové reakce redukce cytochromu c byl stanoven vliv kurkuminu na aktivitu POR v potkaních jaterních mikrosomech. Z grafu na obrázku 4.2 je patrné, že kurkumin při použitých koncentracích nevykazuje inhibiční účinek na POR.

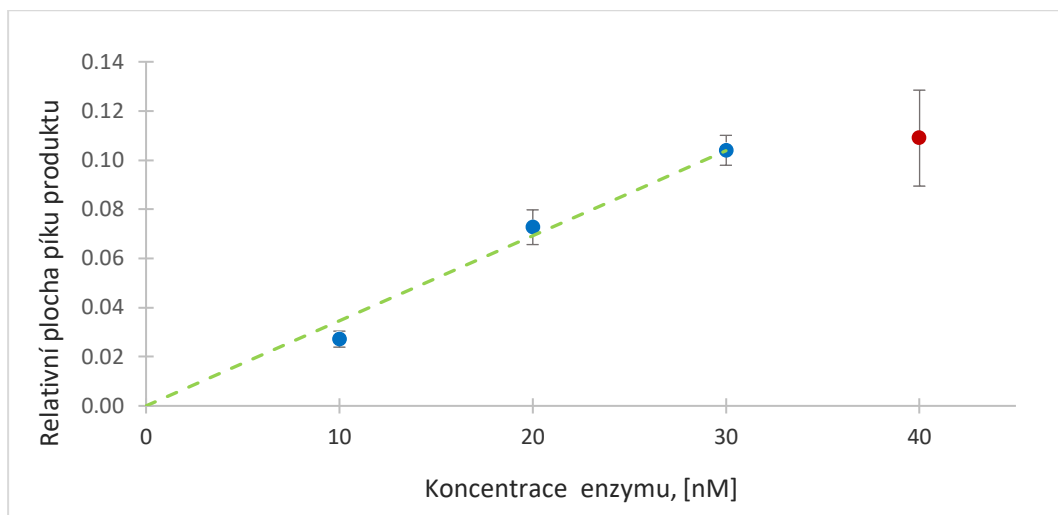


Obrázek 4.2: Vliv kurkuminu na aktivitu NADPH:cytochrom-P450-oxidoreduktasy v potkaních jaterních mikrosomech sledovaný pomocí markerové reakce redukce cytochromu c. Koncentrace cytochromu c v reakční směsi činila 0,5 mg/ml. Koncentrace mikrosomálních proteinů byla 0,15 mg/ml. Procenta představují aktivitu enzymu v přítomnosti CUR vztaženou na aktivitu vzorku s přidaným DMSO (100%). Data představují průměry a relativní chyby ze tří měření.

4.1.3 Sledování aktivity cytochromu P450 3A4

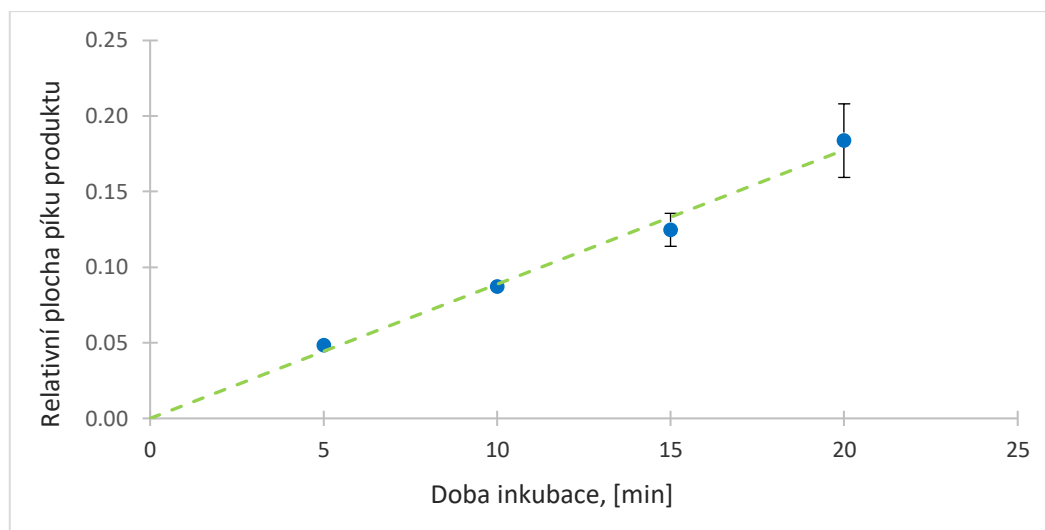
V rámci této diplomové práce byly určeny optimální podmínky měření 6 β -hydroxylace testosteronu pro následné stanovení vlivu biologicky aktivních látek na aktivitu CYP3A4 exprimované v BaktosomechTM.

Nejprve bylo určeno vhodné množství enzymu v reakční směsi. Byl pozorován lineární nárůst relativní plochy píku produktu až do 30nM koncentrace CYP3A4 (Obr. 4.3 na str. 49). Pro následující měření byla tedy zvolena 30nM koncentrace CYP.



Obrázek 4.3: Závislost relativní plochy píku 6 β -hydroxytestosteronu na koncentraci CYP3A4 v reakční směsi s použitím NADPH-generujícího systému. Lineární závislost je proložena prvními třemi body. Inkubace trvala 15 minut. Koncentrace testosteronu v reakční směsi činila 20 μ M. Data představují průměry a směrodatné odchylky ze tří měření.

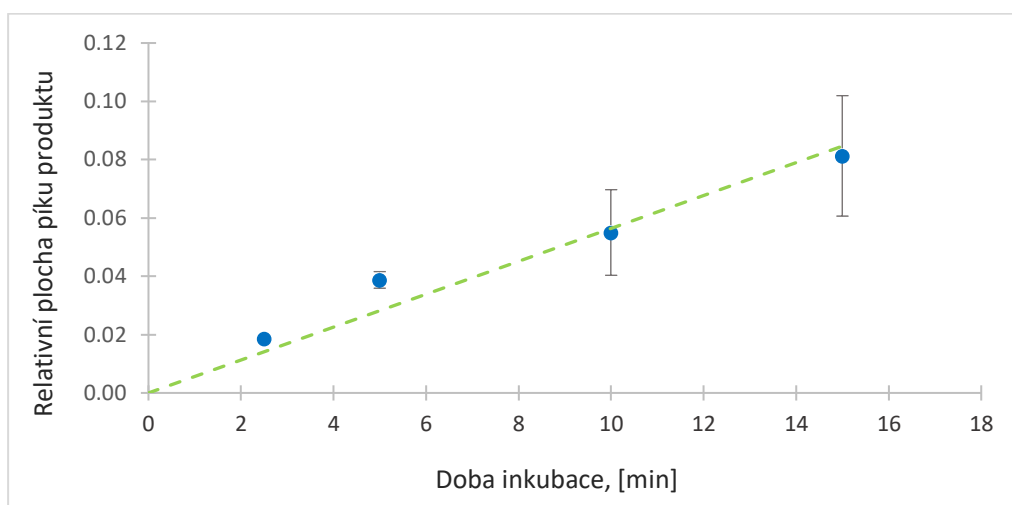
Byla také stanovena optimální doba trvání enzymové reakce; byla vyzkoušena 5, 10, 15, 20-minutová inkubace. Z grafu na obrázku 4.4 je patrné, že lineární závislost množství vznikajícího produktu na době inkubace platila až do 20 minut.



Obrázek 4.4: Závislost relativní plochy píku 6 β -hydroxytestosteronu na době inkubace s použitím NADPH-generujícího systému. Lineární závislost je proložena všemi body. Koncentrace testosteronu v reakční směsi činila 20 μ M, koncentrace enzymu byla 30 nM. Data představují průměry a směrodatné odchylky ze tří měření.

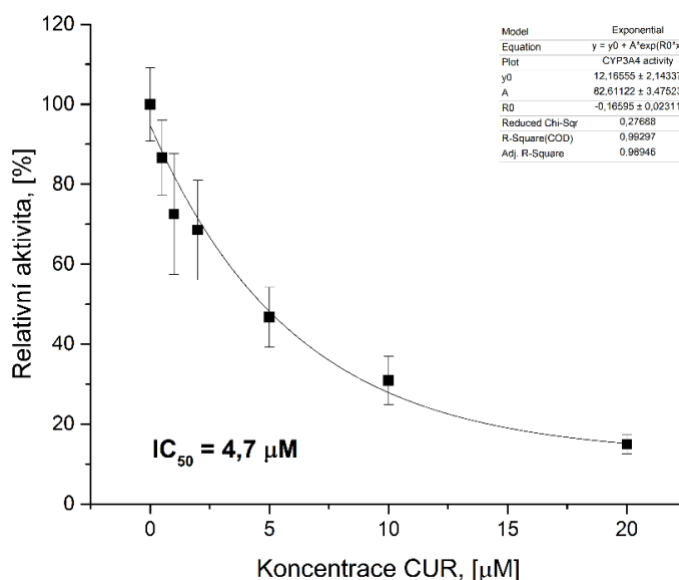
Optimalizace byla provedena s použitím NADPH-generujícího systému (GS) obsahujícího hořčičnaté ionty, které mohly interferovat se sledováním vlivu ostatních složek potravinových doplňků. Pro eliminaci interferujícího příspěvku GS byl v následujících experimentech použit roztok čistého NADPH. Byla ověřena lineární závislost plochy píku vznikajícího produktu na čase (Obr. 4.5 na str. 50). Pro následující měření rychlosti 6 β -hydroxylace testosteronu byla zvolena

10-minutová doba inkubace, při které bylo množství vznikajícího produktu dobře kvantifikovatelné a zároveň nebyla doba inkubace nevhodně dlouhá z důvodu degradace CUR.



Obrázek 4.5: Závislost relativní plochy píku 6β-hydroxytestosteronu na době inkubace s použitím roztoku NADPH. Lineární závislost je proložena všemi body. Koncentrace testosteronu v reakční směsi činila 20 μM, koncentrace enzymu byla 30 nM. Chybové úsečky představují variační rozpětí ze dvou měření.

Optimalizované podmínky markerové reakce 6β-hydroxylace testosteronu byly využity pro sledování vlivu kurkuminu a dalších biologicky aktivních látek na aktivitu rekombinantního CYP3A4 exprimovaného v Baktosomech™. Byly použity koncentrace 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 μM CUR. Byla stanovena hodnota IC₅₀, která činila 4,7 μM (Obr. 4.6). Nejnižší přidaná koncentrace kurkuminu vyvolala pokles aktivity o 13 %.



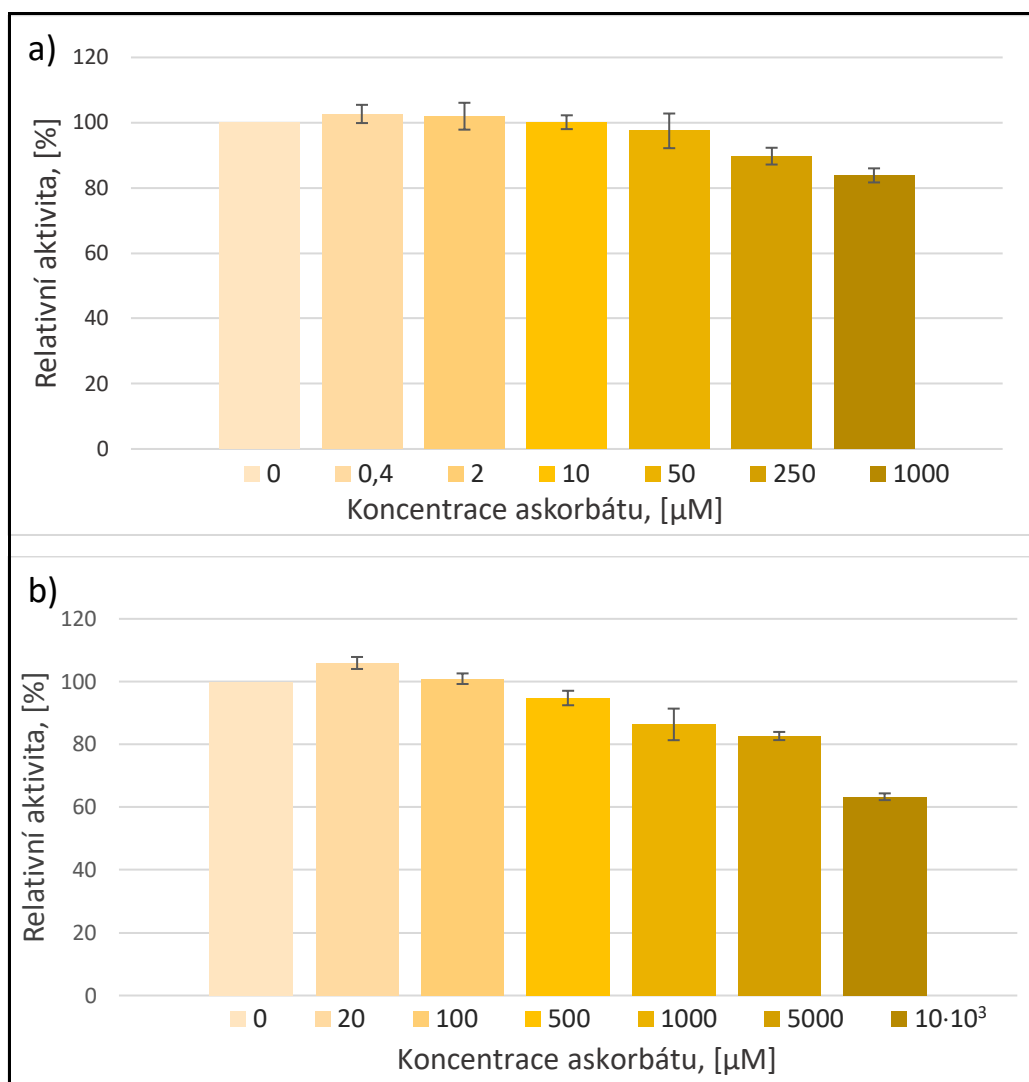
Obrázek 4.6: Závislosti aktivity CYP3A4 na koncentraci přidaného kurkuminu. Aktivita byla stanovena pomocí markerové reakce 6β-hydroxylace testosteronu. Koncentrace testosteronu v reakční směsi činila 20 μM. Koncentrace enzymu činila 30 pmol/ml. Procenta představují aktivitu enzymu v přítomnosti CUR vztaženou na aktivitu neinhibovaného vzorku (100%). Data představují průměry a relativní chyby ze tří měření. Graf byl sestaven pomocí programu Origin 2016 (OriginLab, USA) s proložením dat exponenciální funkcí.

4.2 Vliv askorbátu

Dále byl sledován vliv samotného askorbátu, další ze studovaných biologicky aktivních látek.

4.2.1 Sledování aktivity lidské a potkaní isoformy cytochromu P450 1A1

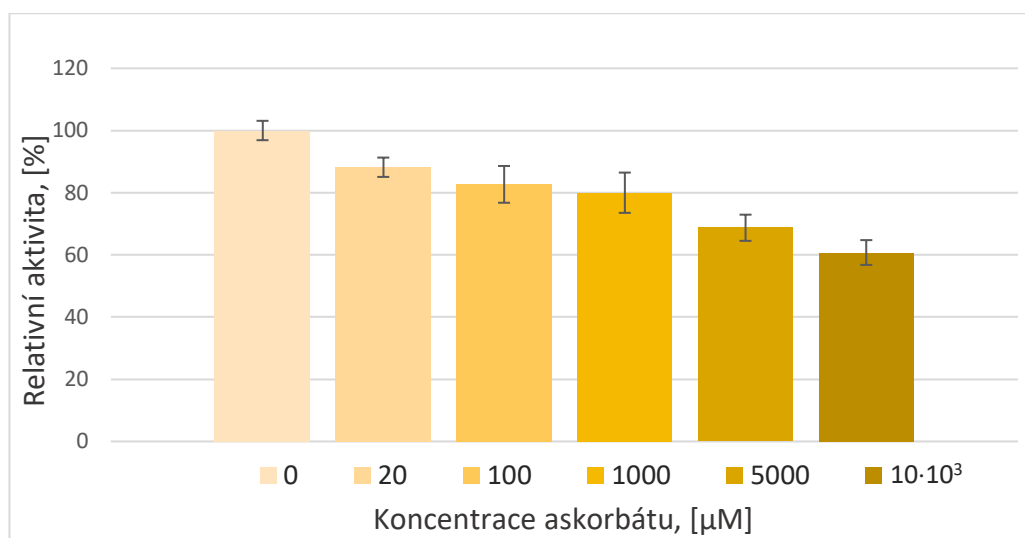
Byl stanoven vliv askorbátu na *O*-deethylasovou aktivitu potkaní a lidské isoformy CYP1A1. Pro potkaní CYP1A1 byly použity koncentrace 0,4; 2; 10; 50; 250; 1000 μ M Asc (Obr. 4.7a na str. 50). Inhibiční vliv askorbátu na sledovanou reakci se projevil až při vyšších koncentracích, 250 μ M Asc způsobil potlačení aktivity o 10%. Podobně byl sledován vliv vitamínu C na aktivitu rekombinantní lidské isoformy CYP1A1 exprimované v SupersomechTM. Jelikož nízké koncentrace Asc neměly na potkaní CYP1A1 v mikrosomech žádný vliv, byly u lidské isoformy použity vyšší koncentrace v rozsahu 20 μ M–10 mM (Obr. 4,7b na str. 52). Inhibiční vliv byl pozorován až při vyšších koncentracích askorbátu než v případě mikrosomů, 1mM Asc potlačil *O*-deethylasovou aktivitu o 14 %, 10 mM o 37 %.



Obrázek 4.7: Vliv askorbátu na aktivitu (a) potkaní a (b) lidské isoformy CYP1A1 sledovaný pomocí markerové reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu. Koncentrace 7-ethoxyresorufinu v reakční směsi činila 2 µM. Koncentrace mikrosomálních proteinů byla ^a0,05 mg/ml, resp. koncentrace CYP1A1 ^b7,5 pmol/ml. Procenta představují aktivitu enzymu v přítomnosti Asc vztaženou na aktivitu vzorku s přidanou vodou (100%). Data představují průměry a směrodatné odchylky ze tří měření.

4.2.2 Sledování aktivity cytochromu P450 3A4

Byl také sledován vliv askorbátu na aktivitu rekombinantní isoformy CYP3A4 exprimované v BaktosomechTM. Z grafu na obrázku 4.8 (str. 51) je patrné, že vyšší koncentrace vit. C způsobují významnou inhibici CYP3A4, 1mM koncentrace Asc vyvolala snížení aktivity o 20 %.



Obrázek 4.8: Vliv askorbátu na aktivitu lidského CYP3A4 v Baktosomech™ sledovaný pomocí markerové reakce 6β-hydroxylace testosteronu. Koncentrace testosteronu v reakční směsi činila 20 µM. Koncentrace enzymu byla 30 pmol/ml. Procenta představují aktivitu enzymu v přítomnosti Asc vztaženou na aktivitu vzorku s přidanou vodou (100%). Data představují průměry a relativní chyby ze tří měření.

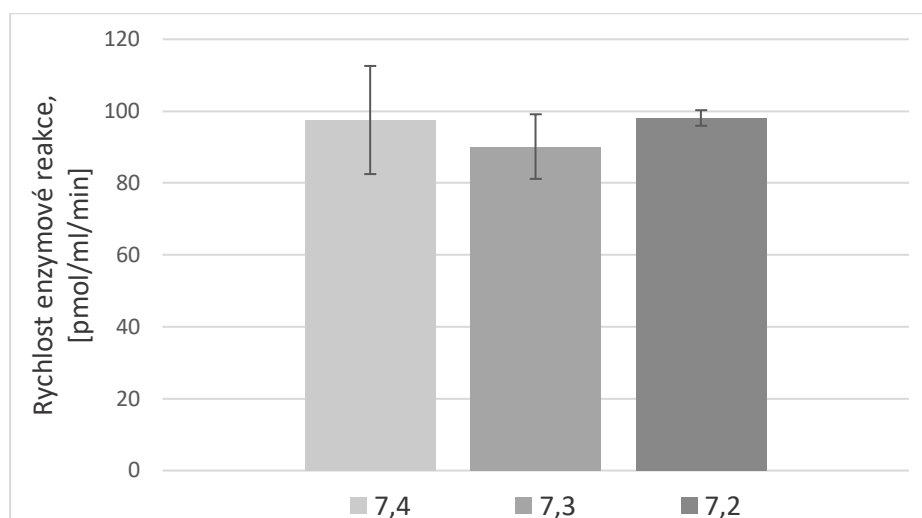
4.2.3 Stanovení vlivu pH na aktivitu cytochromů P450 1A1 a 3A4

Askorbát je kyselinou schopnou snižovat hodnotu pH. Bylo proto ověřeno, jestli snížení reakční rychlosti ve vzorcích s Asc není způsobeno změnou pH, které významně ovlivňuje kinetiku enzymových reakcí. Nejprve byl změřen vliv přidaného askorbátu na pH fosfátového pufru použitého v reakčních směsích. Změna pH byla pozorována od větších koncentrací Asc, 5mM koncentrace vyvolala snížení pH na 7,3, zatímco pufr s přidaným 10mM askorbátem měl pH 7,2 (Tab. 4.1).

Tabulka 4.1: Vliv přidaného askorbátu na pH 0,1M fosfátového pufru (pH = 7,4) v reakční směsi. Asc – askorbát.

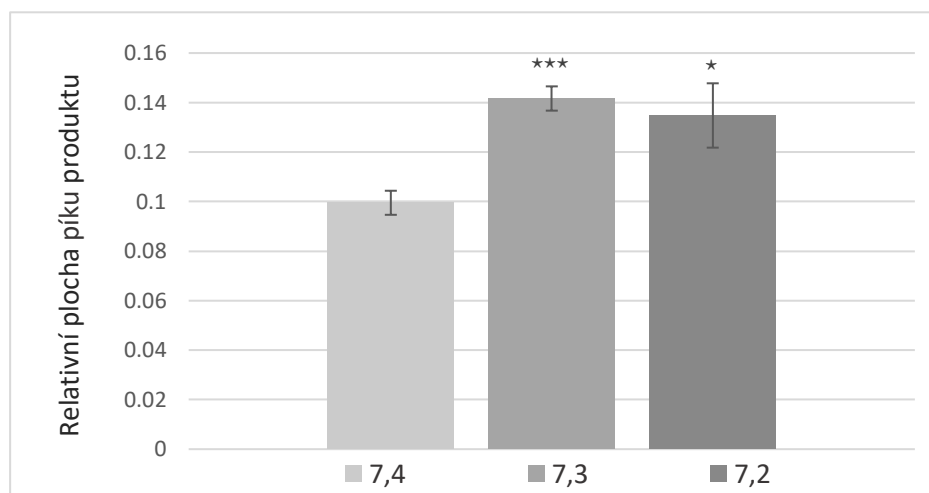
c (Asc), [µM]	pH
0,5·10 ³	7,4
1·10 ³	7,4
5·10 ³	7,3
10·10 ³	7,2

Dále byl stanoven vliv změny pH odpovídající přídatku askorbátu na aktivitu CYP1A1 v potkaních jaterních mikrosomech a CYP3A4 v Baktosomech™. Pokles pH nezpůsobil významnou změnu aktivity CYP1A1 (Obr. 4.9 na str. 54).



Obrázek 4.9: Vliv pH na rychlost markerové reakce CYP1A1 *O*-deethylaci 7-ethoxyresorufinu v potkaních jaterních mikrosomech. Koncentrace 7-ethoxyresorufinu v reakční směsi činila 2 μ M. Koncentrace mikrosomálních proteinů byla 0,05 mg/ml. Data představují průměry a směrodatné odchylky z minimálně tří měření.

Naopak u CYP3A4 vedlo snížení pH k zvýšení reakční rychlosti. Při pH 7,2, odpovídající 10mM koncentraci přidaného Asc, došlo ke zvýšení aktivity o 35% oproti pH 7,4 (Obr.4.10).



Obrázek 4.10: Vliv pH na aktivitu CYP3A4 v Baktosomech™ sledovaný pomocí markerové reakce 6 β -hydroxylace testosteronu. Koncentrace testosteronu v reakční směsi činila 20 μ M. Koncentrace enzymu byla 30 pmol/ml. Inkubace trvala 10 min. Data představují průměry a směrodatné odchylky ze tří měření. Statistická významnost byla vyhodnocena pomocí T-testu: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ při porovnání se vzorkem s pH 7,4.

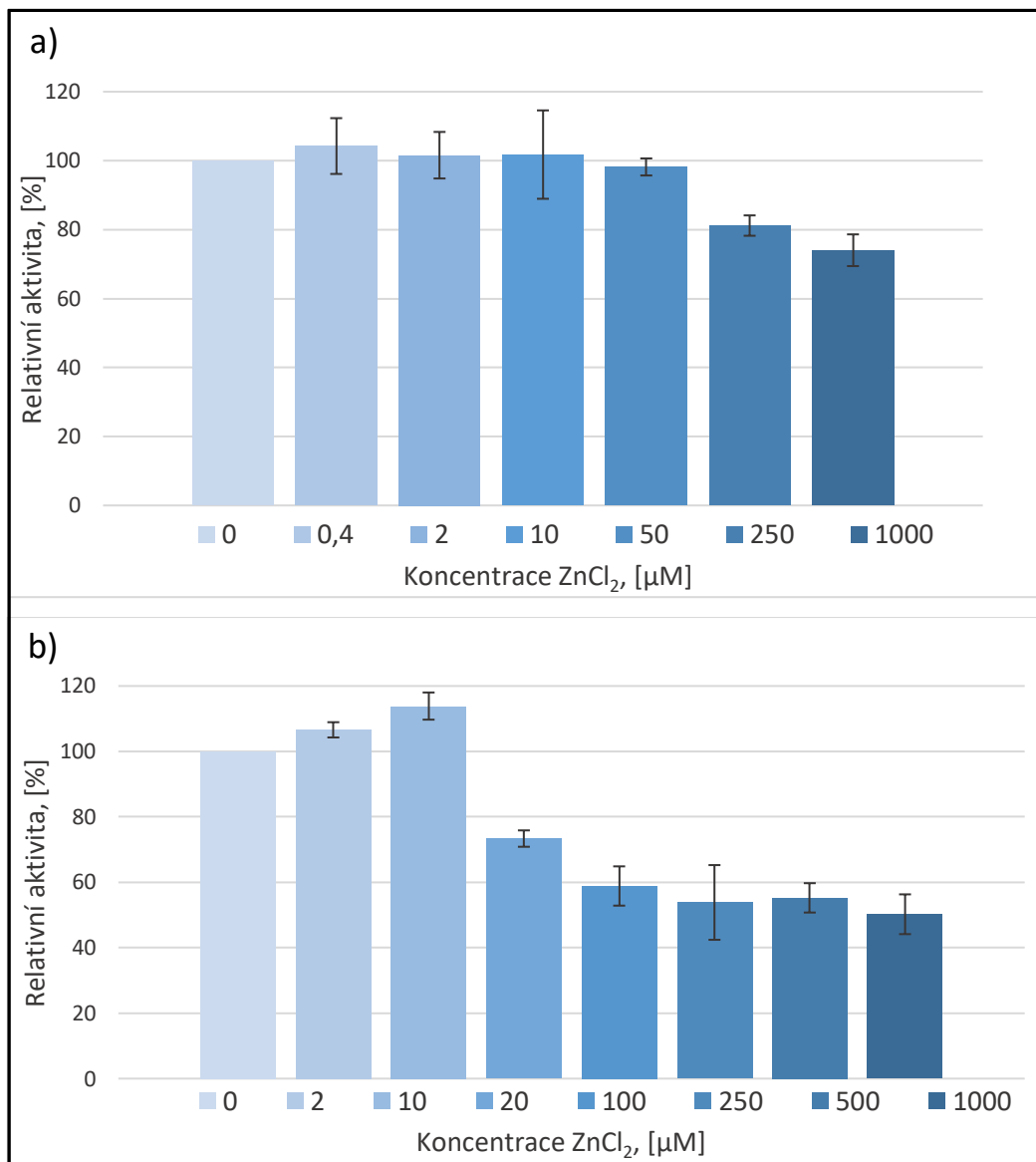
4.3 Vliv kovových iontů

V rámci předkládané diplomové práce byl stanoven vliv hořečnatých (Mg^{2+}) a zinečnatých (Zn^{2+}) iontů na aktivitu lidských rekombinantních CYP1A1 a CYP3A4 a potkaního CYP1A1 v jaterních mikrosomech.

4.3.1 Sledování aktivity lidské a potkaní isoformy cytochromu P450 1A1

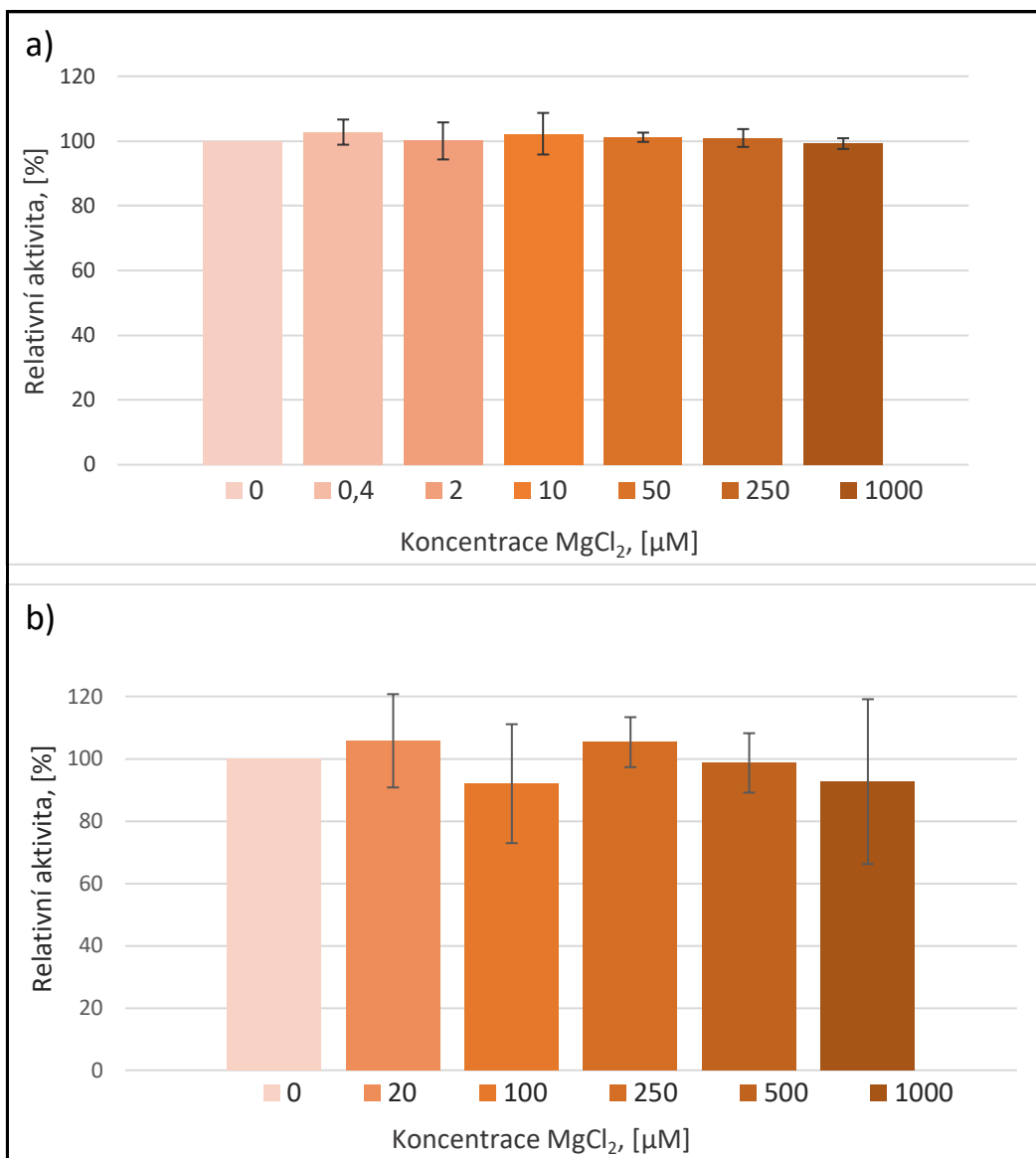
Ukázalo se, že zinečnaté ionty mají inhibiční vliv jak na potkaní, tak na lidskou isoformu CYP1A1 (Obr. 4.11).

Inhibice potkaního CYP1A1 byla pozorována po přidání 250 μM ZnCl_2 , které vyvolalo potlačení aktivity na 81 % (Obr. 4.11a na str. 55). Výraznější inhibice byla pozorována u lidské isoformy, u které již přídavek 20 μM Zn^{2+} vyvolal pokles enzymové aktivity na 73 %. Nejvyšší přidaná koncentrace zinečnatých iontů (1 mM) způsobila snížení aktivity o polovinu (Obr. 4.11b).



Obrázek 4.11: Vliv zinečnatých iontů na aktivitu (a) potkaní a (b) lidské isoformy CYP1A1 sledovaný pomocí markerové reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu. Koncentrace 7-ethoxyresorufinu v reakční směsi činila 2 μM . Koncentrace mikrosomálních proteinů byla $^{a}0,05$ mg/ml, resp. koncentrace CYP1A1 $^{b}7,5$ pmol/ml. Procenta představují aktivitu enzymu v přítomnosti Zn^{2+} vztaženou na aktivitu vzorku s přídáním vodou (100%). Data představují průměry a směrodatné odchylky ze tří měření.

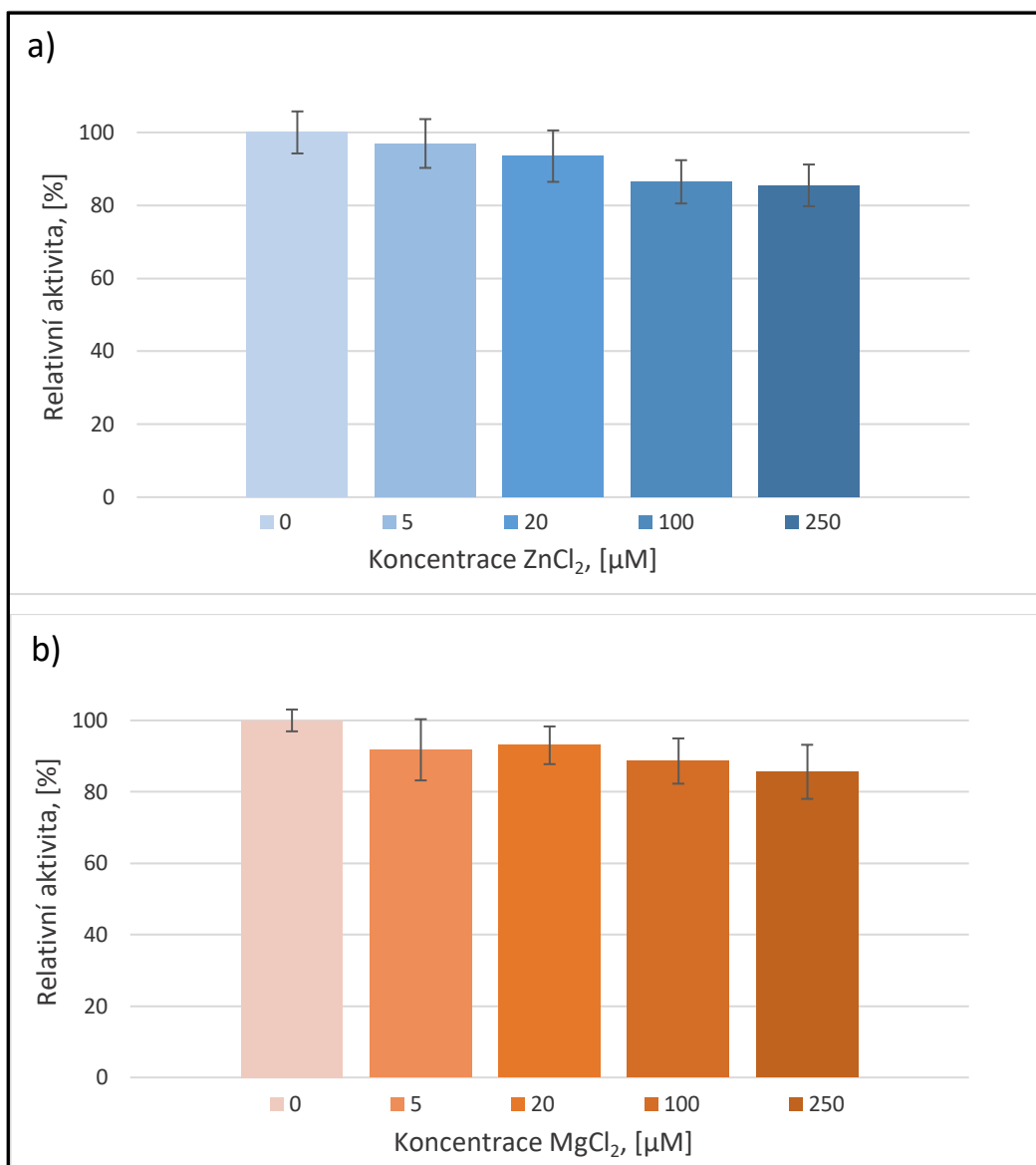
Na rozdíl od zinečnatých iontů, hořečnaté nezpůsobily potlačení enzymové aktivity při žádné z použitých koncentrací (Obr. 4.12).



Obrázek 4.12: Vliv hořečnatých iontů na aktivitu (a) potkaní a (b) lidské isoformy CYP1A1 sledovaný pomocí markerové reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu. Koncentrace 7-ethoxyresorufinu v reakční směsi činila 2 μM. Koncentrace mikrosomálních proteinů byla ^a0,05 mg/ml, resp. koncentrace CYP1A1 ^b7,5 pmol/ml. Procenta představují aktivitu enzymu v přítomnosti Mg²⁺ vztaženou na aktivitu vzorku s přidanou vodou (100%). Data představují průměry a směrodatné odchylky ze tří měření.

4.3.2 Sledování aktivity cytochromu P450 3A4

Pro stanovení vlivu kovových iontů na aktivitu CYP3A4 byly použity 5; 20; 100; 250 μM Mg^{2+} a Zn^{2+} (Obr. 4.13). Oba ionty měly podobný inhibiční vliv s mírným snižováním enzymové aktivity, 100 μM Zn^{2+} a Mg^{2+} potlačily aktivitu na 87, resp. 89 %.



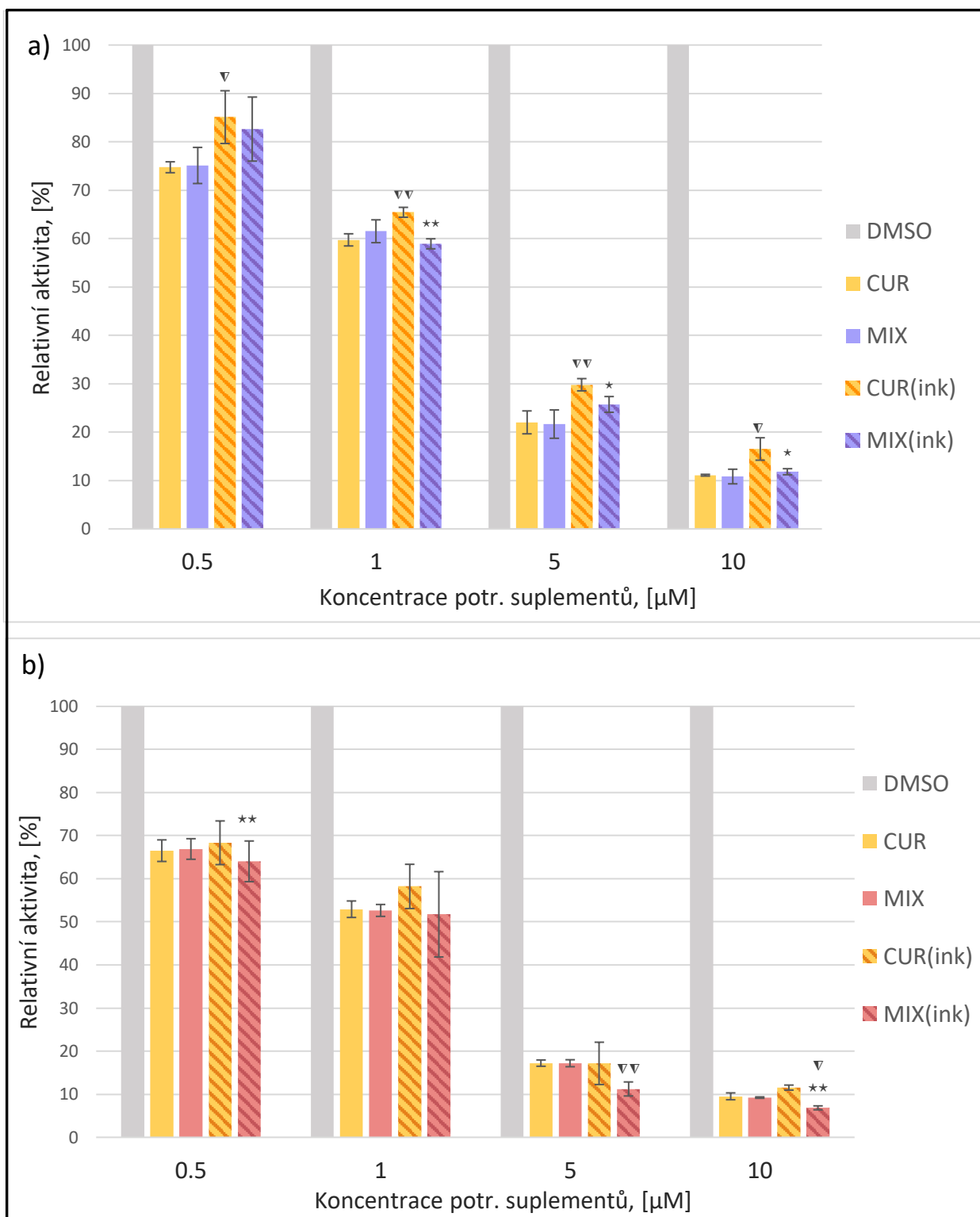
Obrázek 4.13: Vliv (a) zinečnatých a (b) hořečnatých iontů na aktivitu lidského CYP3A4 v BaktosomechTM sledovaný pomocí markerové reakce 6 β -hydroxylace testosteronu. Koncentrace testosteronu v reakční směsi činila 20 μM . Koncentrace enzymu byla 30 pmol/ml. Procenta představují aktivitu enzymu v přítomnosti Zn^{2+} , resp. Mg^{2+} vztaženou na aktivitu vzorku s přidanou vodou (100%). Data představují průměry a relativní chyby ze tří měření.

4.4 Vliv směsi potravinových doplňků

Pro stanovení případného vzájemného ovlivnění uvedených složek potravinových doplňků byl také sledován vliv jejich směsí na aktivitu CYP1A1 a CYP3A4 *in vitro*.

4.4.1 Sledování aktivity lidské a potkaní isoformy cytochromu P450 1A1

Při sledování *O*-deethylasové aktivity CYP1A1 v potkaních jaterních mikrosomech bylo použito několik ekvimolárních směsí obsahujících kurkumin, askorbát a zinečnaté, nebo hořečnaté ionty. Byly použity koncentrace 0,5; 1; 5; 10 μM (Obr.4.14 na str. 59). Paralelně byl vždy sledován vliv samotného CUR o odpovídající koncentraci. Pro imitaci fyziologických podmínek byla také před přidáním do reakční směsi provedena 30-minutová inkubace směsi potravinových doplňků ve fosfátovém pufru (pH 7,4) při 37°C. Z grafu na obrázku 4.13 je patrné, že preinkubace kurkuminu ve fosfátovém pufru o pH 7,4 při 37°C vedla ke snížení jeho inhibičního účinku na *O*-deethylasovou aktivitu; např. 5 μM CUR způsobil potlačení aktivity na 22 %, zatímco inkubovaný kurkumin o stejné koncentraci na 30 % původní aktivity (Obr. 4.14a na str. 59).



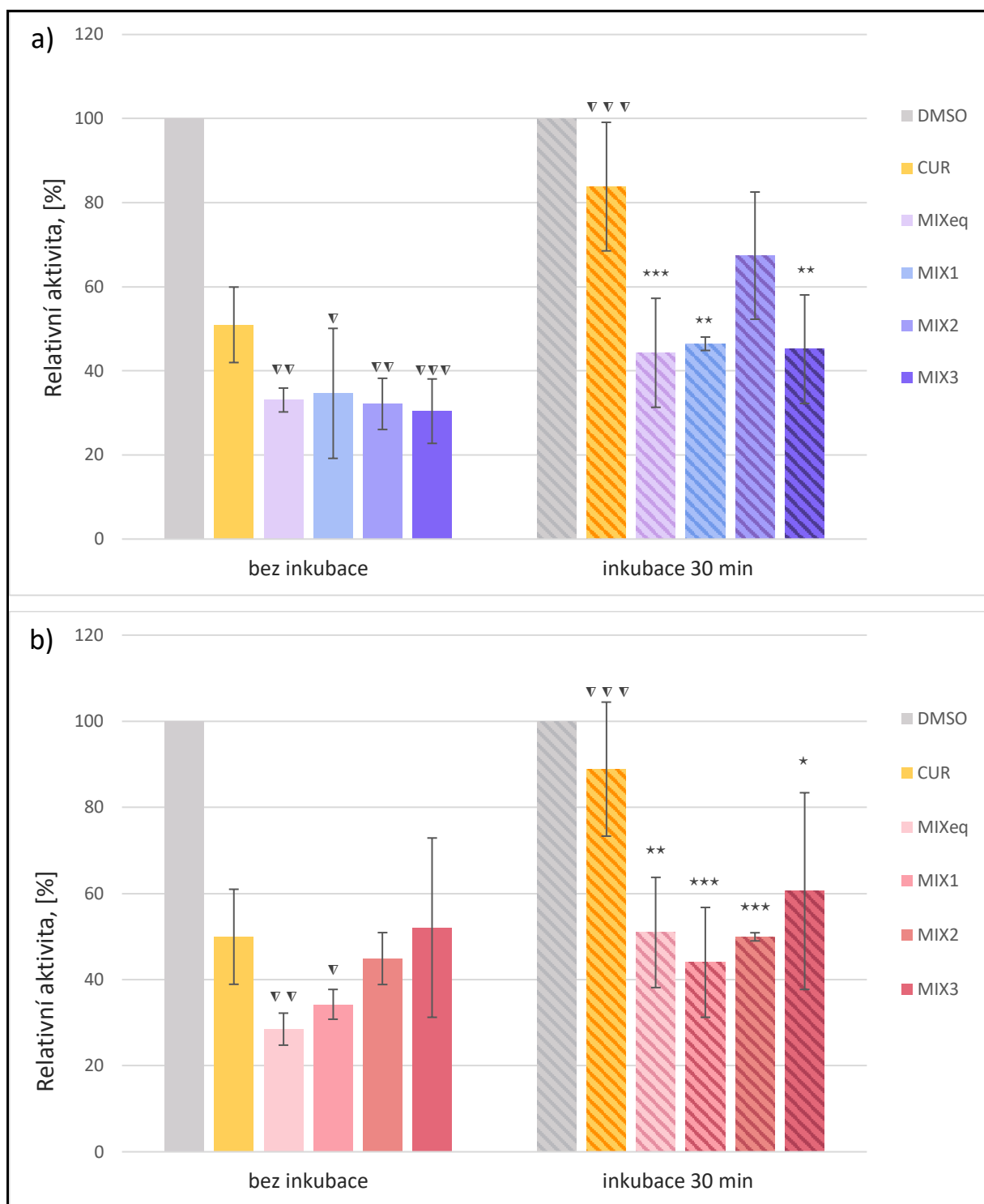
Obrázek 4.14: Vliv kurkuminu (CUR) a jeho ekvimolárních směsí (MIX) s askorbátem a (a) zinečnatými, resp. (b) hořečnatými ionty na aktivitu CYP1A1 v potkaních jaterních mikrosomech sledovaný pomocí markerové reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu. Šrafované sloupce reprezentují vliv kurkuminu nebo jeho odpovídajících směsí po 30-minutové inkubaci při 37 °C (ink). Koncentrace 7-ethoxyresorufinu v reakční směsi činila 2 μM. Koncentrace mikrosomálních proteinů v reakční směsi činila 0,05 mg/ml. Procenta představují aktivitu enzymu za uvedených podmínek vztaženou na aktivitu vzorku s přidáním rozpouštědly (100%). Data představují průměry a směrodatné odchylky ze tří měření. Statistická významnost byla vyhodnocena pomocí T-testu: ** $p < 0,01$ při porovnání s odpovídajícím vzorkem s inkubovaným kurkuminem; ∇ $p < 0,05$; ∇∇ $p < 0,01$ při porovnání s odpovídajícím vzorkem s neinkubovaným kurkuminem.

Vliv popsaných směsí potravinových doplňků byl také stanoven na modelu rekombinantní lidské isoformy CYP1A1 exprimované v SupersomechTM. Kromě ekvimolárních mixů byly také použity směsi s různými poměry koncentrací askorbátu a iontů kovů. Koncentrace přidaného kurkuminu vždy činila 1 μ M, což odpovídá hodnotě IC₅₀ stanovené v potkaních jaterních mikrosomech. Kromě CUR směsi obsahovaly askorbát o koncentracích 50 μ M (MIX1); 200 μ M (MIX2); 1000 μ M (MIX3) a ZnCl₂ nebo MgCl₂ o 10-krát menších koncentracích (Obr.4.15 na str. 61). Vliv popsaných směsí byl porovnán s vlivem samotného kurkuminu. Jak u CUR, tak u jeho směsí byla také provedena 30-minutová inkubace v pufru při 37°C.

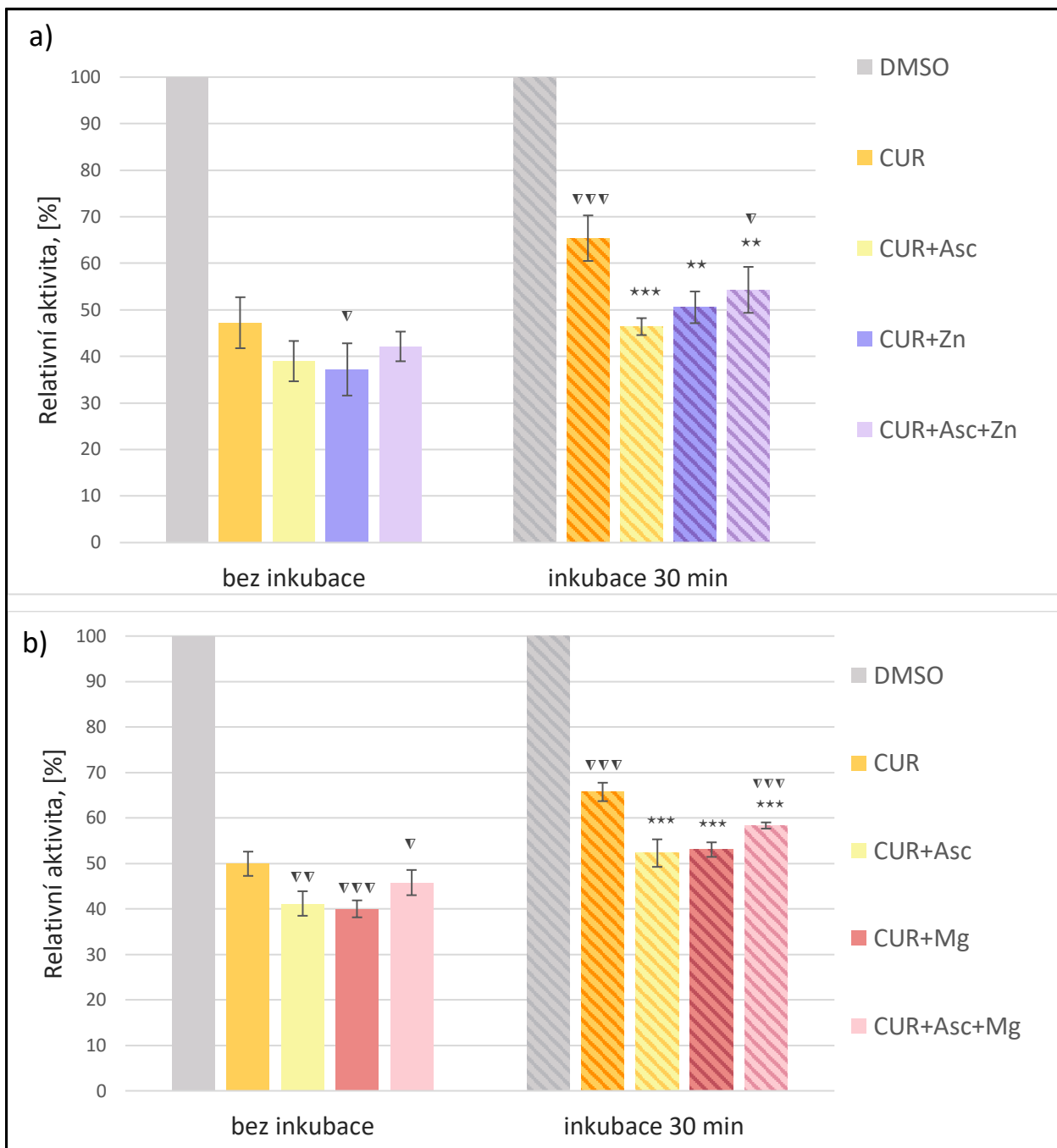
Bylo pozorováno významné potlačení inhibičního účinku kurkuminu po provedení inkubace. 1 μ M CUR způsobil snížení enzymové aktivity na 51 (Obr. 4.15a na str. 61), resp. 50 % (Obr. 4.15b na str. 61), zatímco ve stejné koncentraci po inkubaci měl signifikantně slabší inhibici, 80, resp. 89 % (Obr. 4.15 na str. 59). Vzorky obsahující směs kurkuminu s askorbátem a kovovými ionty vykazovaly podobný stupeň inhibice před a po provedení inkubace. Hodnoty relativní aktivity se u vzorků s přidanými inkubovanými směsmi blíží k hodnotám inhibice samotného kurkuminu bez inkubace. Inkubovaný CUR ve směsi s 50 μ M Asc a 5 μ M ZnCl₂ (Obr. 4.15a na str. 61) potlačil enzymovou aktivitu na 59 %, zatímco neinkubovaný CUR vyvolal snížení aktivity na 51 %. Popsaná tendence byla pozorována u směsí jak s zinečnatými ionty, tak s hořečnatými ionty.

Dalším pozorovaným trendem je celkové zesílení inhibičního účinku CUR ve směsi s ostatními složkami u vzorků bez inkubace. Například vzorek s ekvimolární směsí kurkuminu, askorbátu a ZnCl₂ měl relativní aktivitu 33 %, což je o 18 % nižší než u vzorku, do kterého byl přidán pouze 1 μ M CUR. Stejný ekvimolární mix obsahující místo ZnCl₂ hořečnaté ionty vykazoval o 22 % silnější inhibici než samotný kurkumin (Obr. 4.15b na str. 61).

Pro stanovení, která z komponent popsaných směsí je zodpovědná za udržování inhibičního účinku CUR i po jeho 30-minutové inkubaci při 37°C, byl také sledován vliv jeho směsí s jednou z komponent (s Asc nebo ZnCl₂/MgCl₂). Z důvodu nedostatku SupersomůTM byl celý experiment proveden na modelu potkaních jaterních mikrosomů. V každé použité směsi koncentrace CUR, Asc a iontů kovů činila 1 μ M. S inhibičním účinkem samotného kurkuminu byl porovnán vliv jeho ekvimolární směsi s askorbátem, směsi s ZnCl₂/MgCl₂ nebo směsi obsahující všechny komponenty (Obr. 4.16 na str. 62). Zesílení inhibičního účinku po 30-minutové inkubaci bylo pozorováno u každé z přidaných kombinací.



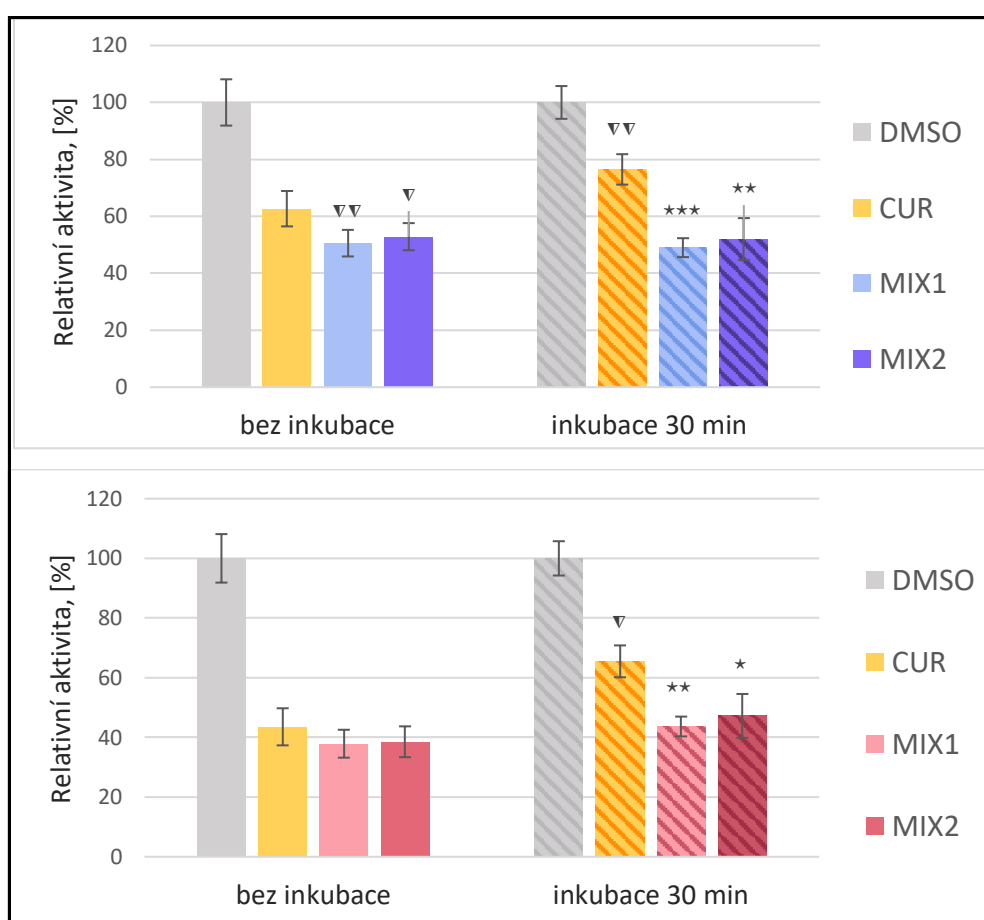
Obrázek 4.15: Vliv kurkuminu (CUR) a jeho směsí (MIX) s askorbátem a (a) zinečnatými, resp. (b) hořečnatými ionty na aktivitu lidského CYP1A1 v Supersomech™ sledovaný pomocí markerové reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu. Šrafované sloupce reprezentují vliv 1 μM kurkuminu nebo jeho odpovídajících směsí po 30-minutové inkubaci při 37 °C. Koncentrace 7-ethoxyresorufinu v reakční směsi činila 2 μM. Koncentrace enzymu byla 7,5 pmol/ml. **MIXeq: 1 μM CUR + 1 μM Asc + 1 μM ^aZnCl₂/^bMgCl₂; **MIX1**: 1 μM CUR + 50 μM Asc + 5 μM ^aZnCl₂/^bMgCl₂; **MIX2**: 1 μM CUR + 200 μM Asc + 20 μM ^aZnCl₂/^bMgCl₂; **MIX3**: 1 μM CUR + 1000 μM Asc + 100 μM ^aZnCl₂/^bMgCl₂. Procenta představují aktivitu enzymu za uvedených podmínek vztaženou na aktivitu vzorku s přidáním rozpouštědly (100%). Data představují průměry a směrodatné odchylky minimálně ze tří měření. Statistická významnost byla vyhodnocena pomocí T-testu: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 při porovnání s odpovídajícím vzorkem s inkubovaným kurkuminem; ▽ p < 0,05; ▽▽ p < 0,01; ▽▽▽ p < 0,001 při porovnání s odpovídajícím vzorkem s neinkubovaným kurkuminem.**



Obrázek 4.16: Vliv kurkuminu (CUR) a jeho směsí (MIX) s askorbátem a/nebo (a) zinečnatými, resp. (b) hořečnatými ionty na aktivitu CYP1A1 v potkaních jaterních mikrosomech sledovaný pomocí markerové reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu. Šrafované sloupce reprezentují vliv kurkuminu nebo jeho odpovídajících směsí po 30-minutové inkubaci při 37 °C. Koncentrace 7-ethoxyresorufinu v reakční směsi činila 2 μM. Koncentrace mikrosomálních proteinů v reakční směsi byla 0,05 mg/ml. Koncentrace každé složky činila 1 μM, do vzorků byl přidán buď samotný CUR, nebo jeho směs s jednou ze složek (CUR+Asc/CUR+ZnCl₂ nebo MgCl₂), nebo jeho ekvimolární směs se všemi složkami. Procenta představují aktivitu enzymu za uvedených podmínek vztáženou na aktivitu vzorku s přidáním rozpouštědla (100%). Data představují průměry a směrodatné odchylky ze tří měření. Statistická významnost byla vyhodnocena pomocí T-testu: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 při porovnání s odpovídajícím vzorkem s inkubovaným kurkuminem; ▼ p < 0,05; ▼▼ p < 0,01; ▼▼▼ p < 0,001 při porovnání s odpovídajícím vzorkem s neinkubovaným kurkuminem.

4.4.2 Sledování aktivity cytochromu P450 3A4

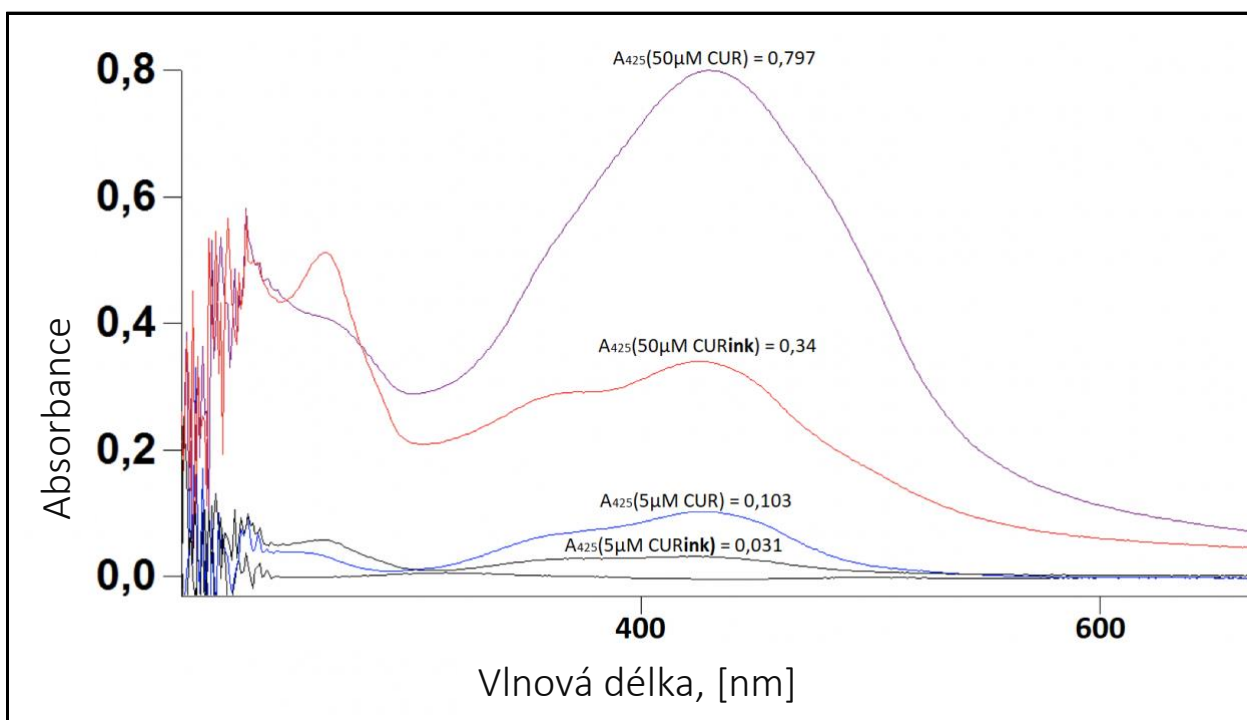
Podobně jak bylo popsáno u isoformy CYP1A1 byl stanoven účinek CUR a jeho směsí s Asc a ionty kovů na 6 β -hydroxylasovou aktivitu CYP3A4 exprimovaného v BaktosomechTM. Na základě stanovení hodnoty IC₅₀ byla zvolena 5 μ M koncentrace kurkuminu. Směsi obsahovaly askorbát a zinečnaté, resp. hořečnaté ionty (Obr. 4.17). U této isoformy se projevila podobná tendence, jako u CYP1A1: CUR inkubovaný po dobu 30 minut při 37°C má slabší inhibiční vliv než CUR neinkubovaný (pokles aktivity na 65 vs. 44 %). Inhibiční účinek kurkuminu byl ve směsi s Asc a kovovými ionty zachován i po 30-minutové inkubaci. Tak např. inkubovaná směs CUR s 50 μ M Asc a 5 μ M MgCl₂ způsobila snížení aktivity na 44 %, stejně jako samotný neinkubovaný kurkumin, zatímco vzorek s CUR po 30-minutové inkubaci měl relativní aktivitu 65 % (Obr. 4.17a).



Obrázek 4.17: Vliv kurkuminu (CUR) a jeho směsí (MIX) s askorbátem a (a) zinečnatými, resp. (b) hořečnatými ionty na aktivitu lidského CYP3A4 v BaktosomechTM sledovaný pomocí markerové reakce 6 β -hydroxylace testosteronu. Koncentrace testosteronu v reakční směsi činila 20 μ M. Koncentrace enzymu byla 30 pmol/ml. Šrafované sloupce reprezentují vliv 5 μ M kurkuminu nebo jeho odpovídajících směsí po 30-minutové inkubaci při 37 °C. **MIX1:** 5 μ M CUR + 50 μ M Asc + 5 μ M ^aZnCl₂/^bMgCl₂; **MIX2:** 5 μ M CUR + 1000 μ M Asc + 100 μ M ^aZnCl₂/^bMgCl₂. Procenta představují aktivitu enzymu za uvedených podmínek vztahenou na aktivitu vzorku s přidáním rozpouštědly (100%). Data představují průměry a relativní chyby ze tří měření. Statistická významnost byla vyhodnocena pomocí T-testu: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 při porovnání s odpovídajícím vzorkem s inkubovaným kurkuminem; ▽ p < 0,05; ▽▽ p < 0,01; při porovnání s odpovídajícím vzorkem s neinkubovaným kurkuminem.

4.5 Stanovení teplotní stability kurkuminu

Vzhledem k pozorovanému snížení inhibičního účinku inkubovaného kurkuminu bylo s cílem stanovení jeho teplotní stability změřeno absorpční spektrum před a po 30-minutové inkubaci v pufru při 37°C. Byly vyzkoušeny dvě koncentrace CUR: 5 a 50 μM (Obr. 4.18). U obou koncentrací byl po provedení inkubace pozorován pokles absorbance při vlnové délce absorpčního maxima (425 nm) více než o polovinu. V inkubovaných vzorcích byl také pozorován nárůst absorpčního piku v oblasti 260 nm.



Obrázek 4.18: Absorpční spektra kurkuminu před a po provedení 30-minutové inkubace při 37 °C (ink). Hodnoty absorbance odpovídající vlnové délce absorpčního maxima (A_{425}) jsou označeny nad absorpčními píky.

5 DISKUZE

Potravinové doplňky, nazývané též potravinové suplementy, jsou široce užívané produkty, které mají za cíl doplnit stravu o dodatečné živiny. Moderní potravinové suplementy mohou obsahovat širokou škálu látek, včetně vitamínů, minerálů, bylinných extraktů, aminokyselin, probiotik a mnoha dalších. Vzhledem k popularitě těchto produktů roste vědecký zájem o studium jejich možných vzájemných interakcí a účinků na lidské zdraví. Předkládaná diplomová práce byla věnována studiu vlivu kurkuminu, askorbátu, zinečnatých a hořečnatých iontů na vybrané cytochromy P450 v gastrointestinálním traktu: CYP1A1 a CYP3A4. Z časových důvodů nebyla i původně plánovaná isoforma CYP2C9 zkoumána.

Cytochromy P450 představují rodinu hemoproteinů hrajících klíčovou roli v metabolismu exogenních substrátů, mezi které patří i potravinové suplementy, se kterými CYP přicházejí do styku v GIT. Aktivita cytochromů P450 je důležitým parametrem v kontextu farmakokinetiky léčiv, například inhibitory CYP konzumované v potravě mohou zpomalit metabolismus užívaných léčiv, což může vést k jejich nadměrnému působení a toxicitě. Známou složkou potravinových suplementů s prokázaným inhibičním účinkem na CYP je výše zmíněný kurkumin, jehož vliv na aktivitu CYP byl zkoumán v této diplomové práci.

Pro stanovení vlivu kurkuminu na isoformu CYP1A1 *in vitro* byla měřena *O*-deethylasová aktivita v jaterních mikrosomech izolovaných z potkanů premedikovaných Sudanem I, který je známým induktorem CYP1A [151]. Byla stanovena koncentrace CUR vyvolávající 50 % inhibici (IC_{50}), která činila 1,1 μM při koncentraci substrátu 2 μM 7-ethoxyresotufinu (Obr. 4.1 na str. 47), což je v souladu s výsledkem dřívější studie, kde kurkumin také vykazoval silný inhibiční účinek ($IC_{50} = 2 \mu\text{M}$) a výrazně potlačil *O*-deethylasovou aktivitu v jaterních mikrosomech izolovaných z potkanů vystavených β -naftoflavonu, který také indukuje expresi CYP1A1 [74]. Silný inhibiční účinek kurkuminu se projevil i při sledování *O*-deethylasové aktivity lidské isoformy CYP1A1 exprimované v SupersomechTM, kde hodnota IC_{50} byla 2,7 μM (Obr. 4.1. na str. 47). V následujících experimentech však 1 μM kurkumin pravidelně snižoval enzymovou aktivitu lidské isoformy na 50 %, což odpovídá hodnotě IC_{50} pro potkaní CYP1A1 v mikrosomech.

Byl také stanoven vliv kurkuminu na aktivitu CYP3A4 pomocí markerové reakce 6 β -hydroxylace testosteronu *in vitro*. V porovnání s isoformou CYP1A1, byla pro CYP3A4 nalezena vyšší hodnota IC_{50} 4,7 μM při 20 μM koncentraci substrátu (Obr. 4.6 na str. 50), která však stále svědčí o silném inhibičním účinku CUR. Oproti hodnotám uvedeným v literatuře ($IC_{50} = 16,3 \mu\text{M}$ [81] ; 11,9 μM [82]) je stanovená IC_{50} poměrně nízká, což pravděpodobně souvisí s použitím jiných substrátů a markerových reakcí.

Ze všech cytochromů P450 v lidském tenkém střevě má CYP3A4 nejvyšší hladinu a je zapojen do biotransformace přibližně 50 % známých léčiv. Lze proto předpokládat, že tato isoforma bude *in vivo* v enterocytech nezanedbatelně ovlivněna konzumovaným kurkuminem, což se může projevit alternací účinků léčiv, které jsou primárně metabolizovány CYP3A4. Jedná se o lékovou interakci, jejíž důsledkem je potenciální ztráta terapeutického efektu neboli zúžení terapeutického okna daného léčiva.

Pro ověření specifity pozorované inhibice byl stanoven vliv kurkuminu na aktivitu NADPH:cytochrom-P450-oxidoreduktasy (POR), která je obligátním partnerem cytochromů P450 a plní kritickou roli v transferu elektronů během katalýzy [155]. Proto potlačení aktivity CYP mohlo být projevem inhibičního účinku na POR, ale ne na samotné cytochromy P450. Při stanovení vlivu kurkuminu na aktivitu P450 oxidoreduktasy nebyla pozorována signifikantní inhibice (Obr. 4.2 na str. 48), což znamená, že stanovený inhibiční vliv byl skutečně způsoben potlačením aktivity samotných cytochromů P450. Získaný výsledek je v souladu s další studií Suresh a kol. (2006), kde týdenní premedikace potkanů kurkuminem neměla vliv na aktivitu POR v jejich jaterních mikrosomech [156].

Další zkoumanou látkou v této diplomové práci je vitamín C, také známý jako askorbát, který je důležitým nutričním prvkem vykazujícím silný antioxidační účinek. Uvádí se, že intracelulární koncentrace askorbátu má široké rozmezí 600 μM –4 mM [157], proto byl sledován vliv poměrně vysokých koncentrací Asc (do 10 mM). V rámci jiné studie byl pozorován pouze slabý inhibiční účinek askorbátu na dealkylační aktivitu CYP1A v buňkách potkaního hepatomu, kde 5 μM Asc snížil aktivitu o 7 % [76], zatímco v rámci této diplomové práce potlačení *O*-deethylasové aktivity askorbátem bylo pozorováno až od koncentrace 250 μM (snížení aktivity o 10 % v potkaních jaterních mikrosomech), resp. od 1mM (snížení aktivity lidské isoformy o 14 % v SupersomechTM) (Obr. 4.7 na str. 52). Výraznější inhibice byla pozorována u isoformy CYP3A4, u které 20 μM askorbát vyvolal potlačení 6 β -hydroxylační aktivity o 12 % (Obr.4.8 na str. 53). Inhibiční vliv askorbátu na CYP3A4 *in vitro* byl potvrzen v rámci dřívější studie Dressera a kol. (2002) na modelu lidských jaterních mikrosomů, podání askorbyl palmitátu *in vivo* však nemělo vliv na farmakokinetiku metabolizovaného léčiva [112], z čehož vyplývá, že askorbát by pravděpodobně neměl vstupovat do lékových interakcí a ovlivňovat aktivitu CYP3A4 v GIT, i když byla pozorována inhibice této isoformy *in vitro*.

Z chemického hlediska je vitamín C slabou kyselinou schopnou odštěpovat protony a tedy způsobovat snížení pH roztoku. V této diplomové práci byly použity vysoké koncentrace Asc, které pravděpodobně mohly ovlivnit pH reakční směsi, což by se mohlo projevit změnou enzymové aktivity studovaných CYP. Bylo proto ověřeno, jestli pozorovaný inhibiční účinek

askorbátu nesouvisí s poklesem pH vyvolaným přidáním kyseliny do reakční směsi. Byl stanoven vliv přidaného Asc na hodnotu pH 0,1M fosfátového pufru (pH 7,4) používaného na přípravu reakčních směsí (Tab. 4.1 na str. 53). Ukázalo se, že ze všech použitých koncentrací Asc hodnotu pH ovlivnily pouze dvě: 5mM (pokles na pH 7,3) a 10 mM (pokles na pH 7,2). Následně byl sledován vliv alternativních hodnot pH na aktivitu potkaního CYP1A1 a lidského CYP3A4. Změna pH neměla výrazný vliv na *O*-deethylasovou aktivitu v potkaních jaterních mikrosomech (Obr. 4.9 na str. 54), zatímco rychlost přeměny testosteronu cytochromem P450 3A4 byla při pH 7,3 zvýšena o 42% vůči pH 7,4 (Obr. 4.10 na str. 54). Z absence výrazného zpomalení reakční rychlosti vyvolané změnou pH vyplývá, že pozorovaný pokles aktivity CYP1A1 a CYP3A4 byl bezprostředně způsoben samotným askorbátem, nikoliv vychýlením z oblasti pH-optima.

Cytochromy P450 jsou metaloenzymy obsahující atom železa v centrální prostetické skupině hemu. Kovové ionty se mohou bezprostředně vázat na aktivní místo CYP a ovlivňovat jeho strukturu a stabilitu, mohou také modulovat elektronový přenos mezi hemem a substrátem, tyto jevy mají různé dopady na aktivitu enzymu v závislosti na typu kovu a jeho koncentraci. V rámci předkládané diplomové práce byl zkoumán vliv zinečnatých a hořečnatých iontů na aktivitu CYP. Hořečnaté ionty nevykazovaly výrazné potlačení aktivity lidské a potkaní isoformy CYP1A1 (Obr. 4.12 na str. 56), což souhlasí se studií Kim a kol. (2002), kde signifikantní inhibice také nebyla pozorována [148]. U isoformy CYP3A4 způsobil 250 μ M MgCl₂ pokles 6 β -hydroxylační aktivity na 86 % (Obr. 4.13b na str. 57), což může souviset s konformační změnou a distorzí aktivního centra vyvolanou přítomností Mg²⁺ [146]. Přídavek zinečnatých iontů měl inhibiční účinek na každou ze zkoumaných isoform CYP. *O*-deethylasová aktivita u CYP1A1 v potkaních jaterních mikrosomech byla přidavkem ZnCl₂ potlačena mnohem mírněji než u lidského CYP1A1 v SupersomechTM. U potkaní isoformy byla výrazná inhibice pozorována až od 250 μ M koncentrace Zn²⁺, která způsobila pokles aktivity na 81 %, zatímco již 20 μ M koncentrace zinečnatých iontů potlačila enzymovou aktivitu lidského CYP1A1 na 73 % (Obr. 4.11 na str. 55). Pozorovaný rozdíl v účinku Zn²⁺ na lidský a potkaní CYP1A1 může být způsoben použitím rozdílných experimentálních modelů: potkaní jaterní mikrosomy obsahují řadu dalších enzymů, mj. hepatální CYP1A2, který také přispívá k *O*-deethylasové aktivitě, zatímco lidská isoforma byla sledována na specifitějším supersomálním modelu, ve kterém CYP1A1 může projevit vyšší citlivost k působení zinečnatých iontů. Cytochrom P450 3A4 byl také ovlivněn přidavkem ZnCl₂, jehož 100 μ M koncentrace způsobila pokles enzymové aktivity o 13 % (Obr. 4.13a na str. 57). Potlačení 6 β -hydroxylační aktivity rekombinantního CYP3A4 zinečnatými ionty bylo prokázáno v dřívější *in vitro* studii Kim a kol. (2005) [149], kde stanovená hodnota IC₅₀ činila 27 μ M, i když koncentrace testosteronu byla 200 μ M. V literatuře se uvádí, že inhibiční vliv

zinečnatých iontů je spojen s jejich modulací elektronového přenosu interakcí s cytochromem b_5 , který se účastní katalytického procesu jako fakultativní redoxní partner cytochromů P450; v nepřítomnosti cytochromu b_5 je inhibiční vliv Zn^{2+} eliminován [145,149]. Specifické působení zinečnatých iontů na cytochrom b_5 může být příčinou mnohem slabší inhibice pozorované v této diplomové práci na baktosomálním modelu exprimujícím CYP3A4, neboť neobsahoval cytochrom b_5 , který by mohl přispět ke katalytickému procesu. Pozorována inhibice se těžko aplikuje na hypotetický vznik lékových interakcí a modulace biotransformace léčiv *in vivo*, neboť maximální intracelulární koncentrace volného Zn^{2+} je 100 pM [158], což je řádově nižší než koncentrace použité v rámci této diplomové práce, proto je vliv zinečnatých iontů na aktivitu CYP *in vivo* nepravděpodobný.

Popsané složky potravinových doplňků jsou často užívány ve směsích. Hlavním cílem předkládané diplomové práce je stanovení jejich společného vlivu na aktivitu cytochromů P450 vyskytujících se v GIT. Pro imitaci fyziologických podmínek byla také provedena 30-minutová inkubace směsí složek potravinových suplementů ve fosfátovém pufru (pH 7,4) při 37 °C před přidáním do reakční směsi. Vliv směsi obsahující kurkumin, askorbát a zinečnaté, resp. hořečnaté ionty byl vždy porovnán s vlivem samotného kurkuminu. Ukázalo se, že 30-minutová inkubace CUR v pufru při 37 °C způsobuje signifikantní snížení jeho inhibičního účinku jak na lidský a potkaní CYP1A1, tak na CYP3A4. Například *O*-deethylasová aktivita lidského CYP1A1 v SupersomechTM byla přidavkem 1 μM CUR potlačena na 50 %, po provedení inkubace byla relativní aktivita vzorku s kurkuminem snížena pouze na 89 % (Obr. 4.15b na str. 61). Podobná tendence byla pozorována i u CYP3A4 v BaktosomechTM, kde 5 μM kurkumin vyvolal pokles 6β-hydroxylační aktivity na 44 %, zatímco CUR inkubovaný při 37 °C potlačil aktivitu jen na 66 % (Obr. 4.16b na str. 62). Pokles inhibičního účinku po inkubaci pravděpodobně souvisí s nízkou stabilitou kurkuminu. Uvádí se, že jeho biologický poločas při fyziologické teplotě a neutrálním pH činí méně než 10 minut [51]. Pro stanovení teplotní stability CUR bylo také změřeno jeho absorpční spektrum před a po 30-minutové inkubaci v pufru při 37 °C. Ukázalo se, že po inkubaci kurkumin ztrácí víc než 50 % absorbance při 425 nm, vlnové délce jeho absorpčního maxima, dochází tedy k jeho degradaci. 30-minutová inkubace nejen vedla ke snížení absorbance kurkuminu, ale způsobila vznik nového absorpčního píku v oblasti 260 nm (Obr. 4.18 na str. 64). Získané výsledky jsou v naprostém souladu se studií Gagandeep a kol. (2020) [159], kde již 15-minutová inkubace v PBS pufru (pH 7,4) při 37 °C vyvolala signifikantní pokles absorbance při 425 nm a vznik dalšího absorpčního píku při 260 nm. Druhý absorpční pík pravděpodobně odpovídá degradačním produktům kurkuminu majících jiné absorpční vlastnosti než původní molekula.

Pokud byl ale kurkumin přidán do reakční směsi spolu s askorbátem a kovovými ionty, stupeň inhibice nebyl po 30-minutové inkubaci v porovnání s neinkubovaným CUR téměř změněn, a to u obou isoformů CYP. Například přidání ekvimolární (1 μ M) směsi obsahující CUR, Asc a $MgCl_2$ vyvolalo po 30-minutové inkubaci pokles *O*-deethylasové aktivity lidského CYP1A1 na 51 %, což je stejná úroveň inhibice jako u samotného kurkuminu bez provedené inkubace (Obr. 4.15b na str. 61). Je třeba zmínit, že „stabilizační“ účinek byl pozorován u každé směsi bez ohledu na poměr koncentrací jejích složek. Popsaná tendence byla pozorována u obou typů směsí: jak se zinečnatými, tak s hořečnatými ionty. Například inkubovaný 5 μ M kurkumin vyvolal pokles 6 β -hydroxylační aktivity CYP3A4 na 77 %, zatímco jeho inkubovaná směs s 50 μ M askorbátem a 5 μ M $ZnCl_2$ snížila aktivitu na 49 % (Obr. 4.17 na str. 63). Dalším pozorovaným trendem bylo zesílení inhibičního účinku u vzorků s neinkubovanou směsí na rozdíl od samotného neinkubovaného CUR. Neinkubovaná ekvimolární směs s kurkuminem, askorbátem a Mg^{2+} způsobila silnější inhibici než samotný neinkubovaný kurkumin: 28 % vs. 50 %. Na rozdíl od lidských CYP1A1 a CYP3A4, kde uvedený vliv směsí vypadal podobně, u potkaních jaterních mikrosomů popsaná tendence nebyla tak zjevná, což ale může být způsobeno použitým experimentálním modelem s větším množstvím interferujících faktorů.

S cílem zjistit, která z komponent směsí způsobuje pozorované zesílení inhibičního účinku, bylo provedeno sledování vlivu kurkuminu ve směsi s jednou ze složek (Asc nebo $ZnCl_2/MgCl_2$) na aktivitu CYP1A1 v potkaních jaterních mikrosomech. Každá z použitých kombinací měla podobný účinek: samotný 1 μ M kurkumin po 30-minutové inkubaci při 37 °C snížil *O*-deethylasovou aktivitu na 65 %, zatímco jeho ekvimolární směs s askorbátem potlačila po stejné preinkubaci aktivitu na 46 %, s kovovými ionty Zn^{2+} nebo Mg^{2+} na 51, resp. 53 %, což odpovídá síle inhibičního účinku neinkubovaného CUR, který snížil aktivitu přibližně o 50 % (Obr. 4.16b na str. 62).

Pozorované zesílení inhibičního účinku v případě směsí potravinových doplňků může souviset se stabilizací molekuly kurkuminu redoxně aktivním askorbátem a ionty kovů, se kterými CUR vytváří pevné chelatační komplexy prostřednictvím své enolické skupiny [53]. V některých případech i neinkubované směsi vykazovaly signifikantně silnější inhibici než samotný neinkubovaný CYP. Je možné, že zesílení inhibičního účinku vyvolané směsí biologicky aktivních látek je dáno zatím neznámými interakcemi mezi jednotlivými složkami. Stanovená tendence má klinický význam: bylo potvrzeno, že CUR je poměrně silným inhibitorem CYP1A1 a CYP3A4, který hraje klíčovou roli v biotransformaci širokého spektra klinicky používaných léčiv. Jeho inhibiční účinek by však za fyziologických podmínek mohl být významně potlačen v důsledku teplotního rozkladu. Tento předpoklad je podporován řadou *in vivo* studií, ve kterých kurkumin

neměl vliv na farmakokinetiku léčiv metabolizovaných CYP3A4 [84], resp. jeho ortologní potkaní formou CYP3A1 [86]. V další *in vitro* studii Su a kol. (2022) bylo prokázáno, že degradace kurkuminu je v lidských a potkaních jaterních mikrosomech NADPH-dependentní [70]. Je tedy možné, že při současné konzumaci kurkuminu s askorbátem nebo kovovými ionty jeho inhibiční účinek bude v organismu zachován. Důsledkem užívání CUR v kombinaci s askorbátem a kovovými ionty v průběhu léčivé terapie by pak mohly být toxické vedlejší účinky, což představuje největší riziko u léků s nízkým terapeutickým indexem, prodloužení jejichž biologického poločasu má obzvlášť nebezpečné následky, jako jsou např. antikoagulancia nebo imunosupresiva.

Tato diplomová práce je součástí širšího projektu zkoumajícího možné interakce ve směsích různých typů potravinových suplementů. Získané výsledky naznačují, že vzájemné interakce potravinových suplementů skutečně mohou alternovat účinky biologicky aktivních látek *in vitro*, nicméně popsaná problematika vyžaduje hlubší výzkum v oblasti intermolekulových interakcí: identifikace rozpadových produktů samotného kurkuminu a možných produktů jeho interakce s askorbátem a kovovými ionty.

6 ZÁVĚR

Předmětem studia této diplomové práce byl vliv kurkuminu, askorbátu, zinečnatých a hořečnatých iontů na aktivitu cytochromů P450 vyskytujících se v GIT.

V rámci předkládané DP byly získány následující výsledky:

- Byla provedena literární rešerše věnovaná vlivu kurkuminu, askorbátu a kovových iontů na aktivitu CYP1A1, CYP2C9 a CYP3A4.
- Byl stanoven vliv zinečnatých a hořečnatých iontů na aktivitu CYP1A1 a CYP3A4. Zinečnaté ionty vykazovaly významný inhibiční účinek na obě isoformy, zatímco inhibiční vliv hořečnatých iontů nebyl pozorován.
- Byl prokázán inhibiční účinek askorbátu na CYP1A a CYP3A4.
- Byly určeny hodnoty IC_{50} pro kurkumin vůči zkoumaným isoformám CYP. Pro lidský a potkaní CYP1A1 hodnota IC_{50} činila 2,7, resp. 1,1 μM . Vůči CYP3A4 kurkumin vykazoval IC_{50} 4,7 μM .
- V případě provedení 30-minutové inkubace CUR při 37 °C v prostředí fosfátového pufru před přidáním do reakční směsi došlo ke snížení inhibičního účinku CUR; tato změna však nebyla pozorována v případě preinkubace CUR ve směsi s askorbátem a/nebo kovovými ionty za stejných podmínek.
- Nebyl pozorován inhibiční vliv kurkuminu na aktivitu NADPH:cytochrom-P450 oxidoreduktasy.
- Isoforma CYP2C9 nebyla z časových důvodů experimentálně zkoumána.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Robinson S. M. Improving nutrition to support healthy ageing: what are the opportunities for intervention?. *The Proceedings of the Nutrition Society*. **77**, 257–264 (2018).
2. Féart C. Dietary Supplements: Which Place between Food and Drugs?. *Nutrients*. **12**, 204 (2020).
3. Ronis, M., Pedersen, K. B., & Watt, J. Adverse Effects of Nutraceuticals and Dietary Supplements. *Annual review of pharmacology and toxicology*. **58**, 583–601 (2018).
4. Dwyer, J. T., Coates, P. M., & Smith, M. J. Dietary Supplements: Regulatory Challenges and Research Resources. *Nutrients*. **10**, 41 (2018).
5. Kantor, E. D., Rehm, C. D., Du, M., White, E., & Giovannucci, E. L. Trends in Dietary Supplement Use Among US Adults From 1999-2012. *JAMA*. **316**, 1464–1474 (2016).
6. Kozhuharov, V. R., Ivanov, K., & Ivanova, S. Dietary Supplements as Source of Unintentional Doping. *BioMed research international*. **2022**, 8387271 (2022).
7. Zeilstra, D., Younes, J. A., Brummer, R. J., & Kleerebezem, M. Perspective: Fundamental Limitations of the Randomized Controlled Trial Method in Nutritional Research: The Example of Probiotics. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*. **9**, 561–571 (2018).
8. Matura, J. M., Shea, L. A., & Bankes, V. A. Dietary supplements, cytochrome metabolism, and pharmacogenetic considerations. *Irish journal of medical science*. **191**, 2357–2365 (2022).
9. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P. & Frei, E.: Význam cytochromů P450 pro lidské Zdraví. *Chem. List*. **93**, 229–237 (1999)
10. Plettner E. Preface: Cytochrome P450. *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics*. **1866**, 1 (2018).
11. Guengerich F. P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical research in toxicology*. **14**, 611–650 (2001).
12. Guengerich, F. P., Waterman, M. R., & Egli, M. Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. *Trends in pharmacological sciences*. **37**, 625–640 (2016).
13. Isin, E. M., & Guengerich, F. P. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et biophysica acta*. **1770**, 314–329 (2007).
14. Kunze, K. L., Mangold, B. L., Wheeler, C., Beilan, H. S., & Ortiz de Montellano, P. R. The cytochrome P-450 active site. Regiospecificity of prosthetic heme alkylation by olefins and acetylenes. *The Journal of biological chemistry*. **258**, 4202–4207 (1983).
15. Ortiz de Montellano P. R. *Cytochrome p450 : structure mechanism and biochemistry* (3rd ed.). New York, Kluwer Academic/Plenum (2005).
16. Yano, J. K., Wester, M. R., Schoch, G. A., Griffin, K. J., Stout, C. D., & Johnson, E. F. The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution. *The Journal of biological chemistry*. **279**, 38091–38094 (2004).
17. Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G., & Schlichting, I. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical reviews*. **105**, 2253–2277 (2005).

18. Tornio, A., & Backman, J. T. Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*. **83**, 3–32 (2018).
19. Rendic, S., & Guengerich, F. P. Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals. *Chemical research in toxicology*. **28**, 38–42 (2015).
20. Zanger, U. M., Turpeinen, M., Klein, K., & Schwab, M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and bioanalytical chemistry*. **392**, 1093–1108 (2008).
21. Lynch, T., & Price, A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *American family physician*. **76**, 391–396 (2007).
22. Al-Majdoub, Z. M., Couto, N., Achour, B., Harwood, M. D., Carlson, G., Warhurst, G., Barber, J., & Rostami-Hodjegan, A. Quantification of Proteins Involved in Intestinal Epithelial Handling of Xenobiotics. *Clinical pharmacology and therapeutics*. **109**, 1136–1146 (2021).
23. Grangeon, A., Clermont, V., Barama, A., Gaudette, F., Turgeon, J., & Michaud, V. Determination of CYP450 Expression Levels in the Human Small Intestine by Mass Spectrometry-Based Targeted Proteomics. *International journal of molecular sciences*. **22**, 12791 (2021).
24. Kaminsky, L. S., & Fasco, M. J. Small intestinal cytochromes P450. *Critical reviews in toxicology*. **21**, 407–422 (1991).
25. Androutsopoulos, V. P., Tsatsakis, A. M., & Spandidos, D. A. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC cancer*. **9**, 187 (2009).
26. Walsh, A. A., Szklarz, G. D., & Scott, E. E. Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. *The Journal of biological chemistry*. **288**, 12932–12943 (2013).
27. Liu, J., Sridhar, J., & Foroozesh, M. Cytochrome P450 family 1 inhibitors and structure-activity relationships. *Molecules (Basel, Switzerland)*. **18**, 14470–14495 (2013).
28. Badal, S., & Delgoda, R. Role of the modulation of CYP1A1 expression and activity in chemoprevention. *Journal of applied toxicology : JAT*. **34**, 743–753 (2014).
29. Lee, A. J., Cai, M. X., Thomas, P. E., Conney, A. H., & Zhu, B. T. Characterization of the oxidative metabolites of 17beta-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms. *Endocrinology*. **144**, 3382–3398 (2003).
30. Shimada, T., & Fujii-Kuriyama, Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer science*. **95**, 1–6 (2004).
31. Go, R. E., Hwang, K. A., & Choi, K. C. Cytochrome P450 1 family and cancers. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. **147**, 24–30 (2015).
32. Krizkova, J., Burdova, K., Hudecek, J., Stiborova, M., & Hodek, P. Induction of cytochromes P450 in small intestine by chemopreventive compounds. *Neuro endocrinology letters*. **29**, 717–721 (2008).
33. Nebert, D. W., & Karp, C. L. Endogenous functions of the aryl hydrocarbon receptor (AHR): intersection of cytochrome P450 1 (CYP1)-metabolized eicosanoids and AHR biology. *The Journal of biological chemistry*. **283**, 36061–36065 (2008).
34. Wang, K., Gao, Q., Zhang, T., Rao, J., Ding, L., & Qiu, F. Inhibition of CYP2C9 by natural products: insight into the potential risk of herb-drug interactions. *Drug metabolism reviews*. **52**, 235–257 (2020).

35. Gu, Y., Hou, W., Shen, X. Y., Zhuo, S. X., Zhang, H. R., Ji, M. H., Chen, M. J., & Guo, Y. Y. CYP2C9, a Metabolic CYP450s Enzyme, Plays Critical Roles in Activating Ellagic Acid in Human Intestinal Epithelial Cells. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. **26**, e923104 (2020).
36. Lee, C. R., Goldstein, J. A., & Pieper, J. A. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics*. **12**, 251–263 (2002).
37. Sangkuhl, K., Claudio-Campos, K., Cavallari, L. H., Agundez, J., Whirl-Carrillo, M., Duconge, J., Del Tredici, A. L., Wadelius, M., Rodrigues Botton, M., Woodahl, E. L., Scott, S. A., Klein, T. E., Pratt, V. M., Daly, A. K., & Gaedigk, A. PharmVar GeneFocus: CYP2C9. *Clinical pharmacology and therapeutics*. **110**, 662–676 (2021).
38. Fekete, F., Mangó, K., Déri, M., Incze, E., Minus, A., & Monostory, K. Impact of genetic and non-genetic factors on hepatic CYP2C9 expression and activity in Hungarian subjects. *Scientific reports*. **11**, 17081 (2021).
39. Wrighton, S. A., Schuetz, E. G., Thummel, K. E., Shen, D. D., Korzekwa, K. R., & Watkins, P. B. The human CYP3A subfamily: practical considerations. *Drug metabolism reviews*. **32**, 339–361 (2000).
40. Lolodi, O., Wang, Y. M., Wright, W. C., & Chen, T. Differential Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and its Implication in Drug Discovery. *Current drug metabolism*. **18**, 1095–1105 (2017).
41. Shinkyō, R., & Guengerich, F. P. Inhibition of human cytochrome P450 3A4 by cholesterol. *The Journal of biological chemistry*. **286**, 18426–18433 (2011).
42. Yamazaki, H., Urano, T., Hiroki, S., & Shimada, T. Effects of erythromycin and roxithromycin on oxidation of testosterone and nifedipine catalyzed by CYP3A4 in human liver microsomes. *The Journal of toxicological sciences*. **21**, 215–226 (1996).
43. Niwa, T., Shiraga, T., Yamasaki, S., Ishibashi, K., Ohno, Y., & Kagayama, A. In vitro activation of 7-benzyloxyresorufin O-debenzylolation and nifedipine oxidation in human liver microsomes. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **33**, 717–729 (2003).
44. Cao, S., & Weaver, C. M. Bioactives in the Food Supply: Effects on CVD Health. *Current atherosclerosis reports*. **24**, 655–661 (2022).
45. Fraga, C. G., , Croft, K. D., , Kennedy, D. O., , & Tomás-Barberán, F. A. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & function*. **10**, 514–528 (2019).
46. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*. **81**, 230–242 (2005).
47. Li, F. S., & Weng, J. K. Demystifying traditional herbal medicine with modern approach. *Nature plants*. **3**, 17109 (2017).
48. Moyer M. W. Nutrition: vitamins on trial. *Nature*. **510**, 462–464 (2014).
49. Unlu, A., Nayir, E., Dogukan Kalenderoglu, M., Kirca, O., & Ozdogan, M. Curcumin (Turmeric) and cancer. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*. **21**, 1050–1060 (2016).
50. Devassy, J. G., Nwachukwu, I. D., & Jones, P. J. Curcumin and cancer: barriers to obtaining a health claim. *Nutrition reviews*. **73**, 155–165 (2015).

51. Kotha, R. R., & Luthria, D. L. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules*. **24**, 2930 (2019).
52. Prasad, S., Gupta, S. C., Tyagi, A. K., & Aggarwal, B. B. Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. *Biotechnology advances*. **32**, 1053–1064 (2014).
53. Priyadarsini K. I. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*. **19**, 20091–20112 (2014).
54. Payton, F., Sandusky, P., & Alworth, W. L. NMR study of the solution structure of curcumin. *Journal of natural products*. **70**, 143–146 (2007).
55. Goel, A., Kunnumakkara, A. B., & Aggarwal, B. B. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochemical pharmacology*. **75**, 787–809 (2008).
56. Borsari, M.; Ferrari, E.; Grandi, R.; Saladini, M. Curcuminoids as potential new iron-chelating agents: Spectroscopic, polarographic and potentiometric study on their Fe(III) complexing ability. *Inorg. Chim. Acta*. **328**, 61–68 (2002).
57. Baum, L., & Ng, A. Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. **6**, 367–449 (2004).
58. Mei, X., Xu, D., Xu, S., Zheng, Y., & Xu, S. Gastroprotective and antidepressant effects of a new zinc(II)-curcumin complex in rodent models of gastric ulcer and depression induced by stresses. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. **99**, 66–74 (2011).
59. García-Niño, W. R., & Pedraza-Chaverri, J. Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. **69**, 182–201 (2014).
60. Gupta, S. C., Prasad, S., Kim, J. H., Patchva, S., Webb, L. J., Priyadarsini, I. K., & Aggarwal, B. B. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Natural product reports*. **28**, 1937–1955 (2011).
61. Priyadarsini, K. I., Maity, D. K., Naik, G. H., Kumar, M. S., Unnikrishnan, M. K., Satav, J. G., & Mohan, H. Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free radical biology & medicine*. **35**, 475–484 (2003).
62. Priyadarsini K. I. Free radical reactions of curcumin in membrane models. *Free radical biology & medicine*. **23**, 838–843 (1997).
63. Nelson, K. M., Dahlin, J. L., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G. F., & Walters, M. A. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *Journal of medicinal chemistry*. **60**, 1620–1637 (2017).
64. Gupta, S. C., Patchva, S., & Aggarwal, B. B. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *The AAPS journal*. **15**, 195–218 (2013).
65. DiSilvestro, R. A., Joseph, E., Zhao, S., & Bomser, J. Diverse effects of a low dose supplement of lipidated curcumin in healthy middle aged people. *Nutrition journal*. **11**, 79 (2012).
66. Sharma, R. A., Euden, S. A., Platton, S. L., Cooke, D. N., Shafayat, A., Hewitt, H. R., Marczylo, T. H., Morgan, B., Hemingway, D., Plummer, S. M., Pirmohamed, M., Gescher, A. J., & Steward, W. P. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. **10**, 6847–6854 (2004).
67. Polasa, K., Raghuram, T. C., Krishna, T. P., & Krishnaswamy, K. Effect of turmeric on urinary mutagens in smokers. *Mutagenesis*. **7**, 107–109 (1992).

68. Soni, K. B., & Kuttan, R. Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers. *Indian journal of physiology and pharmacology*. **36**, 273–275 (1992).
69. Chuengsamarn, S., Rattanamongkolgul, S., Luechapudiporn, R., Phisalaphong, C., & Jirawatnotai, S. Curcumin extract for prevention of type 2 diabetes. *Diabetes care*. **35**, 2121–2127 (2012).
70. Su, S., Wu, H., Zhou, J., Yuan, G., Wang, H., & Feng, J. Kinetic Characteristics of Curcumin and Germacrone in Rat and Human Liver Microsomes: Involvement of CYP Enzymes. *Molecules (Basel, Switzerland)*. **27**, 4482 (2022).
71. Tsuda T., Curcumin as a functional food-derived factor: degradation products, metabolites, bioactivity, and future perspectives. *Food & function*. **9**, 705–714 (2018).
72. Bahramsoltani, R., Rahimi, R., & Farzaei, M. H. Pharmacokinetic interactions of curcuminoids with conventional drugs: A review. *Journal of ethnopharmacology*. **209**, 1–12 (2017).
73. Mach, C. M., Chen, J. H., Mosley, S. A., Kurzrock, R., & Smith, J. A. Evaluation of liposomal curcumin cytochrome p450 metabolism. *Anticancer research*. **30**, 811–814 (2010).
74. Oetari, S., Sudibyo, M., Commandeur, J. N., Samhoedi, R., & Vermeulen, N. P. Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver. *Biochemical pharmacology*. **51**, 39–45 (1996).
75. Thapliyal, R., & Maru, G. B. Inhibition of cytochrome P450 isozymes by curcumins in vitro and in vivo. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. **39**, 541–547 (2001).
76. Gerhäuser, C., Klimo, K., Heiss, E., Neumann, I., Gamal-Eldeen, A., Knauft, J., Liu, G. Y., Sitthimonchai, S., & Frank, N. Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutation research*. **523-524**, 163–172 (2003).
77. Ciolino, H. P., Daschner, P. J., Wang, T. T., & Yeh, G. C. Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochemical pharmacology*. **56**, 197–206 (1998).
78. Wang, Z., Sun, W., Huang, C. K., Wang, L., Xia, M. M., Cui, X., Hu, G. X., & Wang, Z. S. Inhibitory effects of curcumin on activity of cytochrome P450 2C9 enzyme in human and 2C11 in rat liver microsomes. *Drug development and industrial pharmacy*. **41**, 613–616 (2015).
79. Volak, L. P., Ghirmai, S., Cashman, J. R., & Court, M. H. Curcuminoids inhibit multiple human cytochromes P450, UDP-glucuronosyltransferase, and sulfotransferase enzymes, whereas piperine is a relatively selective CYP3A4 inhibitor. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. **36**, 1594–1605 (2008).
80. Sasaki, T., Sato, Y., Kumagai, T., Yoshinari, K., & Nagata, K. Effect of health foods on cytochrome P450-mediated drug metabolism. *Journal of pharmaceutical health care and sciences*. **3**, 14 (2017).
81. Appiah-Opong, R., Commandeur, J. N., van Vugt-Lussenburg, B., & Vermeulen, N. P. Inhibition of human recombinant cytochrome P450s by curcumin and curcumin decomposition products. *Toxicology*. **235**, 83–91 (2007).
82. Shamsi, S., Tran, H., Tan, R. S., Tan, Z. J., & Lim, L. Y. Curcumin, Piperine, and Capsaicin: A Comparative Study of Spice-Mediated Inhibition of Human Cytochrome P450 Isozyme Activities. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. **45**, 49–55 (2017).

83. Bamba, Y., Yun, Y. S., Kunugi, A., & Inoue, H. Compounds isolated from *Curcuma aromatica* Salisb. inhibit human P450 enzymes. *Journal of natural medicines*. **65**, 583–587 (2011).
84. Volak, L. P., Hanley, M. J., Mase, G., Hazarika, S., Harmatz, J. S., Badmaev, V., Majeed, M., Greenblatt, D. J., & Court, M. H. Effect of a herbal extract containing curcumin and piperine on midazolam, flurbiprofen and paracetamol (acetaminophen) pharmacokinetics in healthy volunteers. *British journal of clinical pharmacology*. **75**, 450–462 (2013).
85. Hsieh, Y. W., Huang, C. Y., Yang, S. Y., Peng, Y. H., Yu, C. P., Chao, P. D., & Hou, Y. C. Oral intake of curcumin markedly activated CYP 3A4: in vivo and ex-vivo studies. *Scientific reports*. **4**, 6587 (2014).
86. Kim, S. B., Cho, S. S., Cho, H. J., & Yoon, I. S. Modulation of Hepatic Cytochrome P450 Enzymes by Curcumin and its Pharmacokinetic Consequences in Sprague-dawley Rats. *Pharmacognosy magazine*. **11**, S580–S584 (2015).
87. Lykkesfeldt, J., Michels, A. J., & Frei, B. Vitamin C. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*. **5**, 16–18 (2014).
88. Du, J., Cullen, J. J., & Buettner, G. R. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et biophysica acta*. **1826**, 443–457 (2012).
89. Chen, Y., Curran, C. P., Nebert, D. W., Patel, K. V., Williams, M. T., & Vorhees, C. V. Effect of vitamin C deficiency during postnatal development on adult behavior: functional phenotype of Gulo^{-/-} knockout mice. *Genes, brain, and behavior*. **11**, 269–277 (2012).
90. NZIP.cz: národní zdravotnický informační portál - *Vitamin C*. Dostupné z URL: <<https://www.nzip.cz/clanek/1142-vitamin-c-kyselina-askorbova>> [cit. 18. 4. 2024].
91. Příbalový-leták.cz. *C-Vitamin 1000 Pharmavit – příbalový leták*. Dostupné z URL: <<https://www.pribalovy-letak.cz/815-c-vitamin-1000-pharmavit>> [cit. 24. 2. 2024].
92. Santos, K. L. B., Bragança, V. A. N., Pacheco, L. V., Ota, S. S. B., Aguiar, C. P. O., & Borges, R. S. Essential features for antioxidant capacity of ascorbic acid (vitamin C). *Journal of molecular modeling*. **28**, 1 (2021).
93. Aditi, Anupam, and David Y Graham. “Vitamin C, gastritis, and gastric disease: a historical review and update.” *Digestive diseases and sciences* vol. **57**, 2504-15 (2012).
94. Njus, D., Kelley, P. M., Tu, Y. J., & Schlegel, H. B. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free radical biology & medicine*. **159**, 37–43 (2020).
95. Frei, B., & Lawson, S. Vitamin C and cancer revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**, 11037–11038 (2008).
96. Tveden-Nyborg, P., & Lykkesfeldt, J. Does vitamin C deficiency increase lifestyle-associated vascular disease progression? Evidence based on experimental and clinical studies. *Antioxidants & redox signaling*. **19**, 2084–2104 (2013).
97. Englard S, Seifter S. The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu Rev Nutr*. **6**, 365– 406 (1986).
98. Ozer, A., & Bruick, R. K. Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one?. *Nature chemical biology*. **3**, 144–153 (2007).

99. Kivirikko, K. I., & Prockop, D. J. Enzymatic hydroxylation of proline and lysine in procollagen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **57**, 782–789 (1967).
100. Kallio, P. J., Wilson, W. J., O'Brien, S., Makino, Y., & Poellinger, L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *The Journal of biological chemistry*. **274**, 6519–6525 (1999).
101. Bruick, R. K., & McKnight, S. L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science (New York, N.Y.)*. **294**, 1337–1340 (2001).
102. Mikirova, N. A., Ichim, T. E., & Riordan, N. H. Anti-angiogenic effect of high doses of ascorbic acid. *Journal of translational medicine*. **6**, 50 (2008).
103. Chung, T. L., Brena, R. M., Kolle, G., Grimmond, S. M., Berman, B. P., Laird, P. W., Pera, M. F., & Wolvetang, E. J. Vitamin C promotes widespread yet specific DNA demethylation of the epigenome in human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. **28**, 1848–1855 (2010).
104. Widschwendter, M., Fiegl, H., Egle, D., Mueller-Holzner, E., Spizzo, G., Marth, C., Weisenberger, D. J., Campan, M., Young, J., Jacobs, I., & Laird, P. W. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nature genetics*. **39**, 157–158 (2007).
105. Verma M. Cancer control and prevention by nutrition and epigenetic approaches. *Antioxidants & redox signaling*. **17**, 355–364 (2012).
106. Diliberto, E. J., Jr, & Allen, P. L. Semidehydroascorbate as a product of the enzymic conversion of dopamine to norepinephrine. Coupling of semidehydroascorbate reductase to dopamine-beta-hydroxylase. *Molecular pharmacology*. **17**, 421–426 (1980).
107. Moritz, B., Schmitz, A. E., Rodrigues, A. L. S., Dafre, A. L., & Cunha, M. P. The role of vitamin C in stress-related disorders. *The Journal of nutritional biochemistry*. **85**, 108459, (2020).
108. Lykkesfeldt, J., & Tveden-Nyborg, P. The Pharmacokinetics of Vitamin C. *Nutrients*. **11**, 2412 (2019).
109. Buettner G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Archives of biochemistry and biophysics*. **300**, 535–543 (1993).
110. Lykkesfeldt, J., Loft, S., Nielsen, J. B., & Poulsen, H. E. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid as biomarkers of oxidative stress caused by smoking. *The American journal of clinical nutrition*. **65**, 959–963 (1997).
111. Bánhegyi, G., Braun, L., Csala, M., Puskás, F., & Mandl, J. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free radical biology & medicine*. **23**, 793–803 (1997).
112. Dresser, G. K., Wachter, V., Wong, S., Wong, H. T., & Bailey, D. G. Evaluation of peppermint oil and ascorbyl palmitate as inhibitors of cytochrome P4503A4 activity in vitro and in vivo. *Clinical pharmacology and therapeutics*. **72**, 247–255 (2002).
113. V. V. Shumyantseva, A. A. Makhova, T. V. Bulko. The effect of antioxidants on electrocatalytic activity of cytochrome P450 3A4. *Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. **7**, 160-164 (2013).
114. Hagen, N., Olsen, A. K., Andersen, J. V., Tjørnellund, J., & Hansen, S. H. Characterization of mixtures of recombinant human cytochrome p450s as a screening model for metabolic stability in drug discovery. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. **32**, 749–759 (2002).

115. van Heeswijk, R. P., Cooper, C. L., Foster, B. C., Chauhan, B. M., Shirazi, F., Seguin, I., Phillips, E. J., & Mills, E. Effect of high-dose vitamin C on hepatic cytochrome P450 3A4 activity. *Pharmacotherapy*. **25**, 1725–1728 (2005).
116. Tarasub, N., Junseecha, T., Tarasub, C., & Na Ayutthaya, W. D. Protective Effects of Curcumin, Vitamin C, or their Combination on Cadmium-Induced Hepatotoxicity. *Journal of basic and clinical pharmacy*. **3**, 273–281 (2012).
117. Hasan Khudhair, D., Al-Gareeb, A. I., Al-Kuraishy, H. M., El-Kadem, A. H., Elekhrawy, E., Negm, W. A., Saber, S., Cavalu, S., Tirla, A., Alotaibi, S. S., & Batiha, G. E. Combination of Vitamin C and Curcumin Safeguards Against Methotrexate-Induced Acute Liver Injury in Mice by Synergistic Antioxidant Effects. *Frontiers in medicine*. **9**, 866343. (2022).
118. Chen, L., Hu, C., Hood, M., Zhang, X., Zhang, L., Kan, J., & Du, J. A Novel Combination of Vitamin C, Curcumin and Glycyrrhizic Acid Potentially Regulates Immune and Inflammatory Response Associated with Coronavirus Infections: A Perspective from System Biology Analysis. *Nutrients*. **12**, 1193 (2020).
119. Bors, W., Michel, C., & Schikora, S. Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study. *Free radical biology & medicine*. **19**, 45–52 (1995).
120. Naksuriya, O., & Okonogi, S. Comparison and combination effects on antioxidant power of curcumin with gallic acid, ascorbic acid, and xanthone. *Drug discoveries & therapeutics*. **9**, 136–141 (2015).
121. Liu, Y., Wang, Y., Song, S., & Zhang, H. Cancer therapeutic strategies based on metal ions. *Chemical science*. **12**, 12234–12247 (2021).
122. Yu, S. P., Canzoniero, L. M., & Choi, D. W. Ion homeostasis and apoptosis. *Current opinion in cell biology*. **13**, 405–411 (2001).
123. Hu, H., Xu, Q., Mo, Z., Hu, X., He, Q., Zhang, Z., & Xu, Z. New anti-cancer explorations based on metal ions. *Journal of nanobiotechnology*. **20**, 457 (2022).
124. Weyh, C., Krüger, K., Peeling, P., & Castell, L. The Role of Minerals in the Optimal Functioning of the Immune System. *Nutrients*. **14**, 644 (2022).
125. Wierzejska R. E. Dietary Supplements-For Whom? The Current State of Knowledge about the Health Effects of Selected Supplement Use. *International journal of environmental research and public health*. **18**, 8897 (2021).
126. Zhang, F. F., Barr, S. I., McNulty, H., Li, D., & Blumberg, J. B. Health effects of vitamin and mineral supplements. *BMJ (Clinical research ed.)*. **369**, 2511 (2020).
127. Mah, J., & Pitre, T. Oral magnesium supplementation for insomnia in older adults: a Systematic Review & Meta-Analysis. *BMC complementary medicine and therapies*. **21**, 125 (2021).
128. Wang, R., Chen, C., Liu, W., Zhou, T., Xun, P., He, K., & Chen, P. The effect of magnesium supplementation on muscle fitness: a meta-analysis and systematic review. *Magnesium research*. **30**, 120–132 (2017).
129. Mocchegiani, E., Romeo, J., Malavolta, M., Costarelli, L., Giacconi, R., Diaz, L. E., & Marcos, A. Zinc: dietary intake and impact of supplementation on immune function in elderly. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. **35**, 839–860 (2013).
130. Pardo, M. R., Garicano Vilar, E., San Mauro Martín, I., & Camina Martín, M. A. Bioavailability of magnesium food supplements: A systematic review. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*. **89**, 111294 (2021).

131. Jahnen-Dechent, W., & Ketteler, M. Magnesium basics. *Clinical kidney journal*. **5**, 3–14 (2012).
132. Payandeh, J., Pfoh, R., & Pai, E. F. The structure and regulation of magnesium selective ion channels. *Biochimica et biophysica acta*. **1828**, 2778–2792 (2013).
133. Příbalový-leták.cz. *Magnesium 250 mg Pharmavit – příbalový leták*. Dostupné z URL: <<https://www.pribalovy-letak.cz/310-magnesium-250-mg-pharmavit>> [cit. 24. 2. 2024].
134. NZIP.cz: národní zdravotnický informační portál – *Hořčík*. Dostupné z URL: <<https://www.nzip.cz/clanek/1148-horcik>> [cit. 18. 4. 2024].
135. Castiglioni S. Editorial of Special Issue "Magnesium in Human Health and Disease". *Nutrients*. **13**, 2490 (2021).
136. Maggini, S., Pierre, A., & Calder, P. C. Immune Function and Micronutrient Requirements Change over the Life Course. *Nutrients*. **10**, 1531 (2018).
137. Eghbaliferiz, S., & Iranshahi, M. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. *Phytotherapy research*. **30**, 1379–1391 (2016).
138. Maret, W., & Sandstead, H. H. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements*. **20**, 3–18 (2006).
139. Weyh, C., Krüger, K., Peeling, P., & Castell, L. The Role of Minerals in the Optimal Functioning of the Immune System. *Nutrients*. **14**, 644 (2022).
140. Bray, T. M., & Bettger, W. J. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free radical biology & medicine*. **8**, 281–291 (1990).
141. Jomova, K., & Valko, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. **283**, 65–87 (2011).
142. Prasad A. S. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. **12**, 646–652 (2009).
143. NZIP.cz: národní zdravotnický informační portál – *Zinek*. Dostupné z URL: <<https://www.nzip.cz/clanek/1152-zinek>> [cit. 18. 4. 2024].
144. Walmark *Zinek forte 25 mg, doplněk stravy – příbalový leták*. Dostupné z URL: <<https://www.walmark.cz/p/zinek-25-mg-forte>> [cit. 24. 2. 2024].
145. Dixit, V. A., Warwicker, J., & de Visser, S. P. How Do Metal Ions Modulate the Rate-Determining Electron-Transfer Step in Cytochrome P450 Reactions? *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. **26**, 15270–15281 (2020).
146. Manna, S. K., & Mazumdar, S. Reversible inactivation of cytochrome P450 by alkaline earth metal ions: auxiliary metal ion induced conformation change and formation of inactive P420 species in CYP101. *Journal of inorganic biochemistry*. **102**, 1312–1321 (2008).

147. Yamazaki, H., Ueng, Y. F., Shimada, T., & Guengerich, F. P. Roles of divalent metal ions in oxidations catalyzed by recombinant cytochrome P450 3A4 and replacement of NADPH-cytochrome P450 reductase with other flavoproteins, ferredoxin, and oxygen surrogates. *Biochemistry*. **34**, 8380–8389 (1995).
148. Kim, J. S., Ahn, T., Yim, S. K., & Yun, C. H. Differential effect of copper (II) on the cytochrome P450 enzymes and NADPH-cytochrome P450 reductase: inhibition of cytochrome P450-catalyzed reactions by copper (II) ion. *Biochemistry*. **41**, 9438–9447 (2002).
149. Kim, J. S., & Yun, C. H. Inhibition of human cytochrome P450 3A4 activity by zinc(II) ion. *Toxicology letters*. **156**, 341–350 (2005).
150. Lindström-Seppä, P.; Koivusaari, U. a Hänninen, O.: Metabolism of foreign compounds in freshwater crayfish (*Astacus astacus* L.) tissues. *Aquatic Toxicology*. **3**, 35–46 (1983).
151. tivorová, M., Dračínská, H., Martínek, V., Svášková, D., Hodek, P., Milichovský, J., Hejduková, Ž., Brotánek, J., Schmeiser, H. H., & Frei, E. Induced expression of cytochrome P450 1A and NAD(P)H:quinone oxidoreductase determined at mRNA, protein, and enzyme activity levels in rats exposed to the carcinogenic azo dye 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I). *Chemical research in toxicology*. **26**, 290–299 (2013).
152. Zamaratskaia, G., & Zlabek, V. EROD and MROD as Markers of Cytochrome P450 1A Activities in Hepatic Microsomes from Entire and Castrated Male Pigs. *Sensors*. **9**, 2134–2147 (2009).
153. Kandel, S. E., Han, L. W., Mao, Q., & Lampe, J. N. Digging Deeper into CYP3A Testosterone Metabolism: Kinetic, Regioselectivity, and Stereoselectivity Differences between CYP3A4/5 and CYP3A7. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. **45**, 1266–1275 (2017).
154. Guengerich, F. P., Martin, M. V., Sohl, C. D., & Cheng, Q. Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Nature protocols*. **4**, 1245–1251 (2009).
155. Riddick, D. S., Ding, X., Wolf, C. R., Porter, T. D., Pandey, A. V., Zhang, Q. Y., Gu, J., Finn, R. D., Ronseaux, S., McLaughlin, L. A., Henderson, C. J., Zou, L., & Flück, C. E. NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase: roles in physiology, pharmacology, and toxicology. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. **41**, 12–23 (2013).
156. Suresh, D., & Srinivasan, K. Influence of curcumin, capsaicin, and piperine on the rat liver drug-metabolizing enzyme system in vivo and in vitro. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. **84**, 1259–1265 (2006).
157. Padayatty, S. J., & Levine, M. Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral diseases*. **22**, 463–493 (2016).
158. Colvin, R. A., Holmes, W. R., Fontaine, C. P., & Maret, W. Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics : integrated biometal science*. **2**, 306–317 (2010).
159. Gagandeep, Kumar, P., Kandi, S. K., Mukhopadhyay, K., & Rawat, D. S. Synthesis of novel monocarbonyl curcuminoids, evaluation of their efficacy against MRSA, including ex vivo infection model and their mechanistic studies. *European journal of medicinal chemistry*. **195**, 112276 (2020).