

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra biochemických věd**

**VLIV FLAVONOIDŮ NA METABOLISMUS  
XENOBIOTIK**

**Rigorózní práce**

Vedoucí rigorózní práce: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Hradec Králové, 2009

Mgr. Anna Smetanová

*Ráda bych poděkovala Doc. Ing. Barboře Szotákové Ph.D. za odborné vedení, ochotu a všestrannou pomoc. Děkuji také Mgr. Veronice Křížové za významnou spolupráci při pokusech a získané informace a paní Aleně Pakostové za kultivaci buněčných linií. Chtěla bych poděkovat celé katedře za možnost zde pracovat na této práci a používat špičkové vybavení katedry.*

## OBSAH

1. ÚVOD .....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1. BUNĚČNÉ KULTURY .....	9
2.1.1. Vývoj a definice .....	9
2.1.2. Kultivační podmínky .....	9
2.1.3. Primární kultury a buněčné linie.....	11
2.2. FLAVONOIDY A ISOFLAVONOIDY.....	12
2.2.1. Epidemiologie.....	14
2.2.2. Antikarcinogeneze .....	16
2.2.3. Biologická dostupnost a metabolismus .....	16
2.2.4. Potenciální mechanismy inhibice rakoviny.....	18
2.2.4.1. Estrogenní a antiestrogenní aktivita .....	18
2.2.4.2. Antiproliferativní účinnost.....	19
2.2.4.3. Přerušení buněčného cyklu a apoptóza .....	19
2.2.4.4. Antioxidační účinky .....	19
2.2.4.5. Indukce detoxikačních enzymů.....	20
2.2.4.6. Regulace hostitelských imunitních funkcí.....	21
2.3. ABSORPCE A METABOLISMUS POLIFENOLŮ .....	21
2.3.1. Absorpce polyfenolů přes gastrointestinální bariéru.....	22
2.3.2. Metabolismus polyfenolů .....	23
2.3.3. Biologická dostupnost polyfenolů a jejich účinky.....	24
2.4. VLIV PŘIJÍMANÝCH FLAVONOIDŮ NA XENOBIOTIKA A METABOLISMUS KARCINOGENŮ .....	25
2.4.1. Vliv flavonoidů na cytochrom P450 .....	26
2.4.1.1. Cytochrom P4501 .....	26
2.4.1.2. Cytochrom P4503A4.....	27
2.4.2. Účinek flavonoidů na enzymy 2. fáze biotransformace .....	28
2.4.2.1. UDP-glukuronosyl transferasa .....	28
2.4.2.2. Glutathion-S-transferasa .....	29
2.4.2.3. Sulfotransferasa.....	30
2.4.3. Problémy s předvídaním <i>in vivo</i> metabolických účinků u lidí.....	31
2.5. ZDRAVOTNÍ DOPAD NADMĚRNÉHO PŘÍJMU FLAVONOIDŮ .....	31
2.5.1. Mutagenita a genotoxicita flavonoidů.....	33
2.5.2. Flavonoidy jako inhibitory topoisomerasy .....	33
2.5.3. Efekt flavonoidů na produkci thyreoidálních hormonů.....	34

2.6.	METABOLICKÁ AKTIVACE KARCINOGENNÍCH HETEROCYKlickÝCH AROMATICKÝCH AMINŮ.....	35
3.	CÍL PRÁCE.....	38
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	39
4.1.	MATERIÁL, PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ, POMŮCKY, CHEMIKÁLIE.....	39
4.1.1.	Materiál.....	39
4.1.2.	Přístroje a zařízení.....	39
4.1.3.	Pomůcky.....	39
4.1.4.	Chemikálie.....	40
4.2.	METODIKA.....	40
4.2.1.	Kultivace buněčných linií.....	40
4.2.1.1.	Pasážování adherentních buněk.....	41
4.2.1.2.	Zmrazení buněčné linie pro dlouhodobé uchování v tekutém dusíku.....	42
4.2.1.3.	Rozmrazení buněčné linie dlouhodobě uchované v tekutém dusíku.....	42
4.2.2.	Test cytotoxicity – Neutral Red uptake test.....	43
4.2.2.1.	Ředění buněčné suspenze na požadovanou hustotu buněk.....	43
4.2.2.2.	Pracovní postup.....	44
4.2.2.3.	Příprava expozičních roztoků, roztoku neutrální červeně, fixačního a lyzačního roztoku.....	44
4.2.3.	Měření indukce a inhibice metodou EROD/MROD.....	45
5.	VÝSLEDKY.....	47
5.1.	CYTOTOXICITA RUTINU, KVERCETINU, IQ A MEIQX PRO BUNĚČNOU LINII LS174T.....	47
5.1.1.	Rutin.....	49
5.1.2.	Kvercetin.....	51
5.1.3.	IQ.....	53
5.1.4.	MelQx.....	54
5.2.	VLIV RUTINU, KVERCETINU, IQ A MEIQX NA AKTIVITU CYP1A V BUNĚČNÉ LINII LS174T.....	56
5.2.1.	Rutin.....	56
5.2.2.	Kvercetin.....	57
5.2.3.	IQ.....	59
5.2.4.	MelQx.....	60
5.3.	POROVNÁNÍ VLIVU RUTINU, KVERCETINU, IQ A MEIQX S VLIVEM $\beta$ -NF A TCDD NA AKTIVITU CYP1A V BUNĚČNÉ LINII LS174T.....	62

5.4.	VLIV POČTU BUNĚK NA JAMKU A URČENÍ VHODNÉ KONCENTRACE INDUKTORU $\beta$ -NF A MC U HCT-8 BUNĚČNÉ LINIE .....	63
5.5.	CYTOTOXICITA RUTINU, KVERCETINU, IQ A MEIQX PRO BUNĚČNOU LINII HCT-8.....	65
5.5.1.	Rutin.....	66
5.5.2.	Kvercetin .....	67
5.5.3.	IQ .....	68
5.5.4.	MeIQx.....	69
5.6.	POROVNÁNÍ VLIVU RUTINU, KVERCETINU, IQ A MEIQX S VLIVEM $\beta$ -NF NA AKTIVITU CYP1A V BUNĚČNÉ LINII HCT-8 .....	70
6.	DISKUSE .....	71
7.	ZÁVĚR.....	75
8.	ZKRATKY .....	76
9.	SEZNAM LITERATURY .....	77

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra biochemických věd

Titul, jméno, příjmení kandidáta: Mgr. Anna Smetanová

Titul, jméno, příjmení školitele: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Název rigorózní práce: **Vliv flavonoidů na metabolismus xenobiotik**

Flavonoidy jsou široce rozšířené sekundární metabolity rostlin s protektivním účinkem proti rakovině. Jedním z protektivních mechanismů účinku je modulace biotransformačních enzymů. Xenobiotika - heterocyklické aromatické aminy jsou látky potenciálně karcinogenní, které vznikají při běžné domácí přípravě masa a ryb. Prvním biotransformačním krokem heterocyklických aromatických aminů je aktivace prokarcinogenů na aktivní *N*-hydroxy metabolity cytochromem P4501A2 (CYP1A2). Bylo by žádoucí, kdyby flavonoidy vhodným způsobem modulovaly enzymovou aktivitu, aby byly eliminovány nežádoucí účinky heterocyklických aromatických aminů.

V této práci jsme zjišťovali vliv flavonoidů rutinu a kvercetin a heterocyklických aromatických aminů 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]chinolinu (IQ) a 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]chinoxalinu (MeIQx) na aktivitu CYP1A v buněčné linii LS174T a HCT-8. Rutin, kvercetin, IQ a MeIQx nebyly pro buňky cytotoxické do koncentrace 50  $\mu$ M. Kvercetin byl ve vyšších koncentracích cytotoxický. Kvercetin je toxičtější pro buněčnou linii LS174T v nižších koncentracích než pro buněčnou linii HCT-8.

Nedošlo k ovlivnění 7-ethoxyresorufin-*O*-dealkylační (EROD) ani 7-methoxyresorufin-*O*-dealkylační (MROD) aktivity CYP1A koncentracemi do 50  $\mu$ M rutinu, kvercetin a MeIQx v buněčné linii LS174T ani HCT-8. IQ zvýšil množství resorufinu v EROD testu 1,6krát proti kontrole a 1,2krát v MROD testu proti kontrole v buněčné linii LS174T. V buněčné linii HCT-8 nebyl EROD ani MROD test ovlivněn těmito látkami.

Přestože nedošlo k ovlivnění aktivity CYP1A působením flavonoidů a heterocyklických aromatických aminů ve zvolených buněčných liniích, mohou se tyto látky navzájem ovlivňovat při metabolických přeměnách v organismu na úrovni 1. nebo 2. fáze biotransformace nebo na jiné farmakokinetické úrovni.

## ABSTRACT

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Biochemical Sciences

Title, Name, Surname of candidate: Mgr. Anna Smetanová

Title, Name, Surname of tutor: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Title of a rigorous work: **The influence of flavonoids on the metabolism of xenobiotics**

Flavonoids are wide spread plant secondary metabolites with the protective effect against the cancer. One of the protective mechanisms of action is the modulation of the biotransformation enzymes. Xenobiotics - heterocyclic aromatic amines are presumably carcinogenic compounds generated during the ordinary cooking of meat and fish. The first metabolic step of the heterocyclic aromatic amines is the procarcinogen activation to the active *N*-hydroxy metabolites by cytochrome P4501A2 (CYP1A2). It would be desirable if the flavonoids in the appropriate manner modulate the enzymatic activity to eliminate the undesirable effects of the heterocyclic aromatic amines.

The aim of this study was to investigate the influence of the rutin and quercetin flavonoids and heterocyclic aromatic amines 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) on CYP1A activity in the cell line LS174T and HCT-8. Rutin, quercetin, IQ and MeIQx were not toxic for cells up to the concentration of 50  $\mu$ M. Quercetin was cytotoxic in higher concentrations. Quercetin is more toxic for the cell line LS174T in lower concentrations than for the cell line HCT-8.

Neither the 7-ethoxyresorufin-*O*-dealkylation (EROD) test nor the 7-methoxyresorufin-*O*-dealkylation (MROD) test affected CYP1A activity by the concentrations up to 50  $\mu$ M of rutin, quercetin and MeIQx in the cell lines LS174T and HCT-8. IQ increased the amount of resorufin in the EROD test 1,6-times comparing to the control and 1,2-times in the MROD test comparing to the control in the cell line LS174T. EROD and MROD tests in the cell line HCT-8 were not influenced by those compounds.

Even if no effect of interference of flavonoids and heterocyclic aromatic amines on the CYP1A activity in the selected cell lines was detected, those compounds can interfere during the metabolism inside the organism in phase 1 or 2 of biotransformation or on a different pharmacokinetic level.

## 1. ÚVOD

Zdraví je na prvním místě odjakživa, ale postoj jak se chovat, aby bylo zachováno nebo dosaženo, se mění. Dnes už záleží na úrovni vědomostí a rozvoji vědy. Vědeckých poznatků je obrovské množství, ale přesto jich není dost. Možná proto se stále více soustředí zájem na prevenci, jak nemocem předcházet. Snahou je zjistit co nemoci vyvolává a co proti tomu působí. Mnohé je dáno geneticky a mnohé způsobem života a výživou. Asi nejnáze lze ovlivnit výživu, i když vše souvisí se vším a musí se ke všemu přistupovat komplexně.

To, že jíst ovoce a zeleninu je zdravé, to se ví. Dokonce, že příjem ovoce a zeleniny snižuje riziko rakoviny, ukazují mnohé epidemiologické studie [1]. Důvodů a obsahových látek je mnoho, proč by tomu mohlo tak být. Rozšíření fenolových sloučenin – flavonoidů – v rostlinné říši, vede k jejich zkoumání i ke zkoumání toho, jakým dílem se na předcházení rakovině podílejí. Je známo několik mechanismů účinku, které by se mohly uplatňovat [1]. Flavonoidů je však velké množství a stejně jako s léky se s nimi provádějí studie na různých úrovních: subcelulární, buněčné, tkáňové i orgánové, na zvířecích modelech, buněčných kulturách i na lidech a velkých skupinách lidí. Snahou je získat všechna fakta o pohybu v organismu, přeměnách, účincích a ovlivnění organismu, případně dalších látek, které s organismem přijdou do styku.

Při běžné přípravě jídla někdy vznikají i škodlivé látky, jako jsou heterocyklické aromatické aminy [2]. Ideální by bylo, kdyby se dobře uvařené jídlo doplnilo zdravým zeleninovým nebo ovocným salátem a tím by se škodlivé látky eliminovaly. Touto představou se řídila i tato práce, která se zaměřila na cytotoxicitu nejrozšířenějších flavonoidů rutinu a kvercetin a dvou heterocyklických aromatických aminů v buněčné kultuře LS174T a HCT-8 a ovlivnění aktivačních enzymů heterocyklických aromatických aminů - cytochromů P4501A - těmito látkami.



## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

### **2.1. BUNĚČNÉ KULTURY**

#### **2.1.1. Vývoj a definice**

Vývoj buněčných kultur započal již koncem 19. století a v průběhu 20. století byly techniky zajišťující přežití a růst buněk odebraných jedinci postupně zdokonalovány. Za otce tkáňových kultur je považován Ross Harrison, který v roce 1907 na základě svých experimentů dokázal, že buňky jsou schopné přežívat a zachovávat si své charakteristické schopnosti i v prostředí *in vitro*, a stanovil obecnou techniku pro tkáňové kultury, která byla nadále zdokonalována [3]. V roce 1951 byla Georgem Geyem vyvinuta první lidská nádorová linie HeLa, která je dosud značně používána [4, 5]. V současnosti jsou k dispozici buněčné linie prezentující většinu lidských nádorů. Buněčné kultury slouží ke studiu biochemických a molekulárně biologických procesů v normálních i nádorových buňkách.

Buněčnou kulturou se rozumí kultura tvořená nesloučenými buňkami. Spolu s orgánovými kulturami (tvořené celistvou tkání) jsou řazeny mezi tkáňové kultury. Počáteční kultura odebraná od jedince je nazývána primární kulturou, pasážírováním (ředěním) lze získat buněčnou linii. Jsou rozlišovány tzv. nesmrtelné buněčné linie, u nichž není počet dělení omezen, a konečné linie, jejichž buňky snesou jen omezený počet dělení [6].

#### **2.1.2. Kultivační podmínky**

Pro růst určité buněčné kultury musí být zajištěny požadované podmínky. Živiny jsou buňkám poskytovány prostřednictvím média s přídavkem nebo bez přídavku séra. Dále je nezbytné udržovat teplotu, pH, množství oxidu uhličitého a kyslíku v určeném rozmezí.

Dnes běžně používaná syntetická média vznikala v 50. letech 20. století. Tato základní média obsahují aminokyseliny, sacharidy, vitamíny a soli. Sérum a další složky, jako růstové faktory a hormony, jsou přidávány do základních médií, aby výsledné složení bylo optimální pro buněčný růst. pH média musí být upraveno na hodnotu ideálně kolem 7,4 [6].

Jako jedno z prvních médií bylo vytvořeno BME (basal medium) zásluhou Harryho Eagla, který usiloval o získání média vhodného pro normální i rakovinové buňky [7]. Toto médium bylo následně modifikováno, čímž vzniklo velké množství dodnes používaných médií. Jedním z nich je DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) obsahující 4krát vyšší koncentraci aminokyselin a vitamínů a 4,5krát vyšší koncentraci glukózy [8]. Mezi média obsahující širokou paletu komponent patří Médium 199, které vyvinul Morgan a spol. v roce 1950 [9].

Přidání séra do média podporuje růst buněk v kultuře. Sérové proteiny zahrnují hormony, růstové faktory, transportní proteiny, enzymové kofaktory atd [10]. Poměr jednotlivých složek séra se mění s věkem a zdravotním stavem zvířete, z tohoto důvodu jsou nejčastěji používána séra získaná z plodů a nově narozených telat. Dále jsou používána lidská a koňská séra. Koncentrace séra v médiu se pohybuje v závislosti na typu kultivovaných buněk od 5 do 20%. Vyšší koncentrace zpravidla přináší jen malý profit ve srovnání s narůstající cenou.

Přídavek séra do média přináší i řadu nevýhod. Poměr složek séra je v jednotlivých dodávkách rozdílný. Tyto rozdíly ve složení mohou vést ke změnám v řadě parametrů jako růst buněk, vazebnost a další. Ačkoli jsou séra kontrolována na obsah kontaminant, jsou v nich často přítomny virové partikule. Z těchto důvodů a se zohledněním ceny a větší reprodukovatelnosti studie byla vyvinuta média s přesně definovaným složením, bez nutnosti přídavku séra [6]. Jedna ze strategií, kterou prosazoval Sato s kolektivem, bylo přidání specifických složek (hormony, vazebné proteiny, lipidy, stopové prvky atd.) do základního média. Druhá strategie podporovaná Hamem a kolektivem spočívá ve zvyšování koncentrace složek bazálního média. Sato při svých experimentech identifikoval některé faktory, které mají značný význam pro růst mnoha typů buněk v médiu [10, 11]. Jedná se o insulin, transferrin, seleničnany, epidermální růstový faktor, hydrokortison, sérový albumin a fibronectin. Mezi komponenty, které mají význam pro specifické buněčné linie patří fibroblastový růstový faktor, estrogen, glukagon, prostaglandiny a trijodthyronin. Hamova laboratoř vyvinula sérii médií MCDB, která poskytují definované a optimálně vyvážené prostředí podporující růst specifických typů buněk (např. MCDB 201 pro keratinocyty, MCDB 110 pro fibroblasty) [12].

Pro růst a diferenciaci většiny typů rakovinových buněk v kultuře je nutná interakce s podkladem. Výjimku tvoří hematopoetické nádorové linie a malé buňky rakoviny plic, které preferují růst v suspenzi buď jednotlivě nebo ve shlucích. Většina nádorových linií tedy roste v monovrstvě na plastovém nebo skleněném podkladu. Nejrozšířenějším plastem je polystyren, dále polytetrafluorethylen. Adhezi buněk lze zvýšit potažením podkladu složkami extracelulární matrix. Často využívanými

extracelulárními proteiny jsou kolagen, fibronectin a laminin. Pěstování buněk v monovrstvě je často nejjednodušší způsob kultivace, na druhé straně množství informací, které poskytuje růst buněk uvnitř kolagenové matrix v 3D prostoru, je větší, jelikož dochází k morfoloické a biochemické diferenciaci [13].

Pro optimální buněčný růst je důležité udržovat fyzikální podmínky v určitém rozmezí. Pro většinu savčích buněčných kultur je vhodná teplota  $36,5^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Při nižších teplotách jsou ještě schopny růst, ovšem při teplotách kolem  $40^{\circ}\text{C}$  rapidně hynou. Kultivační média obsahují pufrovací systémy, které vyžadují přítomnost  $\text{CO}_2$  v atmosféře, obvykle 5%. Většina nádorových buněk vyžaduje pH okolo 7,2-7,4. Jelikož dochází k postupnému okyselování média vlivem vedlejších produktů dýchání, je nutné médium pravidelně měnit (též z důvodu vyčerpání živin). Jednoduchou vizuální kontrolu pH zajišťuje fenolová červeň přidávaná do média. Vlhkost je důležitým faktorem ovlivňujícím vypařování vody z média, což vede ke zvyšování koncentrace solí. Vysoká koncentrace solí může způsobit lýzu buněk, proto musí být osmolalita média udržována v poměrně úzkém rozmezí [6].

### **2.1.3. Primární kultury a buněčné linie**

Primární kultura získaná z daného jedince reprezentuje situaci v původní tkáni. Primárním materiálem může být jednak fragment tkáně v celku přiložený k substrátu nebo materiál získaný z nádorové tkáně, který je možné mechanicky nebo enzymaticky rozštěpit na jednotlivé buňky či jejich shluky. Běžně používané enzymy jsou trypsin a kolagenáza. Během kultivace může dojít postupně ke ztrátě heterogenity buněk, což může být v některých případech výhodné. Pokud v kultuře převládá typ buněk, který je pro další experimenty zajímavý, je vznik homogenní populace žádoucí. Pro vývoj buněčné linie je potom nutné, aby vznikla zcela homogenní populace. Nevýhodou je ztráta rozmanitosti mnohobuněčného nádoru s následnou absencí klíčových intracelulárních interakcí [6].

Buněčná linie může vzniknout jednak z primární kultury obsahující buňky se schopností neomezeného počtu dělení, nebo musí být buňky primární kultury transformovány. Transformaci lze vyvolat chemickou cestou nebo použitím viru. Význam buněčných linií spočívá ve schopnosti sloužit jako obnovitelný zdroj buněčného materiálu pro opakující se studie. Buněčné linie mohou sloužit jako modely pro zkoumání vlastností nádorů, z nichž byly získány, např. genotypu a fenotypu, genetické exprese, citlivosti vůči lékům atd. [14].

S vzrůstajícím počtem pasáží může docházet ke ztrátě určitých rysů. Z důvodu zajištění obnovitelného zdroje buněčného materiálu lze buněčnou linii opakovaně zmrazovat s různým počtem pasáží [6].

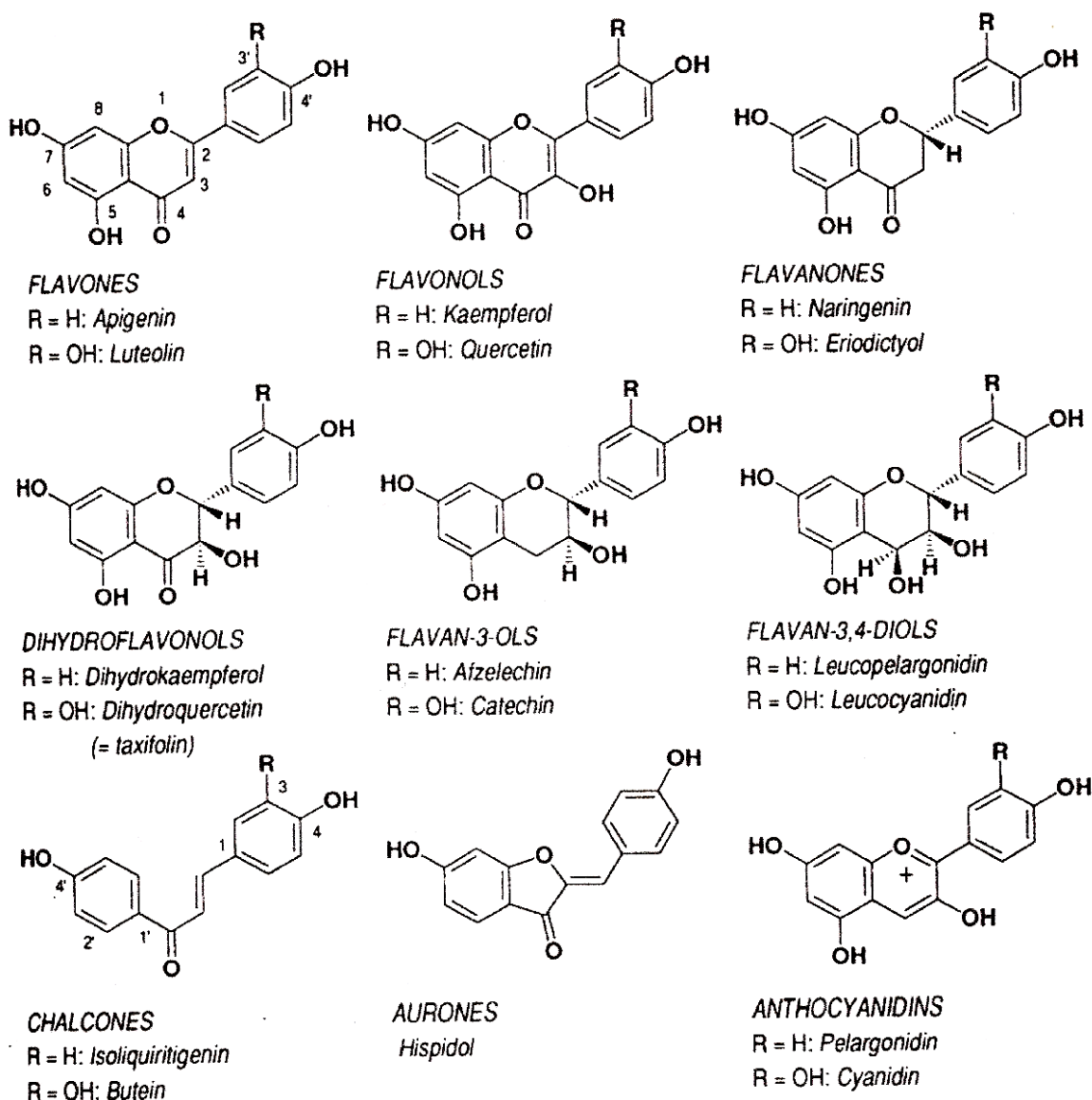
Během kultivace prochází buněčná linie několika dobře definovanými fázemi růstu. Z počátku musí buňky rostoucí v monovrstvě přisednout k podkladu, navíc pokud byly podrobeny disagregaci působením proteolytických enzymů, potřebují čas pro reparaci, proto kultura roste relativně pomalu. Tento stav je nazýván lag fází. Poté dochází působením produkovaných růstových faktorů ke zvýšení počtu dělicích se buněk. Růst kultury je často exponenciální a mluvíme o log fázi. Pokud buňky pokryjí celý povrch podkladu, dochází ke zpomalení růstu kultury, je dosaženo tzv. saturační hustoty, která je pro buněčnou linii za daných podmínek charakteristická. Tato fáze je označena jako fáze plató. Přičemž bylo vyzorováno, že čím déle setrvávají buňky ve fázi plató před pasážováním, tím delší je následující lag fáze.

V současnosti je k dispozici velké množství buněčných linií, přesto stále vznikají nové. Je nutné zvážit, zda je výhodné vyvíjet novou buněčnou linii, když obdobná je již běžně dostupná. Mnoho linií je dobře charakterizováno a nově získaná data mohou být porovnáována s existující literaturou týkající se této linie. V některých situacích je samozřejmě vývoj nové buněčné linie žádoucí, např. v případě, že pro určitý typ nádoru není dostupná žádná nebo neúplně charakterizovaná buněčná linie. Vývoj nové nádorové linie je vhodný též, pokud došlo ke vzniku rezistence nádoru na nové léčivo [15].

## **2.2. FLAVONOIDY A ISOFLAVONOIDY**

Flavonoidy jsou rostlinné sekundární metabolity [1], velmi široce rozšířené nejen ve dvouděložných rostlinách [16]. Flavonoidy jsou chemicky definovány jako sloučeniny s fenylochromanovou strukturou (C6-C3-C6) s připojením aromatického substituentu v poloze C2 chromanového cyklu a jedním nebo více hydroxylovými substituenty nebo jejich deriváty. Lze je rozdělit do několika základních strukturních skupin [1] viz. Obr. 1. Isoflavonoidy mají také fenylochromanovou strukturu, ale připojení vedlejšího aromatického substituentu je v poloze C3 chromanového cyklu [17]. Flavonoidy a isoflavonoidy se obvykle vyskytují jako estery, ethery nebo glykosidy, případně mix těchto derivátů a zahrnují přes 8000 sloučenin. Průměrný lidský příjem flavonoidů ve Velké Británii a USA je 20 mg až 1g za den [1]. Může ale dosáhnout i několika gramů při příjmu doplňků stravy s rostlinnými preparáty jako gingo biloba,

pyknogenol nebo extrakt z grepových jader [18]. Tyto sloučeniny jsou obsaženy v ovoci, zelenině, léčivých bylinách (např. *Gingo biloba*, *Silybum marianum*, *Hypericum perforatum*), zrní, oříchách, čaji, kávě, červeném víně [1], kole, kakau a pivě [18]. Mají řadu biologických účinků, jako např. snižují a odstraňují lomivost kapilár, brání šíření toxinů tkáněmi, jsou podpůrnými prostředky při léčení infekčních nemocí a jiné. Snad nejrozšířenější flavonoid je kvercetin, má oranžově-hnědou barvu a nalezne se skoro všude: chmel, čaj, česnek, plody kaštanu a jinde [19]. Je také nejrozšířenějším flavonoidem v potravě a jeho příjem se pohybuje v rozmezí 4 až 68 mg denně v USA, Evropě a Asii. Jsou mu připisovány antivirové, protizánětlivé, antiproliferativní a antibakteriální účinky. Nachází se ve vysokých koncentracích v běžně konzumovaném jídle jako je cibule, jablka, kapusta, červené víno a zelený a černý čaj [18]. Je aglykonem celé řady velice důležitých glykosidů.



**Obr. 1:** Základní strukturální skupiny flavonoidů [16]

Terapeuticky významný flavonolový glykosid rutin (kvercetin-3-rhamnoglukosid) má název podle routy vonné, ze které byl poprvé izolován. Nyní se získává nejvíce z pohanky (*Fagopyrum vulgare*), kde je v listech v množství cca 1%, a nebo z listů a pupenů stromu jerlín japonský (*Sochora japonica*), kde je obsažen zhruba ve 2%. Rutin je ale v celé řadě dalších rostlin, např. v černém rybízu či v oplodí pomerančů. Používá se k léčení hemoragií, alergií, hypertenze a při infekčních onemocněních. Ve větších dávkách vyvolává závratě a zduření jazyka se zvýšeným sliněním [19].

Flavonoidy a isoflavonoidy mohou hrát významnou roli v prevenci proti rakovině, protože se vyskytují v mnohých rostlinách, které jsou spojovány s pozitivními účinky proti rakovinnému bujení. Humánní epidemiologická data vycházejí ze studii, kdy jídlo bohaté na flavonoidy nebo isoflavonoidy je spojováno s mírou rakoviny. Byly poznány některé mechanismy účinku flavonoidů a isoflavonoidů: estrogenní a antiestrogenní účinek isoflavonoidů, antiproliferativní účinek, přerušení buněčného cyklu a apoptóza, prevence oxidativních změn, indukce detoxikačních enzymů, ovlivnění imunitního systému a změny v buněčné signalizaci. Předpokládá se, že se ukáže, že některá kombinace těchto mechanismů je zodpovědná za prevenci proti rakovině.

Epidemiologické studie ukazují nepřímou úměru mezi konzumací ovoce a zeleniny a rizikem rakoviny. Rostlinná strava obsahuje mnoho rozmanitých protirakovinných fytolátů s mnohými potenciálními účinky. Mezi nimiž flavonoidy a isoflavonoidy jsou nadějnými kandidáty v prevenci rakoviny [1].

### **2.2.1. Epidemiologie**

Z epidemiologických dat vyplývá význam příjmu rostlinné stravy ve snížení rizika rakoviny. Protože se flavonoidy a isoflavonoidy nacházejí v určitém jídle, studie vztahující specifická jídla k výskytu rakoviny byly použity k vytvoření hypotézy o významu flavonoidů a isoflavonoidů v rakovinové prevenci. Takových studií, však není mnoho [1]. Jedna studie, která trvala 25 let, vztáhla pět flavonoidů (kvercetin, kaempferol, myricetin, apigenin a luteolin) k úmrtí na rakovinu zažívacího a respiračního traktu. V této studii pocházely flavonoidy hlavně z čaje, jablek a cibule. Hertog et al. publikovali výsledky, které ukázaly nejen nepřímou úměru v příjmu ovoce a zeleniny a rizikem rakoviny zažívacího a respiračního traktu, ale i 25% snížení

úmrtlosti na koronární srdeční příhody. Snížení výskytu rakoviny zažívacího a respiračního traktu však nelze spojit pouze s flavonoidy, ale významný podíl měly i jiné látky obsažené v ovoci a zelenině [20]. Podobné studie jsou u lidí těžko reprodukovatelné, protože další látky v potravě mohou ovlivňovat výsledky této studie.

Isoflavonoidy se vyskytují mnohem omezeněji. Pouze sojové boby jsou hlavní surovinou pro potraviny bohaté na isoflavonoidy. Sojové boby jsou však bohatým zdrojem i jiných látek: trypsinu, zdraví prospěšných bílkovin, inositol fosfátu, saponinů a sfingolipidů. Všechny tyto látky mohou být zdraví prospěšné. Všechny tyto látky prokázaly tumor preventivní vlastnosti na zvířecích modelech. Protože se ukázala spojitost mezi dietou Japonců a Číňanů a nižším výskytem rakoviny (prsů, prostaty a tlustého střeva) proti Evropanům a Američanům, mnozí vědci to spojovali s příjmem sójové potravy u Japonců a Číňanů [1]. Denní příjem sójových proteinů v Asijské populaci je průměrně 20 až 80 g (20 – 240 mg isoflavonoidů) narozdíl od západního průměrného příjmu 1 až 3 g (1 – 9 mg isoflavonoidů) [18]. Mohou se však podílet i jiné faktory z diety Asiatů. Například se ukázalo, že čínské zelí má protektivní účinek proti rakovině žaludku. Naopak příjem fermentované a slané sojové pasty přispívá k výskytu rakoviny žaludku [1]. Koo publikoval studii, která ukazuje nižší výskyt rakoviny plic u Čínských žen z Hon Kongu, které konzumovaly čerstvé ovoce a ryby [21]. Nižší výskyt adenokarcinomu a rakoviny plic byl pozorován u lidí s vyšším příjmem zelené listové zeleniny, karotky, tofu, čerstvého ovoce a čerstvých ryb [1]. Rakovina prostaty se u Havajských mužů vyskytovala nejméně u těch, u nichž byla strava bohatá na rýži a tofu. Naopak konzumace mořských řas byla spojována se zvýšeným rizikem rakoviny prostaty [22]. Tyto studie v Asijské populaci ukazují, že sojové potraviny jako hlavní zdroj isoflavonoidů, jsou často spojovány se sníženým výskytem rakoviny, ale nemohou být považovány za jedinou ochrannou složku v dietě Asiatů. Navíc složení sojových bobů je komplexní a je těžké mluvit pouze o vlivu isoflavonoidů. Pouze ve studii Zhenga et al., kde byly měřeny isoflavonoidy v moči u žen v Šanghaji, lze mluvit o protektivním účinku isoflavonoidů proti rakovině prsu. Součet fenolů, všech isoflavonoidů a glycetinu, byl nižší v moči pacientek s rakovinou prsu oproti kontrole [23].

### 2.2.2. Antikarcinogeneze

Studie rakovinové prevence na experimentálních zvířatech a buněčných kulturách, hodnotí účinky široké škály flavonoidů a několika isoflavonoidů proti rakovině [1].

Citrusové flavonoidy hesperetin a naringenin, a flavonoidy baikalein, galangin, genistein a kvercetin na buňkách MDA-MB-435 (humánní buněčná linie odvozená od rakoviny prsu) prokázaly inhibici buněčné proliferace v kultuře a všechny z nich vykazovaly nízkou cytotoxicitu (>500 µg/ml na 50% mrtvých buněk). IC<sub>50</sub> (koncentrace, která inhibuje buněčnou proliferaci na 50%) byla nejnižší pro baikalein (5,9 µg/ml), střední pro kvercetin, hesperetin, naringenin a galangin (10,4 – 56,1 µg/ml) a nejvyšší pro genistein (140 µg/ml). Kombinace flavonoidů (1:1), se ukázala výhodná. K inhibici buněčné proliferace je možné použít nižší množství celkových flavonoidů (IC<sub>50</sub>, 4,7 – 9,2 µg/ml) [1].

Deschner et al. uvedli, že (0,5 - 5%) kvercetinu a (4%) rutinu v potravě, inhibuje hyperproliferaci a dysplasii a snižuje výskyt rakoviny tlustého střeva u myši vystavených účinku azoxymethanu [24, 25]. Zajímavé je, že glykosidovaná forma rutin je všeobecně méně účinná než kvercetin v prevenci rakoviny tlustého střeva [24].

Makita et al. sledovali inhibici chemicky naindukované rakoviny úst 4-nitrochinolin-1-oxidem u potkanů. Přijímali v potravě chalkon, 2-hydroxychalkon a kvercetin (500 mg/kg), buď během, nebo následně po osm týdnů po karcinogenu. Nádory potkanů byly redukovány všemi flavonoidy [26].

Jiný model karcinogeneze, která byla sledována s flavonoidy pro potenciálně preventivní efekt, byly 20-methylcholanthrenem vyvolané sarkomy u myši. Fibrosarkóm vyvolaný u myši byl inhibován kvercetinem a luteolinem (1%) v potravě, podávanými během iniciační nebo promoční fáze [27].

### 2.2.3. Biologická dostupnost a metabolismus

Flavonoidy a isoflavonoidy jsou špatně rozpustné ve vodě i v organických rozpouštědlech. Dokonce i ve svých nejlepších rozpouštědlech (ethanolu, methanolu a acetonitrilu), jsou jen velmi mírně rozpustné. Flavonoidy a isoflavonoidy se vyskytují v potravě většinou jako glykosidické konjugáty, které jsou lépe rozpustné ve vodě než jejich aglykony a vyžadují enzymatické odštěpení cukerné části savčími nebo mikrobiálními glykosidasami před vlastní absorpcí. Fenolická část těchto látek může



být konjugována UDP-glukuronosyl transferasami na glukuronidy nebo sulfottransferasami na sulfáty. Glukuronidové a sulfátové konjugáty jsou mnohem ochotněji transportovány v krvi a vylučovány žlučí nebo močí než původní aglykony. Spektrum konjugačních produktů je závislé na druhu a pohlaví. Tyto metabolity nemusí být nutně biologicky inertní, ale mohou být i méně toxické než forma aglykonu. Dokonce vzniklý konjugát může změnit účinek původní látky. *In vitro* sledování flavonoidů může být matoucí, pokud je mateřská látka metabolisována a její metabolity mají významný účinek.

Rozpustnost, metabolická cesta látek, daná endogenní a exogenní biotransformací a interakce s látkami z jiných potravin, to vše určuje biologickou dostupnost flavonoidů a isoflavonoidů. Absorpce kvercetin u ileostomických pacientů ukázala třikrát vyšší vstřebání (52% z podané dávky) glykosidické formy z cibule než stejné dávky aglykonu kvercetin nebo kvercetin rutinosidu (17% a 24% z podané dávky). Množství vyloučeného kvercetin močí po třinácti hodinách bylo  $\leq 0,3\%$  z podané dávky. To, že skoro všechen absorbovaný kvercetin zůstal v těle, značí, že bude mít dlouhý eliminační poločas. Kvercetin glykosid se vylučuje rychleji (22 hod eliminační poločas) než kvercetin rutinosid (28 hod eliminační poločas) [1]. Poločas eliminace je neobvykle dlouhý, což je způsobeno pravděpodobně silnou vazbou na plazmatické bílkoviny [28]. Jiná studie ukázala, že maximální koncentrace v plazmě kvercetin a kvercetin glykosidu, hlavního flavonolu z cibule, byla dosažena po 1,5 – 2 hodinách po podání. Eliminace močí však po 24 hodinách po podání byla  $< 1\%$  z podané dávky. Tato omezená data naznačují, že flavonoidy budou asi pro lidi mnohem méně biologicky dostupné než jsou isoflavonoidy [1].

Další studie, která změřila metabolity v moči po příjmu rutinu u lidí, zjistila až devět metabolitů po 24 hodinách. U dobrovolníků s neporušeným tlustým střevem a bez ileostomie, se zjistilo, že metabolity rutinu kyseliny: 3,4-dihydroxyphenylová, 3-methoxy-4-hydroxyphenyloctová a 3-hydroxyphenyloctová se objevily v moči v množství 22% z příjmu [29].

Jedna studie sledovala průchod rutinu ze střev do krve u potkanů. Asi 10% působícího rutinu se objevilo v krvi: nejvíce volného rutinu (5,6%), částečně jako rutin sulfát (2,5%) a rutin glukuronid (2,0%). Konjugáty se přednostně absorbovaly do cév, jen minimum glukuronidu (0,2%) bylo nalezeno ve střevním lumen a malé množství (1,1%) se nacházelo ve střevní tkáni [30]. Jiná studie na potkanech upozornila, že vazba rutinu a kvercetin ke střevní stěně může významně ovlivnit absorpci z tenkého střeva [31].

Po perorálním podání flavonoidů a isoflavonoidů jsou dosaženy mikromolární koncentrace v plazmě u lidí. Biologický účinek těchto látek by měl být sledován, pokud bude dosaženo této úrovně.

Aktivita i biologická dostupnost flavonoidů a isoflavonoidů, může být také pozměněna biotransformací střevní mikroflórou [1]. Koncentrace polyfenolů v tlustém střevě vzhledem k jejich omezené resorpci v tenkém střevě může dosáhnout vysokých hodnot, řádově v  $\text{mmol.l}^{-1}$  a může působit preventivně proti vzniku kolorektálního karcinomu [28].

#### **2.2.4. Potenciální mechanismy inhibice rakoviny**

##### **2.2.4.1. Estrogenní a antiestrogenní aktivita**

Estrogenní aktivita isoflavonoidů byla prvně zmíněna v roce 1940, kdy jetel pastviný bohatý na isoflavonoidy byl odpovědný za infertilitu ovcí v západní Austrálii. Ukázalo se, že genistein, daidzein a formononetin jsou estrogenní agonisté na různých zvířecích modelech. Běžné flavonoidy mají také estrogenní aktivitu [1]. Miksicek seřadil flavonoidy a isoflavonoidy dle estrogenní aktivity do tohoto pořadí: genistein > kaempferol > narigenin > apigenin > daidzein > biochanin A > formononetin > luteolin > fisetin > katechin > hesperetin [32]. Některé vlastnosti sojových isoflavonoidů, jako prevence osteoporózy, zlepšení menopauzálních symptomů, a snížení hladiny cholesterolu, mohou vycházet z estrogenního účinku. Estrogenní účinek všech zmíněných isoflavonoidů i flavonoidů je extrémně slabý  $10^3 - 10^5$ krát slabší než  $17\text{-}\beta\text{-estradiolu}$ . Ale cirkulující koncentrace aglykonů isoflavonoidů mohou být až stokrát vyšší než estradiolu. Isoflavonoidy a flavonoidy mohou působit antiestrogeně v závislosti na hladině přirozených estrogenů. Mohou tak působit kompetitivní inhibicí vazbou na estrogenní receptor. Afinita aglykonu těchto látek k estrogennímu receptoru je 0,05 – 1% vazebné afinity  $17\text{-}\beta\text{-estradiolu}$ . Navzdory slabé estrogenní aktivitě i slabé afinitě k estrogennímu receptoru mohou se isoflavonoidy i flavonoidy významně uplatnit v prevenci rakoviny svým antiestrogením mechanismem účinku [1]. Mohou také inhibovat enzymy zahrnuté do metabolismu estrogenů [18].

#### **2.2.4.2. Antiproliferativní účinnost**

Neregulovaný růst je charakteristický pro neoplasie. Rakovinová prevence je obvykle spojována s inhibicí, reverzí nebo retardací buněčné hyperproliferace. Je známo, že potravinové flavonoidy a isoflavonoidy se chovají jako inhibitory buněčného růstu. Jednou z jejich biologických vlastností v rostlinách je ve skutečnosti zvyšování odolnosti proti mykotickému a bakteriálnímu růstu jako fytoalexiny [1]. Přestože se většina flavonoidů a isoflavonoidů zdá být netoxická k lidem a zvířatům, ukázalo se, že inhibují proliferaci v mnoha různých humánních rakovinových buněčných liniích [33, 34]. Lee et al. publikovali, že kvercetin s  $IC_{50}$  10  $\mu$ M ireverzibilně inhiboval proliferaci lymfocytů indukovanou concanavalinem-A na myších [35]. Je mnoho studií, které prokazují antiproliferativní účinek flavonoidů a isoflavonoidů *in vitro* na buněčných liniích, ale málo *in vivo* studií. Prakticky nic se neví o klinické významnosti této biologické aktivity [1].

#### **2.2.4.3. Přerušení buněčného cyklu a apoptóza**

Pozorované antiproliferativní účinky flavonoidů a isoflavonoidů ukazují, že tyto látky mohou inhibovat buněčný cyklus nebo indukovat apoptózu. Přerušení buněčného cyklu bylo pozorováno ve fázi G1/S a G2/M v rakovinových buněčných liniích [1]. Například kvercetin (30 – 100  $\mu$ M) přerušil buněčný cyklus ve fázi G1/S v linii COLO320 DM střevních buněk [36] a leukemických T-buňkách [37] a spustil apoptózu. Kvercetin vyvolal apoptózu v množství 50  $\mu$ M nebo vyšším v několika rakovinových buněčných liniích [38]. Výsledky Wanga et al. naznačují, že flavonoidy mohou být více účinné v kontrole růstu nádorů vzniklých mutací [39].

#### **2.2.4.4. Antioxidační účinky**

Flavonoidy a isoflavonoidy mohou chránit proti rakovině a kardiovaskulárním chorobám inhibicí oxidativního poškození. Oxidace DNA může být významná příčina mutace, která potenciálně může být redukována potravinovými antioxidanty. Chemická struktura konjugovaného kruhu a hydroxylových skupin flavonoidů a isoflavonoidů může působit jako antioxidanty a vylučovat superoxidový anion, volný kyslík,

lipidperoxy-radikály a stabilizovat volné radikály zapojené v oxidativních procesech. Flavonoidy samy dostanou volné radikály v tomto procesu, ale jejich konjugovaná struktura dovolí, aby zbylé orbitalové elektrony byly relativně inaktivní. Ukázalo se, že antioxidantní aktivita flavonoidů závisí na počtu a pozici hydroxylových skupin [1]. Dvě hydroxylové skupiny na aromatickém substituentu lépe vychytávají volné radikály než jedna [40]. Kvercetin a myricetin měly ochranný účinek v Caco-2 buňkách proti oxidativnímu účinku peroxidu vodíku. Navíc kvercetin zmírnil inhibici růstu způsobenou peroxidem vodíku. Rutin ani kaempferol však tyto účinky neprokázaly. Ketokonazol bránil ochrannému účinku kvercetinu v Caco-2 buňkách, což ukazuje, že metabolická přeměna přes CYP může ovlivnit účinnost flavonoidů proti oxidativnímu poškození DNA [41].

Flavonoidy inhibují oxidaci LDL lipoproteinů. Zvýšená oxidace LDL je spojována s nemocemi koronárních artérií. Zvýšený příjem fenolických flavonoidů z červeného vína ve francouzské populaci potvrzuje protektivní účinek proti kardiovaskulárním nemocem [42].

#### **2.2.4.5. Indukce detoxikačních enzymů**

Dalším potenciálním mechanismem prevence proti rakovině může být indukce enzymů 2. fáze biotransformace v buňkách. Modifikace buněčných detoxikačních enzymů může být hlavním mechanismem předcházení toxickému efektu karcinogenů [43, 44, 45]. Mnohé prokarcinogeny vyžadují metabolickou aktivaci pro svoji plnou karcinogenní formu. Jsou často metabolisovány na přímé karcinogeny enzymy 1. fáze, cytochromem P450, který katalyzuje oxidační reakce. Oxidované metabolity potenciálních karcinogenních xenobiotik jsou dále detoxikovány ve 2. fázi biotransformace na formu relativně inertní a mnohem snadněji vylučitelnou. Indukce konjugačních enzymů může ovlivňovat práh chemické karcinogeneze a tím zvýšit buněčnou rezistenci vůči působení karcinogenu. Ideální podmínky pro prevenci aktivace karcinogenů jsou inhibice 1. fáze metabolismu a indukce 2. fáze metabolismu [1].

#### 2.2.4.6. Regulace hostitelských imunitních funkcí

Role hostitelských imunitních funkcí získává stále větší význam v pochopení mechanismů, které jsou zahrnuty v prevenci rakoviny. Zvýšení hostitelských imunitních funkcí potravinovými antioxidanty může být prospěšné v prevenci rakoviny. Protože fagocytující buňky produkují reaktivní kyslík jako část boje proti infekci, je požadován adekvátní příjem antioxidantů pro prevenci poškození imunitních buněk samotných vznikajícími oxidanty. Zdá se, že systém buněčné imunity není nijak ovlivněn flavonoidy, pokud jsou imunitní buňky v klidu, ale pokud jsou aktivovány fyziologickým stimulem, začne se tvořit látka citlivá k flavonoidům a interakce flavonoidů s touto látkou dramaticky ovlivní výsledek aktivačního procesu. Byla pozorována stimulace nespecifické imunity, aktivace protilátek i zvýšení buněčné imunity isoflavonoidy u myši [1]. Zhang et al. pozorovali aktivaci NK buněk isoflavonoidy *in vitro* [46]. NK buňky (natural killer cells) jsou imunitní buňky s cytotoxickým působením, tzv. „přirození zabíječi“. Jsou schopné rozpoznat a ničit nádorové buňky nebo buňky napadené virem, aniž by poškodily zdravé buňky. Jsou třetí z řady bílých krvinek (T a B lymfocyty) [47].

### 2.3. ABSORPCE A METABOLISMUS POLYFENOLŮ

Vzhledem k širokému rozšíření a vysoké koncentraci v rostlinách, jsou polyfenoly běžnou součástí lidské potravy. Jsou nejrozšířenějšími sloučeninami s redukčním účinkem v naší potravě. Jejich denní příjem byl odhadnut na 1g a je tedy výrazně vyšší než je příjem antioxidantních vitamínů, jako jsou tokoferoly, karoteny nebo askorbová kyselina. Rovněž antioxidantní aktivity často předčí vitamíny nebo endogenní antioxidanty jako je např. kyselina močová [28].

Mají velkou strukturální různorodost, která významně ovlivňuje jejich biologickou dostupnost. Fenolické kyseliny jako kyselina kávová se lehce absorbují přes střevní bariéru, zatímco polyfenoly s velkou molekulovou hmotností jako proantokyanidiny se velmi málo absorbují. Jednou absorbované polyfenoly jsou konjugovány na glukuronidy, sulfáty a methylovány ve střevní sliznici a vnitřních tkáních. Nekonjugované polyfenoly se v plazmě nenacházejí. Tyto reakce umožňují jejich exkreci a určují potenciál toxicity. Polyfenoly, které se dostanou do tlustého

střeva, jsou značně metabolisovány mikroflórou na širokou škálu nízkomolekulárních fenolických kyselin. Biologické vlastnosti jak konjugátů, tak mikrobiálních metabolitů nejsou příliš prozkoumány. Možné je, že některé léčebné účinky polyfenolů nevyžadují jejich absorpci přes střevní bariéru.

Určitý typ polyfenolu může být zastoupen v jediném potravinovém zdroji nebo ve velkém počtu jídel. Tak například isoflavonoidy jsou pouze v sóje jako potravinovém zdroji, zato taniny dávají trpkost a hořkost různému ovoci, vínu, moštům a čaji, antokyany dávají barvu červenému ovoci, jako jsou jahody, černý rybíz, hroznové víno [40].

### **2.3.1. Absorpce polyfenolů přes gastrointestinální bariéru**

Nepřímým svědectvím o jejich absorpci přes gastrointestinální (GIT) bariéru je vzrůst antioxidační kapacity plazmy, ke které dojde po příjmu potravy bohaté na polyfenoly [48, 49, 50]. Vyloučené množství v moči po přijmutí daného množství určitého polyfenolu v potravě umožní porovnání biologické dostupnosti různých molekul. Takto Scalbert et al. porovnali některé polyfenoly a jejich množství v moči u lidí. Mezi flavonoidy se obzvláště málo vyloučí močí kvercetin a rutin (0,3-1,4%), ale mnohem vyšší množství (3-27%) katechinů ze zeleného čaje, isoflavonoidů ze sóji, flavanonů z citrusových plodů a anthokyanidinů z červeného vína. Nejvíce se vyloučí kyseliny kávové (27%) a nejméně theaflavinů z čaje [40]. Toto malé množství polyfenolů vyloučených močí nelze vysvětlit chemickou degradací v GIT. Některé fenolické sloučeniny jako kyselina kávová a kvercetin glykosidy se ukázaly být stabilní v žaludečních a střevních tekutinách [51, 52]. Polyfenolická struktura má hlavní vliv na střevní absorpci. Nejdůležitějšími strukturálními parametry, které ovlivňují absorpci jsou molekulová hmotnost, glykosidace a esterifikace. Vysoká molekulová hmotnost theaflavinů ( $M=568$ ) může vysvětlit jejich malé množství vyloučené močí. Jinou významnou skupinou o vysoké molekulové hmotnosti jsou proantokyanidiny, neboli polymerní flavonoidy, které se ve skutečnosti vůbec nevstřebávají [40]. Kromě katechinů a proantokyanidinů se většina flavonoidů vyskytuje v potravě v glykosidované formě a ta ovlivňuje absorpci přes GIT bariéru. Facilitovaná absorpce kvercetin glukosidů se může připisovat jejich hydrolýze laktasa-florizin-hydrolasou nebo cytoslickou  $\beta$ -glykosidasou v enterocytech [53]. Avšak takovýto usnadněný transport z glykosidů jako u kvercetinu však nebyl pozorován u jiných flavonoidů jako je narigenin a florizin.

Intestinální absorpce je také výrazně negativně ovlivněna esterifikací kyselinou galovou u katechinů. I kyselina chlorogenová jako esterifikovaná kyselina kávová je mnohem hůře vstřebatelná.

Většina potravinových polyfenolů je rychle eliminována močí i žlučí. Postprandiální pík je pozorován 1-2 hod po příjmu různých flavonolů a flavanolů, ale je opožděn pro isoflavonoidy a jiné polyfenoly, které se absorbují až po částečném rozpadu ve střevní mikroflóře. U rutinu je maximální koncentrace kvercetinu v plazmě dosaženo až za 9 hod po příjmu [40]. Pro většinu flavonoidů je eliminační poločas 1-2 hod a jejich hladina v plazmě rychle klesá. Udržování vysoké koncentrace v plazmě vyžaduje opakovaný příjem polyfenolů v čase, jako bylo pozorováno u dobrovolníků pijících čaj každé dvě hodiny [54].

Flavonoidy mohou být modulátory i substráty membránových transportních proteinů vázajících ATP, kde mohou působit jako inhibitory aktivního transportu ze střevního lumen a tím ovlivňovat biologickou dostupnost léčiv, biologicky aktivních součástí potravy nebo toxických látek v potravě. Takto může docházet k neočekávaným interakcím mezi flavonoidy a léky, flavonoidy a potravinami a flavonoidy a toxiny na úrovni aktivního transportu přes ATP vázající membránové transportní proteiny [55].

### **2.3.2. Metabolismus polyfenolů**

Polyfenoly jsou značně metabolisovány v tkáních, pokud jsou absorbovány přes GIT bariéru, nebo neabsorbovaná frakce a frakce vyloučená žlučí je metabolisována střevní mikroflórou. Všechny polyfenoly jsou konjugovány na O-glukuronidy, estery sulfátu a O-methyl ethers. K této konjugaci dochází už ve střevní sliznici. A jako u kvercetinu mohou být konjugáty vyloučeny zpět do střevního lumen nebo do krevního řečiště. Prakticky lze nalézt nekonjugované polyfenoly v plazmě pouze při použití farmakologických dávek, kdy jsou pravděpodobně konjugační cesty saturovány [40]. Tím, že jsou rychle konjugovány lze vysvětlit i rychlé vyloučení. Konjugáty mají částečně jiné biologické účinky než aglykony, ale doposud se o nich ví jen velmi málo, asi protože nejsou dostupné jako komerční standardy. Estery sulfátu a glukuronidy mají slabší antioxidační vlastnosti, ale stále brání oxidaci LDL *in vitro* [56]. Mnohé potravinové polyfenoly mají katecholovou skupinu ve své struktuře, která může být oxidována *in vivo* za vzniku toxických chinonů. Podobné chinony vzniklé z léků nebo endogenních estrogenů nebo katecholaminů mohou být toxické pro buňky,

protože mohou tvořit superoxidový radikál, nebo mohou reagovat s nukleofilními součástmi buňky [40]. Polyfenoly jako katechin, kvercetin, a kyselina kávová jsou však O-methylovány *in vivo* a díky této reakci nebyla pozorována karcinogenita kvercetinu *in vivo*, přestože vykazuje mutagenicitu *in vitro* [57].

Polyfenolové konjugáty, však mohou uplatnit svoji biologickou aktivitu po dekonjugaci na buněčné úrovni.

Když se polyfenoly dostanou do tlustého střeva, jsou značně metabolisovány mikroflórou. Flavonoidní glykosidy, jako rutin, které nejsou absorbovány ve vyšších částech intestinálního traktu, jsou zde hydrolysovány a aglykon absorbován. Flavonoidní glukuronidy, vyloučené žlučí, mohou být také hydrolysovány mikroflórou a vzniklý aglykon absorbován, a tak vstoupí do enterohepatálního cyklu. Aglykony jsou také dále metabolisovány na celou řadu aromatických kyselin nižších molekulárních hmotností, které jsou dobře absorbovány přes bariéru tlustého střeva. Proto je nejnižší absorpce polyfenolů v tenkém střevě. Nejvyšší může být, v závislosti na substrátech, které dosáhnou tlustého střeva a jsou mikrobiálně metabolisovány, zde. Protože zde je tkáň vystavena velkému množství absorbovatelných metabolitů [40].

### **2.3.3. Biologická dostupnost polyfenolů a jejich účinky**

Většina pokusů je prováděna s flavonoidy v jejich přirozené podobě. Biologické vlastnosti mikrobiálních metabolitů polyfenolů jsou jen velmi málo prozkoumány. Například byla pozorována inhibice agregace krevních destiček, působením 3,4-dihydroxyphenylové kyseliny a 4-hydroxyphenylové kyseliny, metabolitů, které byly více účinné, než jejich prekurzory rutin a kvercetin [58]. Eventuálně některé účinky polyfenolů nevyžadují absorpci přes střevní bariéru. Vysoká lokální koncentrace polyfenolů nalezená ve střevech, může mít přímý vliv na střevní sliznici a chránit ji proti oxidativnímu stresu nebo působení karcinogenů [59].

Polyfenoly také interagují s potravou. Například tvoří stabilní komplexy se železem a zabraňují jeho vstřebání. Proto je vhodné, aby populace citlivá k deficitu železa (novorozenci, děti a těhotné ženy) se vyhnula pití kávy a čaje současně s potravinami, které jsou zdrojem železa. Ukázalo se, že konzumace černého čaje může zvrátit endotelialní dysfunkci u pacientů s nemocí koronárních artérií. Tento účinek lze vysvětlit snížením biologické dostupnosti železa. Obdobný účinek na arteriální dysfunkci byl pozorován po intravenózní injekci deferoxaminu, chelatační látky pro železo, která snížila množství železa v séru [40].



## 2.4. VLIV PŘIJÍMANÝCH FLAVONOIDŮ NA XENOBIOTIKA A METABOLISMUS KARCINOGENŮ

Jedním z protektivních mechanismů flavonoidů proti rakovině je modulace enzymové aktivity a snížení karcinogenity xenobiotik. Mnoho přírodních flavonoidů ovlivňuje CYP, buď indukuje nebo inhibuje určité isoenzymy. Některé flavonoidy ovlivňují CYP přes vazbu na aryl hydrokarbonový receptor (AhR), kde působí jako AhR agonisti nebo antagonisti. Inhibice CYP enzymů zahrnuje CYP 1A1, 1A2, 2E1 a 3A4 a je většinou kompetitivní. Také byla pozorována inhibice aromatasy (CYP19), čímž klesá syntéza estrogenů a vzniká antiestrogenní efekt, významný u rakoviny prsu a prostaty. Aktivace enzymů 2. fáze biotransformace, jako je UDP-gukuronosyl transferasa a glutathion-S-transferasa, flavonoidy, zvýší detoxikaci karcinogenů a reprezentuje jeden z mechanismů antikarcinogenního účinku [60]. Některé flavonoidy (fisetin, galangin, kvercetin, kaempferol a genistein) představují nekompetitivní inhibitory sulfotransferasy 1A1, ty mohou representovat významný mechanismus chemoprevence sulfátovou konjugací indukované karcinogeneze [61].

Flavonoidy inhibují mnoho dalších enzymů jako:  $\beta$ -glukuronidasu, lipooxygenasu, cyklooxygenasu, monooxygenasu, thyroid peroxidasu, xanthin oxidasu, mitochondriální sukcinyl oxidasu a NADH-oxidasu, fosfodiesterasu, fosfolipasu A<sub>2</sub>, protein kinasu C [60], tyrosin protein kinasu a topoisomerasu II [18]. Klíčové enzymy v metabolismu xenobiotik jsou však cytochrom P450 a enzymy 2. fáze metabolismu.

Účinek flavonoidů na enzymy je však závislý na koncentraci a druhu flavonoidu. Kvůli nízké biologické dostupnosti bývá koncentrace flavonoidů nízká a nemusí dosahovat hodnot sledovaných *in vitro*. Záleží také na tkáňové distribuci enzymů a na druhu zvířete použitého pro testy, protože rozdíly v enzymové aktivitě mezi různými druhy mohou být také zásadní. Navíc se u lidí uplatňují interindividuální rozdíly v biotransformačních enzymech dané genetickými faktory a faktory prostředí. Tyto rozdíly v xenobiotika metabolisujících enzymech a vliv přijatého flavonoidu na enzymovou výbavu a aktivitu, může přispět k rozdílné vnímavosti jedinců k takovým nemocem, jako je rakovina. Flavonoidy rovněž mohou interagovat s chemoterapeutiky použitými v léčbě rakoviny, přes indukci a inhibici enzymů, kterými jsou metabolisovány [60].

### 2.4.1. Vliv flavonoidů na cytochrom P450

Cytochromy P450 (enzymy 1. fáze biotransformace) jsou dobře známé pro svou roli v metabolismu léčiv a jiných cizorodých látek. Modulace těchto enzymů může ovlivnit metabolismus xenobiotik a vyvolat účinek farmakologického nebo toxikologického významu. Mnoho flavonoidů moduluje CYP, indukuje nebo inhibuje specifické CYP isoenzymy [60]. Už Wattenberg et al. před 40 lety popsali jiný modulační efekt flavonoidů *in vitro* a *in vivo* [62]. Mnohé karcinogeny jsou metabolisovány CYP enzymy na své biologicky inaktivní metabolity nebo na chemicky reaktivní elektrofilní metabolity, které se kovalentně váží k DNA. Reaktivní metabolity mohou projít dalšími metabolickými přeměnami enzymy 1. nebo 2. fáze na inaktivní produkty. Proto indukce enzymů 1. nebo 2. fáze biotransformace může znamenat snížení i zvýšení detoxikace karcinogenů. Přestože mnohé chemické karcinogeny jsou metabolisovány CYP enzymy jak na inaktivní tak i na karcinogenní metabolity, účinek induktorů těchto enzymů na karcinogenitu chemikálií bude závislý na indukčním efektu na rozdílné metabolické cesty. Ve studiích na zvířatech je popisováno, že induktory CYP obvykle snižují karcinogenitu chemických karcinogenů *in vivo*. Nabízí se, že indukce 1. i 2. fáze detoxikační cesty může mít větší význam než jen indukce CYP, která zahrnuje i vznik karcinogenních metabolitů [63].

#### 2.4.1.1. Cytochrom P4501

CYP1 rodina zahrnuje 1A1, 1A2 a 1B1 členy, kteří jsou schopni aktivovat prokarcinogeny. CYP1A1 a 1B1 jsou zapojeny v biotransformaci polycyklických aromatických uhlovodíků, chemikálií všudypřítomných v prostředí, na karcinogenní metabolity. Tento proces se pravděpodobně podílí na rakovině plic, protože zvýšená plicní exprese a aktivita CYP1A1 je spojována se zvýšeným rizikem k rakovině plic [60]. Zvýšená aktivita CYP1A1 je také spojována s kolorektálním karcinomem [64]. CYP1A2 především metabolisuje důležité léky jako fenacetin, theophylin, kofein, imipramin a propranolol [65], ale také aktivuje některé prokarcinogeny na karcinogeny. CYP1A2 hraje roli v humánních, na tabáku závislých neoplasiích [66]. CYP1A1 je spoře exprimován v lidských játrech, ačkoli jeho syntéza může být znatelně indukována v mnohých extrahepatálních tkáních, významně zejména v plicích. Naproti tomu CYP1A2 je hlavně zastoupen v játrech. CYP1B1 je extrahepatální estradiol 4-hydroxylasa, která aktivuje prokarcinogeny a zvýšená hladina je spojována

s estrogenní karcinogenezí [60]. Normální humánní prsní i prsní rakovinová tkáň jsou známé expresí CYP1B1, který produkuje karcinogenní 4-hydroxyestrogen. Inhibice CYP1B1 ovlivní produkci mutagenních estrogen-3,4-katecholů [67].

Indukce CYP1A flavonoidy je možná různými mechanismy. Přímá stimulace genové exprese přes specifický receptor nebo CYP protein nebo přes stabilizaci mRNA. Některé flavonoidy indukují CYP přes vazbu na AhR, ligandem aktivovaný transkripční faktor, a působí obdobně jako 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Základním substrátem pro AhR jsou planární aromatické sloučeniny s několika objemnými substituenty. A flavonoidy mají podobnou planární strukturu. Jiné flavonoidy inhibují aktivitu CYP1A1 kompetitivní inhibicí [60]. Nejčastěji se vyskytující flavonoidy kvercetin a kaempferol jsou oba ligandy AhR, ale mají rozdílný efekt na expresi CYP1A1. Buněčná linie MCF-7 byla vystavena působení kvercetinu a výsledkem bylo na koncentraci a čase závislé vzrůstající množství CYP1A1 mRNA. Aktivita CYP1A1 byla měřena 7-ethoxyresorufin-O-dealkylační (EROD) zkouškou. Zvýšení EROD aktivity následovalo po zvýšení CYP1A1 mRNA. Kaempferol sám neovlivňuje CYP1A1 expresi, ale interaguje s AhR a působí jako antagonist TCDD vyvolané CYP1A1 transkripce. Přes strukturální podobnost mezi kvercetinem a kaempferolem, jejich rozdílný efekt může být způsoben chybějící hydroxylovou skupinou na B kruhu kaempferolu. Vazba kaempferolu může blokovat vazbu ligandu k AhR a tak inhibovat aktivitu i jiných ligandů jako je TCDD [68]. Kvercetin inhibuje CYP1A2 ( $IC_{50} = 7,5 \mu M$ ) [69]. Kvercetin sice zvýší množství CYP1A1 mRNA, naopak však významně inhibuje benzo(a)pyrenem naindukovanou CYP1A1 mRNA a proteinovou expresi v lidských HepG2 buňkách [70].

Skupina flavonoidů izolovaná z pryskyřice stromu *Dracena cinnabari* inhibovala CYP1A aktivitu v jaterních mikrosomech izolovaných z myší, kterým byl podáván TCDD. Pryskyřice se používá v lidové medicíně jako antiseptikum a antiulcerativní prostředek. Inhibiční potenciál klesá v řadě: galangin > 7-hydroxyflavon > kvercetin, chrysin, 2-hydroxychalkon > 4,6-dihydroxychalkon > homoisoflavany [71].

#### **2.4.1.2. Cytochrom P4503A4**

CYP3A je největší podrodina CYP enzymů vyskytujících se v lidských játrech a gastrointestinálním traktu. Účastní se z 50% metabolických přeměn léčivých látek, jakož i toxických a karcinogenních substancí [60]. Klinicky významná je inhibice třezalkou tečkovanou [69], nejběžněji užívanou bylinou ve Spojených státech. Jejími

hlavními složkami jsou: flavonoly, flavonol glykosidy a biflavony [72]. Obsažený kvercetin inhibuje také CYP3A4 [69]. Naopak studie Markowitze et al. na lidech popsaly indukci CYP3A4 závislou na dávkovacím režimu. Ukázalo se, že dlouhodobé (14 dní) užívání třezalky tečkované významně indukovalo aktivitu CYP3A4 (zjištěno podle změněné farmakokinetiky alprazolamu) [73]. Ale krátkodobé užívání nemělo účinek na CYP3A4 [74]. Počet a pozice hydroxylových skupin hrají důležitou roli v inhibičním účinku flavonů. Flavony, které mají více hydroxylových substituentů, mají silnější inhibiční účinek na CYP3A4 aktivitu než ty, co mají méně hydroxylových skupin. Inhibiční potenciál klesá v řadě: myricetin > kvercetin, morin > kaempferol > apigenin > flavon (se 6, 5, 4, 3, 0 hydroxylovými skupinami). Toto zjištění je v souladu se studií, kde schopnost flavonoidů inhibovat nebo stimulovat hydroxylaci benzo[a]pyrenu v lidských jaterních mikrosomech byla závislá na přítomnosti nebo absenci hydroxylových skupin [75].

#### **2.4.2. Účinek flavonoidů na enzymy 2. fáze biotransformace**

Aktivace enzymů 2. fáze biotransformace, jako je UDP-glukuronosyl transferasa (UGT) a glutathion-S-transferasa (GST) flavonoidy, vede k detoxikaci karcinogenů a představuje jeden z mechanismů jejich antikarcinogenního účinku. Některé práce uvádějí, že mnohé induktory enzymů 2. fáze, mají nebo získají během metabolické přeměny, elektrofilní akceptační schopnost pro Michaelovu reakci [76, 77]. Navíc potence induktorů koreluje s reaktivitou v Michaelově reakci [77]. Indukční potenciál akceptorů v Michaelově reakci je výrazně vyšší, pokud je(jsou) hydroxylový(é) substituent(y) v ortho-(ale ne jiné) poloze na aromatickém(ých) kruhu(zích) [78]. Mnohé flavonoidy obsahují takovéto centrum pro Michaelovu reakci ve své molekule, proto tato charakterizace může být převedena na jejich účinek na enzymy 2. fáze. Mezi rozpoznané potravinové flavonoidy, které působí jako induktory enzymů 2. fáze metabolických přeměn lze zařadit: kaempferol, flavonoidy z kapusty, flavonoidy z borůvek a brusinek a flavolignan silibinin [60].

##### **2.4.2.1. UDP-glukuronosyl transferasa**

Byla popsána výrazná indukce UGT1A1 flavonem chrysinem v lidských hepatálních buňkách HepG2 a na lidské intestinální linii Caco-2. Podobně byla

kvercetinem výrazně zvýšená UGT1A1 katalyzovaná glukuronidace. Tato indukční odpověď je vcelku specifická, protože UGT1A6, UGT1A9 a UGT2B7 nebyly ovlivněny chrysinem. A flavonoidy galangin a isorhamnetin, které indukují CYP1A1 neměly žádný vliv na UGT1A1 aktivitu. Takže indukční účinek na UGT1A1 není spjat s AhR receptorem [60]. Kvercetin také indukoval UGT1A1 asi dvojnásobně *in vivo*. Tyto výsledky byly zjištěny na promývaném proximálním jejunu, cibulovém a brokolicevým extraktem, dobrovolníků [79]. Flavon a kvercetin jsou slabé inhibitory estradiol 3-glukuronidace v testovaných koncentracích (5-100  $\mu\text{M}$ ) v lidských jaterních mikosomech [80]. Kvercetin podávaný dva týdny potkanům v koncentraci 1% (v/v) způsobil významné zvýšení UGT enzymové aktivity vůči 4-nitrofenolu v játrech a proximální a distální části tenkého střeva [81]. Kontrastní jsou však další tři studie, které tvrdí, že kvercetin neměl žádný účinek na hepatální UGT aktivitu. [82, 83, 84]. Tento rozdíl může být způsoben jinou dávkou nebo jinými rozdíly v průběhu experimentu. Například vyhladovění způsobuje rychlé snížení aktivity enzymů 2. fáze biotransformace [60], protože dojde k vyčerpání endogenních konjugačních činidel. Sun et al. naindukovali UGT vybranými flavonoidy (biochaninem A, diadzeinem, formononetinem, genisteinem, prunetinem, apigeninem, galanginem, kaempferolem, narigeninem a kvercetinem) v koncentraci 5  $\mu\text{M}$  v prostatické rakovinové linii LNCaP po šesti dnech působení. Každý z těchto flavonoidů zvýšil aktivitu testosteron-UGT, která konjuguje testosteron na testosteron glukuronid. Nejsilnějším induktorem byl biochanin A. Se stoupající glukuronidací testosteronu se významně snížila koncentrace prostatického specifického antigenu, prostatického rakovinného markru, který je na testosteronu závislý. Tímto způsobem může být modulace hormonálního metabolismu flavonoidy významná v prevenci a výskytu rakoviny prostaty [85].

#### **2.4.2.2. Glutathion-S-transferasa**

Lidské cytosolické GST tvoří rodinu enzymů, která se dělí do čtyř hlavních tříd:  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ , a  $\sigma$ . Katalyzují vazbu mnoha různých elektrofilů k thio skupině glutathionu, jsou součástí detoxikace kyslíkových radikálů a mají hlavní funkci ve vazbě a transportu velké škály škodlivých látek. GST také hrají významnou roli v detoxikaci karcinogenů [60]. Významná nepřímá úměra byla sledována mezi GST enzymovou aktivitou a výskytem rakoviny v gastrointestinálním traktu, což ukazuje na význam GST v prevenci rakoviny [86]. Ukázalo se, že kvercetin inhibuje lidskou placentární GST

(GSTP1-1) v závislosti na čase a koncentraci *in vitro*. K úplné inhibici dochází po 1hod působení 100  $\mu$ M kvercetinů nebo po 2 hod působení 25  $\mu$ M kvercetinů [87].

### 2.4.2.3. Sulfotransferasa

Cytosolické sulfotransferasy katalyzují sulfátovou konjugaci mnohých hormonů, neurotransmiterů a xenobiotik. Jsou zapojeny v 2. fázi detoxikace xenobiotik, ale i v inaktivaci endogenních látek jako jsou steroidní a thyreoidální hormony, katecholaminy a žlučové kyseliny [60]. Konjugačním činidlem je 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát. Vzniká silně ionizovaný organický sulfát, který je dobře rozpustný ve vodě [88]. V kontrastu s touto protektivní funkcí je také sulfátová konjugace klíčovým krokem k bioaktivaci premutagenů a prokarcinogenů. Sulfátovou konjugací aktivované karcinogeny jako hydroxymethylpolycyklické aromatické uhlovodíky, alylalkoholy, benzylalkoholy a *N*-hydroxylarylaminy jako sulfátové estery jsou elektrofilní, které se kovalentně vážou na nukleové kyseliny a jiné makromolekuly [60]. Flavonoidy se zdají být potenciálně chemopreventivní látky před karcinogenezí vyvolanou sulfátovou konjugací. Mnohé flavonoidy mají inhibiční účinek na sulfotransferasovou aktivitu. Flavonoidy (fisetin, galangin, kvercetin, myricetin, kaempferol, chrysin, apigenin a genistein) představují účinné inhibitory P-formy fenolsulfotransferasy (SULT1A1), která zprostředkovává sulfátovou konjugaci acetaminofenu a minoxidolu v cytosolu lidských jater [61]. Kvercetin, fisetin a galangin jsou tři až desetkrát silnějšími inhibitory SULT1A1 než myricetin, chrysin, apigenin a kaempferol. Flavonoidy daidzein, genistein, kvercetin, (+)-katechin, equol a flavon jsou nekompetitivní inhibitory humánní destičkové SULT1A1. S tím souhlasí pozorování, že jsou chabými substráty pro tyto enzymy [89]. Kvercetin byl nejsilnější inhibitor ( $IC_{50}$  60 nM). Genistein a daidzein inhibovaly SULT1A1 s  $IC_{50}$  500 a 600 nM [90].

Kvercetin inhibuje sulfátovou konjugaci resveratrolu v lidských játrech a duodenu *in vitro*. Resveratrol je polyfenolická sloučenina, která je obsažena ve víně v koncentraci 1 až 10  $\mu$ M. Má příznivé účinky proti rakovině a protektivní účinky na kardiovaskulární systém.  $IC_{50}$  kvercetinů byla 12 pM v játrech a 15 pM v duodenu pro inhibici sulfátové konjugace resveratrolu. Účinná inhibice sulfátové konjugace resveratrolu kvercetinem znamená, že látky obsažené v potravě mohou inhibovat sulfátovou konjugaci resveratrolu a tím zvyšovat jeho biologickou dostupnost [91].

Kvercetin také kompetitivně inhibuje sulfátovou konjugaci 17 $\beta$ -estradiolu v normálním lidském prsním epitelu [60].

### 2.4.3. Problémy s předvídáním *in vivo* metabolických účinků u lidí

Ukázalo se, že kvercetin inhibuje katalytickou aktivitu SULT1A1, při použití enzymů bez buněk *in vitro* s  $IC_{50}$  0,1  $\mu$ M. V neporušených buňkách lidské jaterní linie HepG2 účinnost kvercetinu jako inhibitoru SULT1A1 klesla na  $IC_{50}$  2,5  $\mu$ M. Tento rozdíl vznikl pravděpodobně značnou vazbou na plazmatické bílkoviny, malou membránovou permeabilitou kvercetinu a jeho metabolickou přeměnou na inaktivní metabolity [60].

Byla porovnána rifampicinem ovlivněná transkripce genů (enzymů, transportérů,...) v lidském tenkém střevě a v buněčné linii LS174T. Zjištěna byla pouze určitá shoda. Z dvaceti genů se zvýšenou transkripcí v lidském duodenu, byla zvýšená transkripce u čtrnácti v LS174T buňkách [92].

## 2.5. ZDRAVOTNÍ DOPAD NADMĚRNÉHO PŘÍJMU FLAVONOIDŮ

V dřívějších studiích byl pozorován mutagenní a genotoxický účinek flavonoidů při některých *in vitro* pokusech [93, 94]. Novější studie, které vyzvedly jejich antikarcinogenní a kardioprotektivní účinek, vyvolaly dramatické zvýšení jejich konzumace, jako doplňků potravy. Bohužel potenciálně toxický efekt nadměrného příjmu flavonoidů je ignorován. Ve vysokých dávkách mohou působit flavonoidy jako mutageny, pro-oxidanty, které tvoří volné radikály, a inhibovat klíčové enzymy metabolismu hormonů. Takto může nepříznivý účinek vysokých dávek flavonoidů převážit nad jejich prospěchem. Opatrnost je na místě při příjmu vyšším, než je běžné u typické vegetariánské diety.

Marketingové strategie firem, které vyrábějí doplňky potravy s flavonoidními koncentráty, často přehánějí jejich netoxický terapeutický účinek, který ani nebývá odůvodněný klinickými zkouškami. Navíc dávky v jejich preparátech mohou překračovat dávky z typické vegetariánské diety. Pokud se to spojí s lidskou přirozeností, že pokud málo je dobré, tak víc je ještě lepší, může u některých jedinců příjem dosáhnout extrémně vysokých dávek.

Genistein je považován za hlavní protirakovinovou složku v sóje, což je založeno na předpokládané *in vitro* aktivitě, která zahrnuje jeho schopnost inhibovat aktivitu topoisomerasy I a II, inhibovat fosforylaci tyrosinu, indukovat diferenciaci rakovinových buněčných linií a působit jako antagonistu estrogenů [18]. Další studie ukazují na inhibici angiogeneze v buňkách rakoviny prsu genisteinem, G<sub>2</sub>-M přerušení buněčného cyklu a apoptózu [95, 96].

Lignany se nacházejí v ovoci, zelenině, čaji a cereáliích, jako v lněném semínku. Lněná semena jsou bohatým zdrojem fytoestrogenů ligninu 2,3-bis(3-methoxy-4-hydroxybenzyl)butan-1,4-diolu, který je prekurzorem enterolaktonu a enterodiolu [18]. Lignany jsou známé svou antioxidantní aktivitou a jsou spojovány s redukcí aterosklerózy z hypercholesterolémie ze studie na krmených zvířatech [97]. Je poukázováno na slabou estrogení účinnost, ale vysokou afinitu k lidskému globulinu, který váže sexuální hormony. To může zvýšit odbourání estrogenů a přispět ke snížení rizika na hormonech závislé rakoviny. Toto zjištění vedlo ke zvýšení konzumace lněných semínek jako antikarcinogenního a kardioprotektivního činitele. Dlouhodobé doplňování estrogenických prostředků, jako jsou lněná semínka, však nebylo sledováno. A mohlo by se stát, že nadměrný příjem by mohl přispět k růstu estrogen dependentních nádorů a k feminizaci u mužů [18].

Metabolické studie na zvířatech ukázaly, že kvercetin je rychle přeměněn na nemutagení 3'-O-methylkvercetin. Z kinetických studií vyplynulo, že tuto reakci katalyzuje katechol-o-methyltransferasa a je inhibována homocysteinem v závislosti na koncentraci. Tak zvýšení homocysteinu může inhibovat katechol-o-methyltransferasu a metabolismus potenciálně mutageních flavonoidů [57].

*In vitro* studie demonstrují antioxidantní účinky flavonoidů čaje, a připisují tuto aktivitu kvercetinu a hlavnímu katechinu čaje epigalokatechin-3-galátu [18]. Vyrovnaná hladina všech katechinů v plazmě dosáhla 0,3  $\mu\text{M}$  po pěti šálcích černého čaje a 1  $\mu\text{M}$  po konzumaci pěti šálků zeleného čaje denně u dobrovolníků [54]. Epigalokatechin-3-galát má vysokou afinitu ke krevním proteinům a proto také dlouhý poločas [98]. Podobně byly sledovány intermolekulární vazby mezi albuminem a konjugáty kvercetinu ve studiích na zvířatech [99]. Proto je kvercetin pomalu eliminován z těla, protože cirkuluje jako kvercetin-albumin komplex. Tento dlouhý eliminační čas může dovolit těmto sloučeninám disociaci z krevních proteinů a interakci s buněčnými proteiny a DNA [18].

Studie na gravidních potkaních samicích, jimž byly podávány jodem značené syntetické flavonoidy, ukázala přestup přes hematoencefalickou bariéru plodu a kumulaci zde ve vyšší míře, než v matce. Dvacet čtyři hodin po příjmu matka vyloučila 60 – 70% flavonoidů, zatímco ještě 17% z podané dávky bylo stále v kompartmentu plodu. Toto poukazuje, že plod může být vystaven vysokým cirkulujícím hladinám flavonoidů, které mohou vyvolat toxické odpovědi, přestože jsou jinak neškodné pro matku [100].



### 2.5.1. Mutagenita a genotoxicita flavonoidů

Expozice mutagenu nebo premutagenu v potravě je považována za důležitý faktor v etiologii rakoviny. Ranné studie flavonoidů nejprve popisovaly mutagenitu kvercetin [93, 94]. Popsaly také inhibici mitochondriální sukcinyl oxidasy flavonoidy za biologického pH. Kvercetin, myricetin a kvercetagenin způsobily mitochondriální respirační kolaps a podstoupily autooxidaci, která vedla ke vzniku peroxidu vodíku, superoxidu a hydroxylradikálu [101]. Ačkoli potenciály většiny flavonoidních radikálů jsou nižší než superoxidových a alkylperoxy radikálů, jejich účinnost při vzniku lipidové peroxidace, DNA vazby a mutace může být biologicky významná. Inhibice mitochondriálních enzymů flavonoidy za vzniku aktivních kyslíkatých skupin při pH 7,5 může přispívat k jejich cytostatickému a cytotoxickému potenciálu, podobně jako při působení cytostatika adriamycinu.

Kvercetin může způsobit rozštěpení DNA přechodnou redukcí Cu(II) na Cu(I) a tvorbou kyslíkatých skupin, což je způsobeno interakcí funkčních skupin, které se dostanou do redoxního cyklu s těmito nebo jinými přechodnými kovy. Flavonoidy, které obsahují fenolické B kruhy, jako je narigenin a apigenin, mohou podstoupit na glutationu závislou pro-oxidaci i za absence přechodných kovů. Pro-oxidační a antioxidační aktivita flavonoidů je závislá na redoxních podmínkách biologického prostředí [18].

### 2.5.2. Flavonoidy jako inhibitory topoisomerasy

Cytotoxický potenciál mnoha flavonoidů může být způsoben jejich inhibiční aktivitou k topoisomerase II. Genistein, biochanin A, equol, myricetin a kvercetin jsou rozpoznané inhibitory topoisomerasy II, v nízkých koncentracích, podobné aktivity jako epipodophylotoxiny široce používané v onkologické terapii [102, 103]. Inhibitory topoisomerasy II působí hromadění enzym-DNA kovalentních meziproduktů, kterým se říká štěpné komplexy, které mohou vést k lézím dvoušroubovice DNA na konci, kde se váže topoisomerasa. Tyto zlomy tvoří shluky *MLL* genu. *MLL* gen lokalizovaný na chromosomu 11q23, byl identifikován jako nejběžnější místo zapojené v chromozomálních translokacích u pacientů se sekundární leukémií po chemoterapii inhibitory topoisomerasy II, jako je etoposid a adriamycin. Bylo také pozorováno, že skoro 80% všech dětí s leukémií nese gen *MLL*. Tento objev ukazuje, že 11q23 zlomy na *MLL* genu mohou nastat v děloze a mohou být spojeny s konzumací přirozeně se

vyskytujících inhibitorů topoisomerasy II matkou [18]. Tuto hypotézu podpořili Ross et al. epidemiologickou studií dětské leukémie. V této studii zvýšený příjem inhibitorů topoisomerasy II zvýšil riziko akutní myeloidní leukémie u dětí desetinásobně. Proto vysoký příjem flavonoidů matkou může být rizikovým faktorem pro dětskou leukémii [104].

Rozdílné cesty v metabolismu flavonoidů jsou rozhodujícími činiteli, zda budou mít topoisomerasa II inhibiční aktivitu. Například přestože daidzein není inhibitor topoisomerasy II, jeho metabolit equol inhibuje topoisomerasu I i II. Hydrogenace genisteinu na dihydrogenistein vede ke ztrátě inhibiční aktivity k topoisomerase II. Konjugáty genisteinu, sulfát a glukuronid, a hlavní metabolit kvercetin 3'-O-methylkvercetin ztrácejí inhibiční aktivitu k topoisomerase II. Podle těchto studií vykazují O-methylované metabolity malou, pokud vůbec nějakou, inhibiční aktivitu vůči topoisomerase II [18].

Jedna studie na čerstvě narozených potkanech, kteří dostávali genistein, ukázala ochranný efekt proti chemicky vyvolané rakovině prsu [105]. Tato studie podpořila ideu, že sója podávaná dětem, může vyvolat celoživotní ochranu proti hormon-dependentní rakovině. Bohužel epidemiologická data mohou být zkreslená mnoha faktory, a proto je nutné provést mnohé další studie, aby se tyto hypotézy daly využít. Například zda malé děti se zvýšeným příjmem genisteinu nemají zvýšené riziko leukémie [18].

### **2.5.3. Efekt flavonoidů na produkci thyreoidálních hormonů**

Flavonoidy snižují i vychytávání jodu i inkorporaci ve studiích na zvířatech [106, 107]. Toto se shoduje s endemickým výskytem strumy popisovaným u populací, kde proso jako koncentrát flavonů, je základem potravy [108]. Takto je možné vysvětlit nemoci štítné žlázy popisované u dětí, krmených sójou [109]. Genistein, diadzein, kvercetin, kaempferol a narigenin inhibují syntézu tyroxinu, působením jako alternativní substráty pro jodaci tyrosinu, za vzniku mono-, di- a tri-jodoisoflavonu. Ukázalo se, že tyto sloučeniny také ireversibilně inhibují thyroperoxidasu, zásadní pro syntézu thyreoidálních hormonů. Tato inhibice je dána schopností fenolických sloučenin s volnou resorcinolovou (methahydroxyfenolovou) částí inhibovat thyroperoxidasu a laktoperoxidasu [18]. Uvedený mechanismus účinku zahrnuje přeměnu resorcinolové částí flavonoidu na radikál flavonoidu. Tento radikál se může kovalentně vázat na katalytické zbytky aminokyselin na enzymu, což vede k enzymové inaktivaci [107]. Proto flavonoidy s volnou resorcinolovou částí mohou být potenciálně strumigenní a

karcinogenní. Přes inhibiční aktivitu na syntézu tyroxinu, mohou způsobit zvýšení množství thyreotropinu, který vyvolá růst štítné žlázy a její dysfunkci [18].

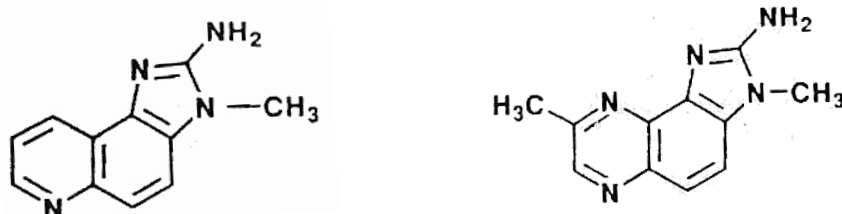
Některé epidemiologické studie předkládají, že snížené riziko srdečních nemocí a rakoviny prsu [110], prostaty [22], plic [21], tlustého střeva [111] a žaludku [112] je spojováno se zvýšeným příjmem ovoce, zeleniny a sojových produktů. Populace s nejnižším rizikem jsou Asiaté a vegetariáni. Pokud vycházíme z průměrného příjmu flavonolů 68 mg a isoflavonoidů (20 – 240 mg) v Asijské populaci, příjem těchto dávek v potravě není pravděpodobně příčinou nepříznivých účinků. Příjem flavonoidů, aby vyvolal mutaci a cytotoxicitu, není fyziologicky dosažitelný z potravinových zdrojů. Avšak příjem doplňků potravy, obzvláště antioxidantů, bylinných směsí, které jsou obvykle doporučovány v gramových, raději než miligramových množstvích, mohou vést k expozici potenciálně toxickými dávkami. Například kvercetin je výrobcí doporučován užívat v dávkách 500 – 1000 mg, což je 10-ti až 20-ti násobek příjmu při vegetariánské dietě. To znamená, že neregulovaný příjem komerčně dostupných doplňků potravy obsahujících flavonoidy, může mít biologické účinky, které nepříznivě ovlivňují zdraví [18].

## **2.6. METABOLICKÁ AKTIVACE KARCINOGENNÍCH HETEROCYKlickÝCH AROMATICKÝCH AMINŮ**

Více než 12 různých heterocyklických aromatických aminů vzniká ve stopovém množství v jídle, mase a rybách, při obvyklé přípravě [2]. Tyto chemikálie jsou potenciální mutageny a jsou nyní známými karcinogeny u hlodavců, vyvolávající tumory ve vícerých orgánech, jako játrech, tenkém a tlustém střevě [113]. Nově je známo, že jeden z nich, 2-amino-3-methylimidazol[4,5-*f*]chinolin (IQ), je silným jaterním karcinogenem u opic [114]. Navzdory stopovým množstvím, jejich široká variabilita a každodenní expozice, může být významným rizikem pro lidské zdraví. Heterocyklické aromatické aminy (HAA), jako mnohé karcinogeny, musí být metabolisovány, aby získaly svou genotoxicitu. Experimentální studie na hlodavcích ukázaly, že první aktivační krok zahrnuje *N*-oxidaci, která je katalyzována hlavně jaterním cytochromem P4501A2 [115, 116]. Pro mnohé aromatické aminy, jako je 4-aminobifenyl (ABP), může *N*-acetylace nastat dříve než *N*-oxidace, která vede ke vzniku karcinogenních *N*-hydroxy (N-OH) arylamidů. HAA jsou jen v malé míře katalyzovány *N*-acetylací v játrech hlodavců. Metabolicky vzniklé N-OH arylaminy i N-OH arylamidy jsou primární karcinogenní metabolity a jsou rychle metabolisovány jaterní

*N*-acetyltransferasou. Játerní transferasy mohou také metabolisovat *N*-OH arylaminy na vysoce reaktivní *N*-sulfonyloxy, *N*-acetoxy nebo *N*-propyloxy estery, které se kovalentně váží k játerní DNA a předpokládá se, že iniciují neoplastický proces [2]. Multiorgánová karcinogenita HAA u potkanů je připisována metabolitům, které vzniknou v játrech a poté jsou transportovány do cílových tkání. Některé studie ukázaly, že primární karcinogenní *N*-OH arylaminové metabolity tvoří nestabilní konjugáty s  $\beta$ -glukuronovou kyselinou v játrech, a poté buď vstupují do cirkulace a cílovou tkání je močový měchýř, nebo jsou vylučovány žlučí do tlustého střeva [117, 118]. Zde vznikají elektrofilu, které jsou schopné karcinogenní DNA vazby. Metabolická aktivace, která vede k porušení DNA, může také nastat přímo v extrahepatální tkáni [2]. Podle novějších epidemiologických studií, které ukázaly asociaci mezi acetylačním fenotypem a náchylností k rakovině, se zdá být role acetylce, u rakoviny vyvolané aromatickými aminy, důležitá. Pacienti s rakovinou tlustého střeva byli většinou rychlí acetylátoři [119], pacienti s rakovinou močového měchýře byli spíše pomalí acetylátoři [120]. Hypotéza o asociaci mezi rychlým acetylačním fenotypem a kolorektálním karcinomem, vyplývá se zřejmě vyšší polymorfní *O*-acetyltransferasové aktivitě nalezené v mukóze lidského tlustého střeva. Tyto enzymy katalyzují *O*-acetylaci *N*-OH arylaminů, které se pohotově váží k DNA, což může iniciovat rakovinu tlustého střeva. Na rozdíl od individuí s nízkou játerní *N*-acetyltransferasovou aktivitou, kteří se ukázali jako rizikovější pro rakovinu močového měchýře. Protože nejsou schopni detoxikovat aromatické aminy *N*-acetylací, transportuje se více karcinogenních *N*-OH arylaminů do močového měchýře.

Takovými strukturálními zástupci karcinogenních HAA, které vznikají při tepelné přípravě masa a ryb jsou IQ a 2-amino-3,8-dimethylimidazol[4,5-*f*]chinoxalin (MeIQx) [2].



**Obr. 2:** Strukturální vzorce IQ a MeIQx

Protože tyto chemikálie mohou být zapojeny v etiologii lidského kolorektálního karcinomu, byla testována *N*-oxidace cytochromem P450 v játrech,

*N*-acetylce polymorfní jaterní acetyltransferasou a aktivace *N*-OH metabolitů *O*-acetyltransferasou lidskými a potkaními játry a cytolem lidského tlustého střeva [2].

Metabolická aktivace IQ a MeIQx, byla porovnána se známým lidským karcinogenem 4-aminobiphenylem (ABP) [121]. Všechny tyto aromatické aminy byly pohotově aktivovány *N*-hydroxylací lidskými jaterními mikrosomy. U ABP je ve vyšší míře vyjádřena CYP1A2 dependentní *N*-oxidace, méně u MeIQx a IQ. MeIQx ani IQ nebyly *N*-acetylovány lidským jaterním cytolem jako ABP. Byly nasyntetizovány radioaktivně značené *N*-hydroxy arylaminové metabolity a byla sledována jejich reaktivita s DNA. Všechny deriváty se váží kovalentní vazbou k DNA za neutrálního pH (7,0). Nejvíce se váže *N*-OH-IQ. Tyto *N*-OH arylaminy byly dále aktivovány k vazbě s DNA lidskou jaterní *O*-acetyltransferasou. Acetyl coenzym A (AcCoA)-dependentní cytolem katalyzovaná DNA vazebnost byla největší u *N*-OH-ABP. Potkaní jaterní cytosol také katalyzuje AcCoA-dependentní DNA vazbu *N*-OH arylaminů, ale substrátová specifita vykazuje určité rozdíly proti lidskému jaternímu cytosolu. Lidský cytosol buněk tlustého střeva má také AcCoA-dependentní DNA vazebnou aktivitu pro *N*-OH substráty, ale je celkově nižší než u rychlých acetylátorů v jaterním cytosolu. *O*-acetylce *N*-OH metabolitů lidským tlustým střevem je v souladu s domněnkou, že HAA hrají svou roli v kolorektální rakovině [2].

Významně více rychlých acetylátorů bylo nalezeno u pacientů s kolorektálním karcinomem oproti kontrole [119]. Tkáň tlustého střeva získaná od pacientů s rakovinou vykazuje vyšší míru *O*-acetyltransferasové aktivity. Zatím není známo, zda AcCoA-dependentní DNA vazba *N*-OH heterocyklických aromatických aminů v tlustém střevě u lidí je katalyzována přednostně polymorfní nebo monomorfní acetyltransferasou. Přesto tyto genotoxiny mohou být považovány za potenciální lidské kolorektální karcinogeny [2].

### **3. CÍL PRÁCE**

- a) Určit cytotoxicitu flavonoidů rutin a kvercetin a potenciálních karcinogenů heterocyklických aromatických aminů IQ a MeIQx na buněčné linii LS174T a HCT-8.
- b) Zjistit zda flavonoidy rutin a kvercetin a heterocyklické aromatické aminy IQ a MeIQx ovlivňují aktivitu CYP1A.
- c) Zjistit zda flavonoidy rutin a kvercetin a heterocyklické aromatické aminy IQ a MeIQx mají shodné vlastnosti v buněčné linii HCT-8 jako v buněčné linii LS174T.

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **4.1. MATERIÁL, PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ, POMŮCKY, CHEMIKÁLIE**

#### **4.1.1 Materiál**

Buněčná linie LS174T (lidské epitelové buňky adenokarcinomu tlustého střeva) [122] - European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, UK , HCT-8 (lidské epitelové buňky kolorektálního adenokarcinomu) [123] - ECACC, Salisbury, UK

#### **4.1.2. Přístroje a zařízení**

- laminární box - BioAir AURA 2000 M.A.C.
- mikroskop - Nikon Eclipse TS 100
- CO<sub>2</sub> inkubátor – HeraCell
- vodní lázeň – Memmert
- analytické váhy - Scaltec SBC 22
- čtečka absorbance mikrotitračních destiček - Biorad Microplate Reader 550
- třepačka - IKA MS2 Minishaker
- třepačka mikrotitračních destiček Thermomixer Comfort
- ultrazvuková lázeň - Bandelin Sonorex
- zmrazovací kontejner - NALGENE, Sigma C1562
- mrazicí box (-80°C) - HeraFreeze
- digitální pH-metr Jenway LTD 302
- multifunkční snímač (absorbance, fluorescence, luminiscence) mikrotitračních destiček Tekan Infinite M200, s programem Magellan

#### **4.1.3. Pomůcky**

Sterilní kultivační lahve, sterilní pipety, elektrický pipetovací nástavec, kádinky, automatické pipety, sterilní pipetovací špičky, Bürkerova komůrka, mikrozkuřavky, sterilní mikrotitrační destičky s plochým dnem pro buněčné kultury, multikanálové pipety, rukavice, navažovací kopistka, stojánky na mikrozkuřavky

#### 4.1.4. Chemikálie

Sigma-Aldrich Praha, ČR	- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), kvercetin, dimethylsulfoxid (DMSO), N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina (HEPES), sterilní roztok neutrální červeně 3,3 mg/ml v DPBS + MgCl <sub>2</sub> + CaCl <sub>2</sub> , β-naftoflavon (β-NF), fosfátový (PBS) pufr, trypsin-EDTA, rutin, dikumarol, koňské sérum, sodium pyruvát, (RPMI-1640) médium vyvinuté v Roswell Park Memorial Institutu, 2,3,7,8-tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD), fetální telecí sérum (FBS),
Lonza, Švýcarsko	- penicilin/streptomycin
Invitrogen Carlsbad, CA, USA	- gentamicin sulfát
Penta a.s., ČR	- hydroxid sodný, kyselina octová,
Merck spol.s r.o., ČR	- ethanol 95%,
Fluka, ČR	- ethoxyresorufin (ER), methoxyresorufin (MR), methylcholantren (MC)
Toronto Research Chemicals, CA	- IQ, MeIQx
Běžné chemikálie čistoty p.a.	

## 4.2. METODIKA

### 4.2.1. Kultivace buněčných linií

Buňky LS174T byly kultivovány v médiu DMEM [124] s obsahem fenolové červeně. Kultivační médium bylo obohaceno 5% inaktivovaného FBS [125] (inaktivace séra se provádí těsně před přidáním do média, při 57 °C po dobu 30 min) a 10 mM HEPES [126]. Z důvodu dlouhodobější kultivace bylo do kultivačního média přidáno antibiotikum gentamicin (50 mg/l média). Médium bylo sterilizováno bakteriální filtrací.

Buňky HCT-8 byly kultivovány s médiem RPMI-1640 s obsahem L-glutaminu a hydrogenuhličitanu sodného. Kultivační médium bylo obohaceno o 5% inaktivovaného FBS, 5% inaktivovaného koňského séra, 1% pyruvátu sodného a 0,5% penicilin/streptomycinu. Médium bylo sterilizováno bakteriální filtrací.



Pasážování každé buněčné linie bylo prováděno podle růstu buněčné kultury, při dosažení alespoň 90% konfluence, obvykle 2x týdně. Médium bylo měněno každý druhý den. Namnožené buňky, které nebyly využity pro experimenty, byly zmrazeny v kultivačním médiu s 10% FBS a s 10% DMSO.

#### **4.2.1.1. Pasážování adherentních buněk**

Pasážováním dochází k naředění konfluentních buněk tak, aby měly dostatek místa pro další dělení. K požadovanému dílu (tj. ředění) buněk v kultivační lahvi se přidává kultivační médium.

Postup:

Po uzavření byla kultivační láhev vyjmuta z inkubátoru a bylo slito médium. Buňky byly dvakrát opláchnuty sterilním puřem PBS (při kultivaci v lahvích 75 cm<sup>2</sup> – dvakrát cca 7 ml, při kultivaci v lahvích 25 cm<sup>2</sup> - dvakrát cca 3 ml). Tímto byl odstraněn vápník, což je nezbytné pro správnou funkci enzymu trypsin-EDTA (T-E) (čím lépe opláchnuté buňky, tím kratší je enzymatické působení a úspěšnější pasáž). Dále byl sterilně přidán T-E (0,25%, 37°C), dávkování opět záviselo na velikosti lahve (láhev 75 cm<sup>2</sup> – 1 ml, láhev 25 cm<sup>2</sup> – 0,5 ml). Kultivační láhev byla uzavřena a kýváním bylo docíleno rovnoměrného rozprostření T-E na dně lahve. Po přenesení lahve do termostatu probíhalo enzymatické uvolňování adherentních buněk zhruba po dobu 5 minut. Mikroskopicky bylo možné kontrolovat stav buněk. V okamžiku, kdy měla většina buněk kulovitý tvar, resp. vytvářela suspenzi – byly buňky prudkým pohybem setřepány do spodní části lahve.

V co nejkratší době bylo sterilně přidáno médium předeřáté na 37°C (do lahve 75 cm<sup>2</sup> - cca 4 ml, do lahve 25 cm<sup>2</sup> - cca 2 ml), čímž bylo zastaveno působení T-E. Buněčná suspenze byla zhomogenizována opakovaným nasátím a vypuštěním z pipety. Rychlé setřepání a přidání média zpravidla zabránilo vzniku shluků buněk – v ideálním případě mohla být získána jednobuněčná suspenze.

Část buněčné suspenze byla ponechána v kultivační lahvi (při pasáži 1:14, byla v lahvi ponechána 1/15 buněčné suspenze), zbytek bylo možné využít pro experimenty. K buňkám v lahvi bylo přidáno kultivační médium, množství média záviselo na velikosti lahve (pro kultivaci v 75 cm<sup>2</sup> lahvích byl výsledný objem cca 13 ml, pro 25 cm<sup>2</sup> lahve 5 ml). Kýváním byly buňky rovnoměrně rozprostřeny po dně kultivační lahve, láhev byla umístěna do CO<sub>2</sub> inkubátoru a byl povolen uzávěr.

#### **4.2.1.2. Zmrazení buněčné linie pro dlouhodobé uchování v tekutém dusíku**

Při zmrazování se buněčná suspenze obohatí o sérum FBS (10%) a DMSO (10%) a podrobí se gradientovému zmrazování ( $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). Po zmrazení je možno buňky dlouhodobě uchovávat v tekutém dusíku.

Postup:

Buňky v suspenzi získané pasáží byly naředěny tak, aby v 1,2 ml média byl počet buněk odpovídající cca 80-90% konfluenci na ploše  $25\text{ cm}^2$ , tj. cca 3-5 mil/ml. Buněčná suspenze se napipetuje po 1,2 ml do připravených a popsanych zmrazovacích zkumavek o objemu 1,5 ml. Při zmrazování buněk kultivovaných v  $75\text{ cm}^2$  lahvi, bylo možno při 80-90% konfluenci zamrazit cca 3 zkumavky.

Následně bylo přidáno 150  $\mu\text{l}$  sterilního FBS a nakonec 150  $\mu\text{l}$  sterilního DMSO. Zmrazovací zkumavka byla uzavřena a buněčná suspenze několikrát promíchána (DMSO je toxické, důkladným promícháním se dosáhne 10% roztoku v celém objemu zkumavky – 150  $\mu\text{l}/1,5\text{ ml}$ ).

Okamžitě po přidání FBS a DMSO byly zkumavky umístěny do zmrazovacího kontejneru, který je naplněný isopropanolem. Kontejner byl co nejrychleji umístěn do mrazícího boxu ( $-80^{\circ}\text{C}$ ), kde probíhá gradientové zmrazování.

Nejdříve za 2 hodiny (obvykle druhý den) bylo možno zmrazené buněčné suspenze ve zkumavkách přenést do tekutého dusíku pro dlouhodobé uchování.

#### **4.2.1.3. Rozmrazení buněčné linie dlouhodobě uchované v tekutém dusíku**

Do připravené kultivační lahve  $25\text{ cm}^2$  bylo napipetováno sterilně 8 ml kultivačního média. Opakovaně bylo pipetou nabíráno médium z kultivační lahve a přidáváno opatrně do zkumavky, tím docházelo k rychlému tání a současnému ředění buněk. Následně byla rozpuštěná suspenze postupně přenesena do kultivační lahve. Buněčná suspenze byla v kultivační lahvi protřepáním zhomogenizována a následně umístěna do  $\text{CO}_2$  inkubátoru.

Po adhezii buněk (min. za 6 hodin, resp. druhý den) bylo vyměněno médium a následovala rutinní kultivace.

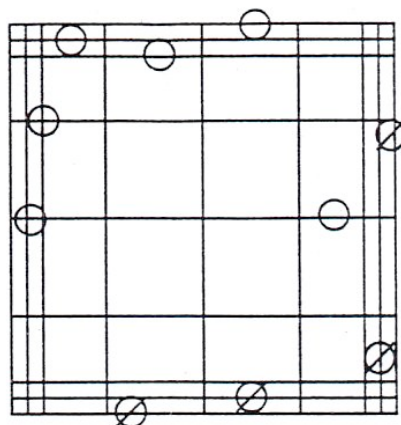
#### 4.2.2. Test cytotoxicity – Neutral Red uptake test

Tento test je založen na schopnosti zdravých buněk hromadit ve svých lysozomech vitální barvivo neutrální červeň. Při fyziologickém pH je toto barvivo neutrální a pasivně prostupuje buněčnou membránou. Lysozomy udržují pH nižší než okolní cytoplazma. Neutrální červeň vstupující do lysozomu získává náboj, a proto neprostupuje zpět do cytoplazmy. Udržování protonového gradientu na membráně lysozomu je energeticky náročné. Ztráta gradientu pH při poškození buňky nebo buněčné smrti způsobí zvýšení propustnosti membrány a uvolnění zadržené neutrální červeně.

##### 4.2.2.1. Ředění buněčné suspenze na požadovanou hustotu buněk

Pomocí Bürkerovy komůrky byla zjištěna koncentrace buněk v buněčné suspenzi získané pasážováním a následně byla suspenze naředěna kultivačním médiem na požadovanou koncentraci.

Do každé poloviny komůrky byla napipetována naředěná suspenze ze samostatného odběru. Pod mikroskopem byly spočteny buňky ležící uvnitř deseti čtverců komůrky včetně těch buněk, které se dotýkaly horního a levého rozhraní jednotlivých čtverců. Buňky na dolním a pravém rozhraní se nepočítaly – viz obr 3.



**Obr. 3:** Čtverec Bürkerovy komůrky o délce strany 1 mm. Počítají se buňky uvnitř čtverce a na horním a levém mezihraní (O), nepočítají se buňky na dolním a pravém mezihraní (Ø)

Koncentrace buněk byla vypočtena dle vzorce:  $C = \bar{x} \cdot 10^4$

(C - počet buněk v 1 ml suspenze,  $\bar{x}$  - průměrný počet buněk v 1 čtverci (tj. v 0,1 l),  $10^4$  - přepočten na 1 ml)

#### **4.2.2.2. Pracovní postup**

Po pasážování a naředění suspenze LS174T buněk na hustotu 100 tisíc buněk na 1 ml kultivačního média byla připravena 96 jamková mikrotitrační destička. Do všech obvodových jamek bylo napipetováno 100  $\mu$ l PBS. A do všech vnitřních jamek (do šesti řádků a deseti sloupců) 100  $\mu$ l buněčné suspenze. Poté následovala 24 hodinová inkubace v termostatu. Dále bylo přidáno 100  $\mu$ l expozičního média s testovanou látkou a negativní kontrolou a následovala 48 hodinová expozice v termostatu [127]. Ze všech 60 vnitřních jamek se odsálo 100  $\mu$ l média a přidalo se 100  $\mu$ l roztoku neutrální červeně v médiu (80  $\mu$ g/ml) do výsledné koncentrace 40  $\mu$ g/ml. Takto připravené destičky byly inkubovány 3 hodiny v termostatu. Poté byly buňky fixovány a lyzovány. Po odsátí média se přidalo 100  $\mu$ l fixačního roztoku, který se nechal působit 15 minut při laboratorní teplotě. Buňky byly dvakrát opláchnuty 50  $\mu$ l PBS a vystaveny působení 200  $\mu$ l lyzačního roztoku, třicet minut na deskové třepačce.

Pro zhodnocení byla měřena absorbance na Biorad Microplate Reader 550 při vlnové délce 540 nm a na multifunkčním snímači (absorbance, fluorescence, luminiscence) mikrotitračních destiček Tekan Infinite M200, s programem Magellan. Od získaných hodnot absorbance byla odečtena hodnota blanku (průměrná hodnota absorbance jamek s PBS). Výsledné hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta kontroly.

#### **4.2.2.3. Příprava expozičních roztoků, roztoku neutrální červeně, fixačního a lyzačního roztoku**

Rutin - molekulová hmotnost  $M_r = 610,52$  rozpustný v DMSO [128] jako 0,2 M zásobní roztok.

Kvercetin - molekulová hmotnost  $M_r = 338,26$  rozpustný v DMSO jako 0,2 M zásobní roztok.

IQ - molekulová hmotnost  $M_r = 198,22$  rozpustný v roztoku DMSO:ethanol (1:4) jako 0,1 M zásobní roztok.

MelQx – molekulová hmotnost  $M_r = 213,23$  rozpustný v roztoku DMSO:ethanol (1:4) jako 0,1 M zásobní roztok.

Ze zásobního roztoku byly připraveny různé koncentrace roztoků tak, aby po odebrání 10  $\mu\text{l}$  z nich a naředění na 1 ml médiem, bylo nakonec dosaženo v jamkách výsledné expoziční koncentrace. (Z takto vzniklého 1 ml expozičního roztoku v médiu se dává 100  $\mu\text{l}$  do jamky se 100  $\mu\text{l}$  buněk v médiu).

Kontrola je 10  $\mu\text{l}$  rozpouštědla naředěného do 1 ml médiem a z toho pipetováno na mikrotitrační destičky 100  $\mu\text{l}$  ke 100  $\mu\text{l}$  buněk v médiu.

**Tab. 1:** Příprava expozičních roztoků rutinu a kvercetinu pro test cytotoxicity v buněčné linii LS174T

koncentrace roztoků	0,002 M	0,01M	0,02 M	0,04 M	0,1 M	0,16 M	0,2 M
expoziční koncentrace	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$	800 $\mu\text{M}$	1000 $\mu\text{M}$

**Tab. 2:** Příprava expozičních roztoků IQ a MelQx pro test cytotoxicity v buněčné linii LS174T, a expozičních roztoků rutinu, kvercetinu, IQ a MelQx pro test cytotoxicity v HCT-8 buněčné linii

koncentrace roztoků	0,001 M	0,002 M	0,004 M	0,01 M	0,02 M	0,04 M	0,1 M
expoziční koncentrace	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$

Na mikrotitrační destičku se pipetovala vždy jedna koncentrace do jednoho sloupce, tudíž každá koncentrace byla testována v šesti jamkách. Kontrola byla ve třech sloupcích, ve dvou krajních a uprostřed. Každá testovaná látka měla svou destičku.

Roztok neutrální červeně o výchozí koncentraci 3,3 mg/ml - se naředil médiem, aby vznikl roztok neutrální červeně 80  $\mu\text{g/ml}$ .

Fixační roztok - 1g/100 ml  $\text{CaCl}_2$  v 0,5% formaldehydu

Lyzační roztok – 1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  v 50% ethanolu

#### 4.2.3. Měření indukce a inhibice metodou EROD/MROD

7-ethoxyresorufin-O-dealkylační (EROD) test využívá měřitelnou fluorescenci resorufinu, který vzniká z ER 7-ethoxyresorufin-O-dealkylací katalyzovanou CYP1A1.

7-methoxyresorufin-O-dealkylační (MROD) test využívá také fluorescenci resorufinu, vzniklého z MR 7-methoxyresorufin-O-dealkylací katalyzovanou CYP1A2 [60].

Na mikrotitrační destičky bylo nasazeno 100  $\mu$ l suspenze buněk jako při testu cytotoxicity a inkubováno 24 hodin v termostatu, poté bylo přidáno 100  $\mu$ l expozičního média s testovanou koncentrací (1, 5, 10, 50  $\mu$ M) a s negativní kontrolou. Následovala 48 hodinová expozice v termostatu. Odsátí média a oplach buněk 50  $\mu$ l předeřhřátým pufrům (0,1M, pH 7,4) na 37°C. Dále se přidalo 100  $\mu$ l inkubačního média na jamku.

Inkubační médium: 1 ml fosfátového pufru 0,1M, pH 7,4

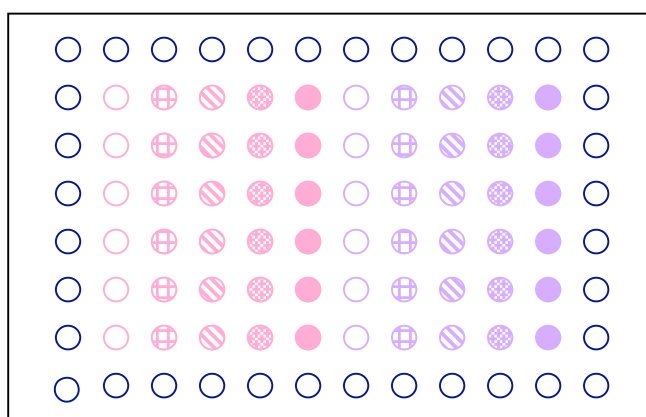
5  $\mu$ l roztoku ER/MR v DMSO (1 mM)








6  $\mu$ l roztoku dikumarolu v DMSO (10 mM)

Takto byly buňky s inkubačním médiem inkubovány 60 minut při 37°C v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Nakonec se přidalo 25  $\mu$ l 0,1 M NaOH do každé jamky, a buňky se nechaly 60 minut lyzovat při 37°C na třepačce mikrotitračních destiček Termomixer Comfort [129].

Na mikrotitrační destičku se pipetovala vždy jedna koncentrace do jednoho sloupce, tudíž každá koncentrace byla testována v šesti jamkách. Kontrola byla v prvním sloupci. Každá testovaná látka měla svou destičku. Na polovinu mikrotitrační destičky se pipetovalo inkubační médium s ER, na druhou polovinu MR (obr.4).

Měření vzorků se provádělo na přístroji Tecan programem Magellan metodou Resorufin. Měřena byla spodní fluorescence. Od získaných hodnot fluorescence byla odečtena hodnota blanku (průměrná hodnota fluorescence jamek s PBS). Výsledná intenzita fluorescence byla přepočítána na % intenzity kontroly.



**Obr. 4:** Mikrotitrační destička pro EROD/MROD test.  jamka s PBS,  inkubační médium s ER,  inkubační médium s MR. Kontrola,  1  $\mu$ M,  5  $\mu$ M,  10  $\mu$ M,  50  $\mu$ M testované látky

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. CYTOTOXICITA RUTINU, KVERCETINU, IQ A MEIQX PRO BUNĚČNOU LINII LS174T

Cytotoxicita byla měřena testem Neutral Red uptake, který byl popsán v kapitole 4.2.2.

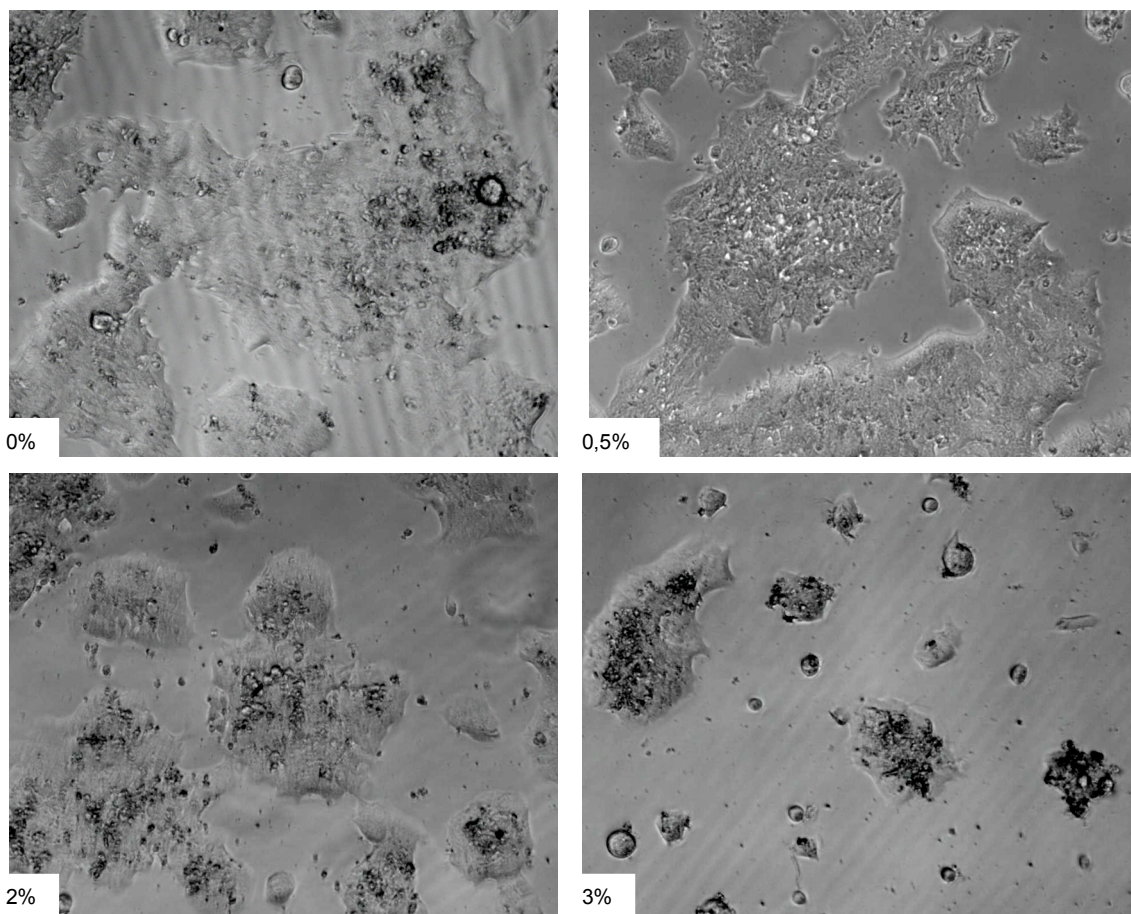
Cytotoxicity byly testovány vždy dvakrát u rutinu a kvercetinu se shodnými koncentracemi pro oba pokusy, u IQ a MeIQx bylo při druhém testu koncentrací méně.

Protože se všechny testované látky rozpouštěly v DMSO, testovala se také cytotoxicita DMSO testem Neutral Red uptake, aby se vyloučil jeho vliv na následující testy cytotoxicity hodnocených látek. Test byl proveden v šesti jamkách pro každou koncentraci DMSO v médiu.

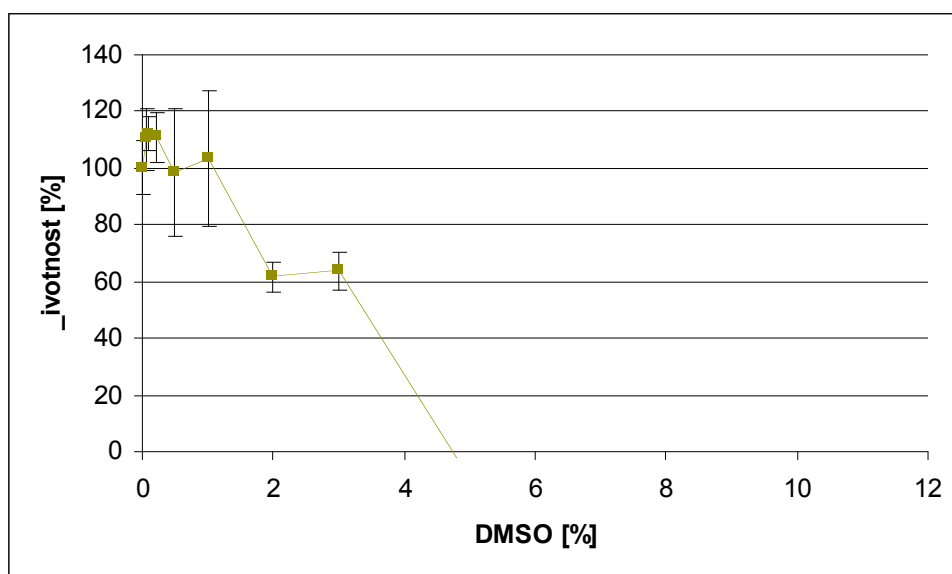
**Tab. 3:** Cytotoxicita DMSO pro LS174T buněčnou linii

DMSO [%]	životnost [%] ± SD
0,00	100,0 ± 9,5
0,05	110,4 ± 10,8
0,10	112,1 ± 6,0
0,20	110,9 ± 8,6
0,50	98,7 ± 22,5
1,00	103,7 ± 23,9
2,00	61,8 ± 5,2
3,00	63,8 ± 6,8
5,00	(-)9,2 ± 0,4
10,00	(-)9,7 ± 0,8

SD – směrodatná odchylka od aritmetického průměru



**Obr. 5:** Cytotoxicita DMSO - fotografie. Fotografie buněčné linie LS174T po 48 hodinové expozici 0%, 0,5%, 2%, 3% DMSO v jamce při stonásobném zvětšení mikroskopem



**Obr. 6:** Cytotoxicita DMSO pro LS174T buněčnou linii

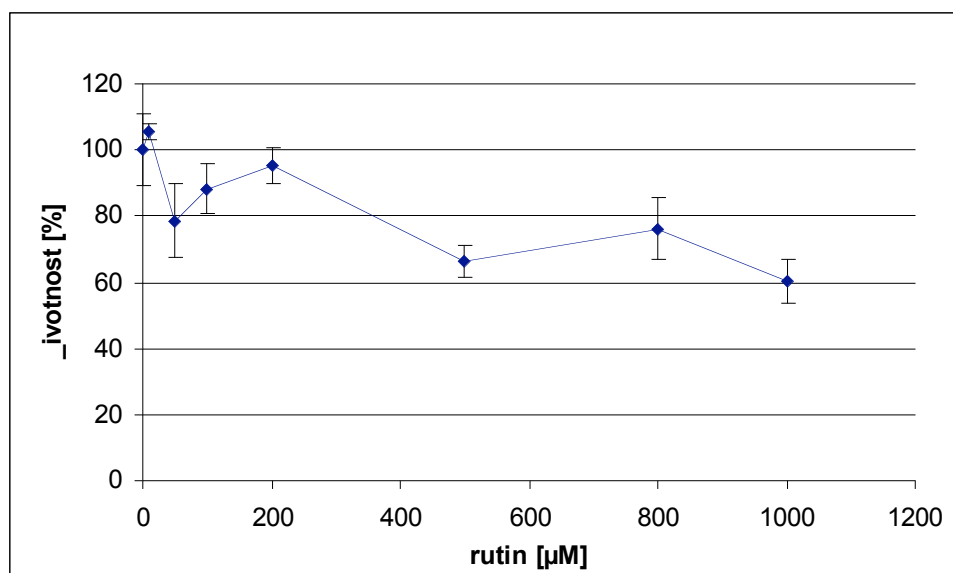


DMSO se v inkubačních roztocích používá v koncentracích 0,5 % a nižších, takže by neměl ovlivňovat následující testy, protože je pro buňky LS174T cytotoxický, až v koncentracích nad 1% v inkubační směsi.

### 5.1.1. Rutin

**Tab. 4:** Cytotoxicita rutinu pro LS174T buněčnou linii – 1. test

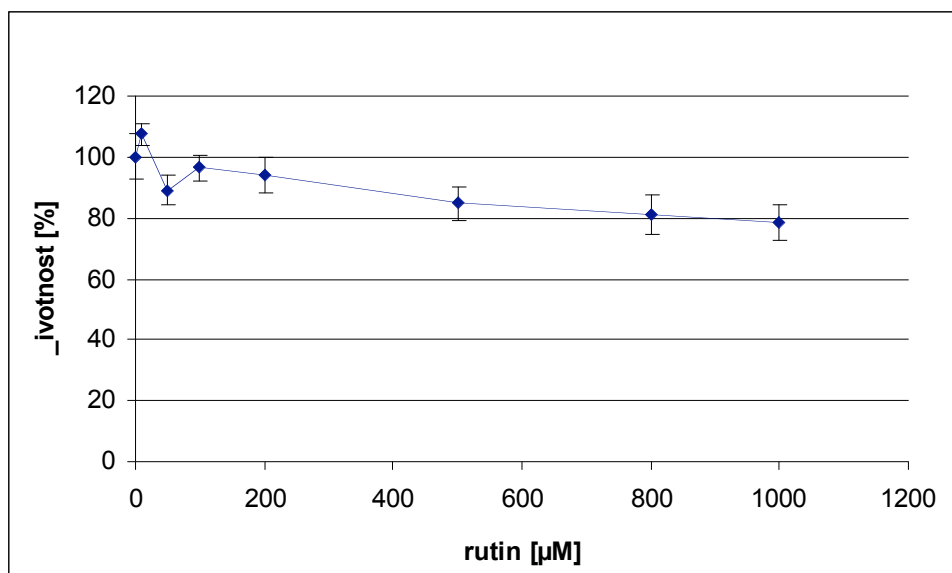
rutin [ $\mu\text{M}$ ]	životnost [%] $\pm$ SD
0	100,0 $\pm$ 10,8
10	105,7 $\pm$ 2,5
50	78,6 $\pm$ 11,2
100	88,3 $\pm$ 7,3
200	95,2 $\pm$ 5,3
500	66,5 $\pm$ 4,9
800	76,2 $\pm$ 9,3
1000	60,1 $\pm$ 6,7



**Obř. 7:** Cytotoxicita rutinu pro LS174T buněčnou linii – 1. test

**Tab. 5:** Cytotoxicita rutinu pro LS174T buněčnou linii – 2. test

rutin [ $\mu\text{M}$ ]	životnost [%] $\pm$ SD
0	100,0 $\pm$ 7,6
10	107,4 $\pm$ 3,7
50	89,1 $\pm$ 4,8
100	96,5 $\pm$ 4,3
200	94,2 $\pm$ 6,0
500	84,7 $\pm$ 5,5
800	81,3 $\pm$ 6,5
1000	78,3 $\pm$ 5,8



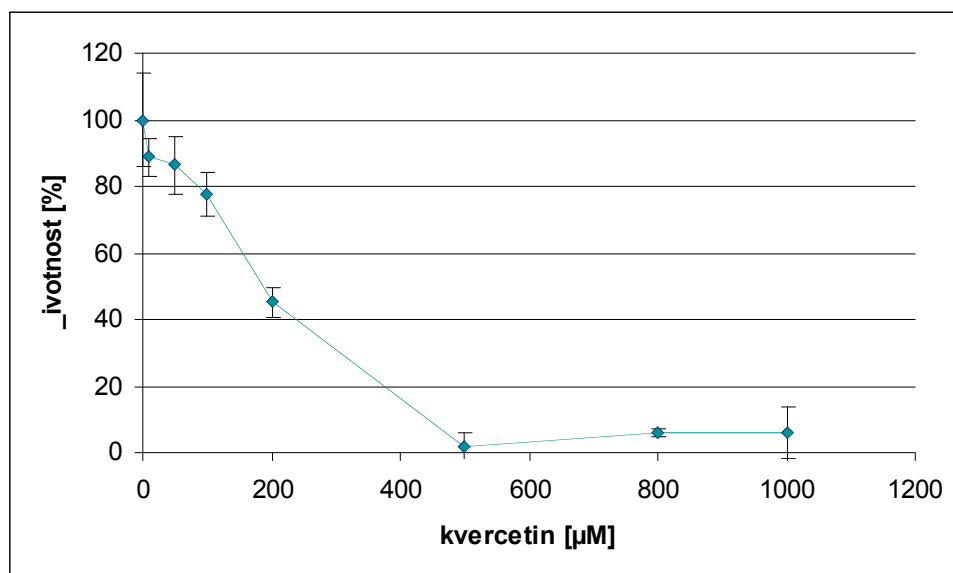
**Obr. 8:** Cytotoxicita rutinu pro LS174T buněčnou linii – 2. test

Výsledky obou testů vyšly obdobně. Rutin není cytotoxický do koncentrace 200  $\mu\text{M}$ , ve vyšších koncentracích je mírně cytotoxický.

### 5.1.2. Kvercetin

**Tab. 6:** Cytotoxicita kvercetinu pro LS174T buněčnou linii – 1. test

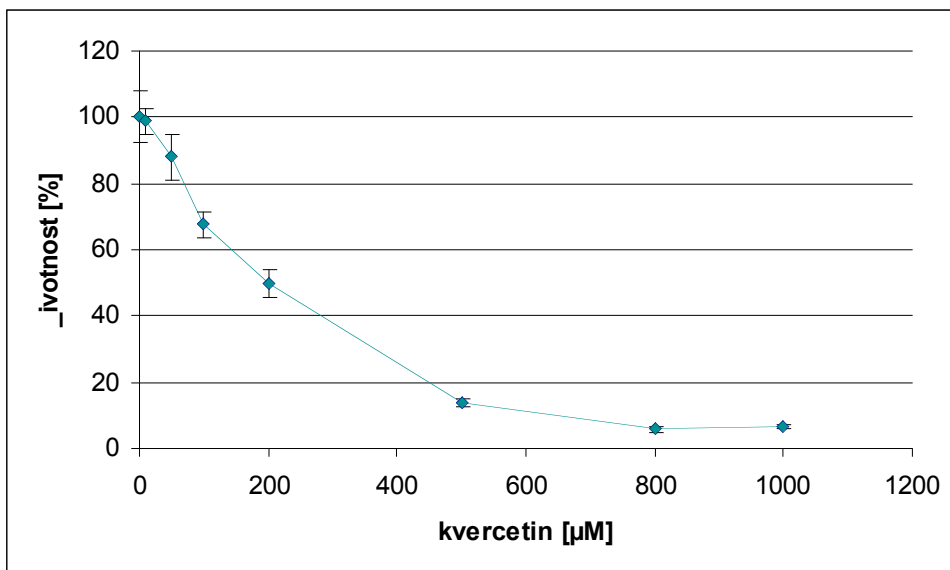
kvercetin [ $\mu\text{M}$ ]	životnost [%] $\pm$ SD
0	100,0 $\pm$ 14,2
10	88,8 $\pm$ 5,8
50	86,4 $\pm$ 8,5
100	77,8 $\pm$ 6,7
200	45,1 $\pm$ 4,5
500	1,9 $\pm$ 4,2
800	6,1 $\pm$ 1,2
1000	6,1 $\pm$ 7,7



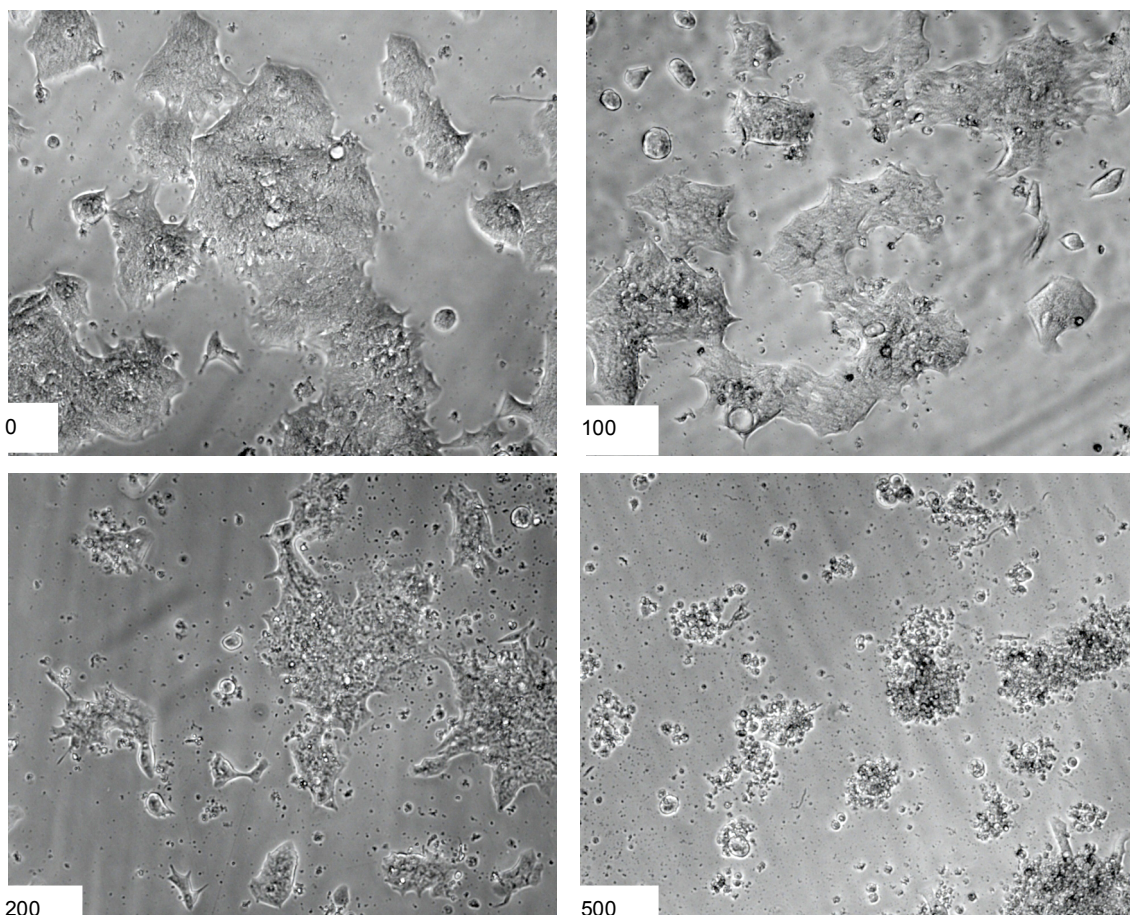
**Obr. 9:** Cytotoxicita kvercetinu pro LS174T buněčnou linii – 1. test

**Tab. 7:** Cytotoxicita kvercetinu pro LS174T buněčnou linii – 2. test

kvercetin [ $\mu\text{M}$ ]	životnost [%] $\pm$ SD
0	100,0 $\pm$ 7,8
10	98,7 $\pm$ 3,7
50	87,9 $\pm$ 6,9
100	67,5 $\pm$ 4,2
200	49,7 $\pm$ 4,2
500	13,8 $\pm$ 1,4
800	5,8 $\pm$ 0,9
1000	6,7 $\pm$ 0,7



**Obr. 10:** Cytotoxicita kvercetinu pro LS174T buněčnou linii – 2. test



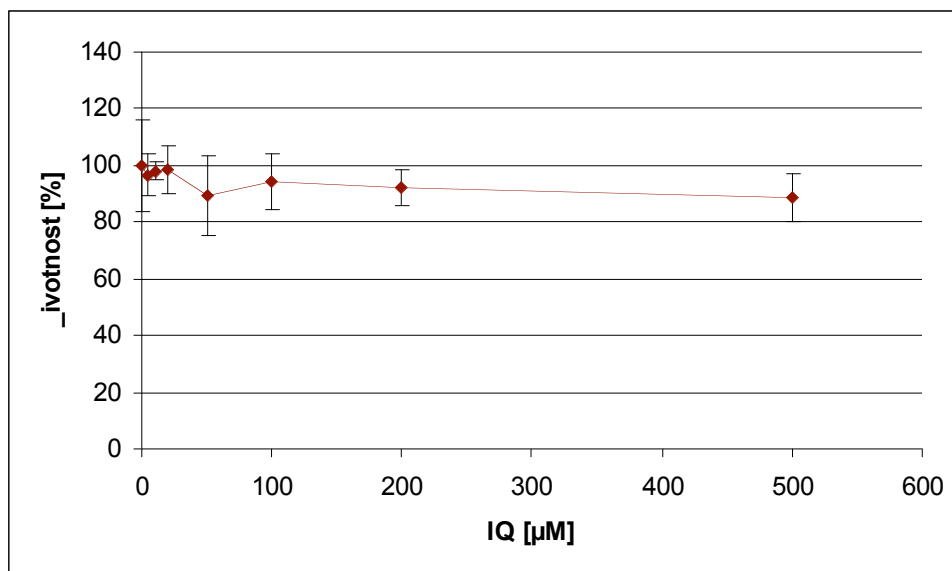
**Obr. 11:** Fotografie cytotoxicity kvercetinu pořízené mikroskopem při stonásobném zvětšení v jamkách destičky po 48 hod inkubaci s 0, 100, 200, 500 µM koncentracemi kvercetinu v LS174T buněčné linii

Výsledky obou testů jsou obdobné. Kvercetin je cytotoxický. Do koncentrace 50  $\mu\text{M}$  přežívá téměř 90 % buněk LS174T, ale při koncentraci nad 200  $\mu\text{M}$  nepřežívá už ani 50% buněk LS174T.

### 5.1.3. IQ

**Tab. 8:** Cytotoxicita IQ pro LS174T buněčnou linii – 1. test

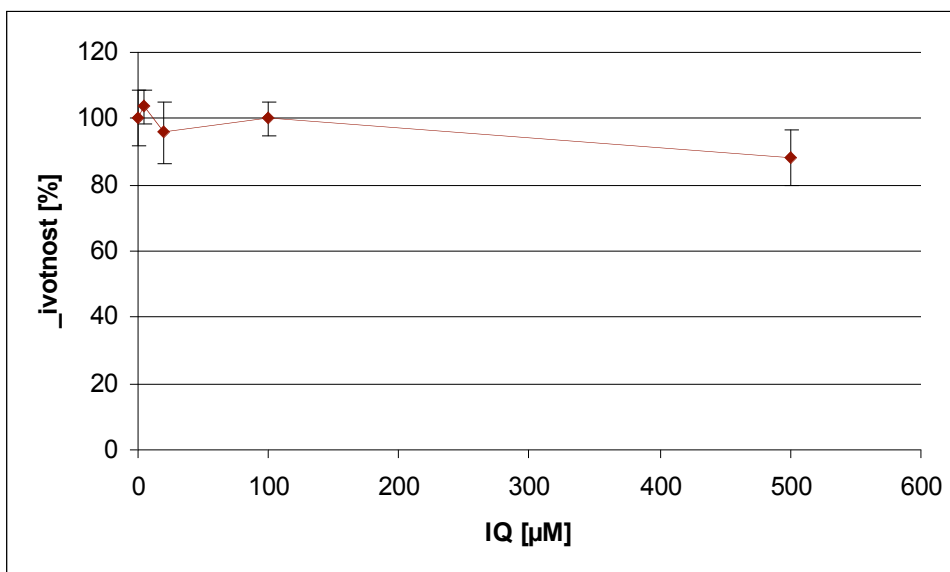
IQ [ $\mu\text{M}$ ]	životnost [%] $\pm$ SD
0	100,0 $\pm$ 16,4
5	96,6 $\pm$ 7,3
10	98,0 $\pm$ 3,0
20	98,4 $\pm$ 8,5
50	89,5 $\pm$ 14,3
100	94,4 $\pm$ 9,9
200	92,1 $\pm$ 6,2
500	88,6 $\pm$ 8,4



**Obr. 12:** Cytotoxicita IQ pro LS174T buněčnou linii – 1. test

**Tab. 9:** Cytotoxicita IQ pro LS174T buněčnou linii – 2. test

IQ [ $\mu\text{M}$ ]	0	5	20	100	500
životnost [%] $\pm$ SD	100,0 $\pm$ 8,5	103,8 $\pm$ 5,1	95,8 $\pm$ 9,4	99,9 $\pm$ 5,2	88,2 $\pm$ 8,4



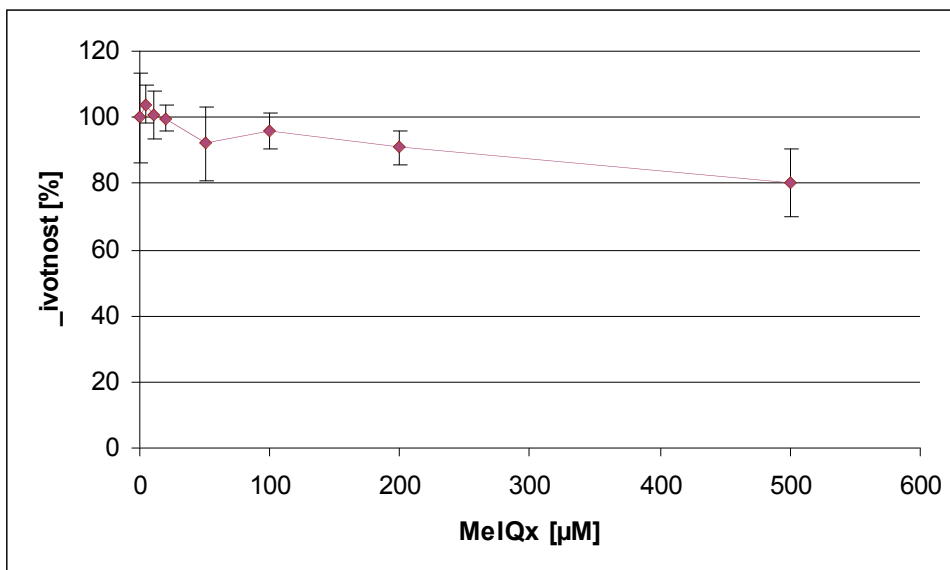
**Obr. 13:** Cytotoxicita IQ pro LS174T buněčnou linii – 2. test

Výsledky vyšly v obou testech shodně, IQ v použitých koncentracích není cytotoxický. Až při koncentraci 500 μM byl zaznamenán úbytek buněk na 90%.

#### 5.1.4. MelQx

**Tab. 10:** Cytotoxicita MelQx pro LS174T buněčnou linii – 1. test

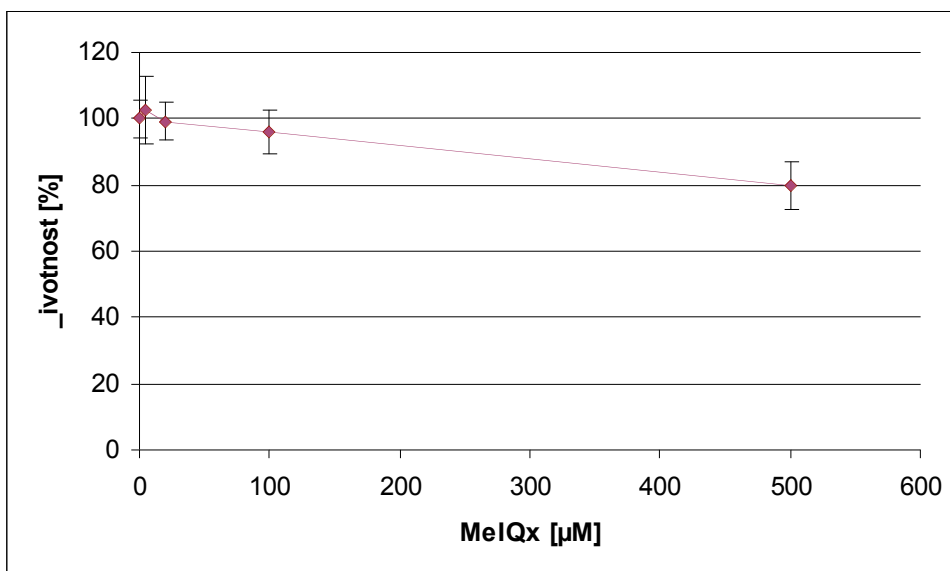
MelQx [μM]	životnost [%] ± SD
0	100,0 ± 13,5
5	103,8 ± 5,7
10	100,9 ± 7,3
20	99,6 ± 3,9
50	92,2 ± 11,1
100	95,7 ± 5,5
200	90,9 ± 5,0
500	80,0 ± 10,1



**Obr. 14:** Cytotoxicita MelQx pro LS174T buněčnou linii – 1. test

**Tab. 11:** Cytotoxicita MelQx pro LS174T buněčnou linii – 2. test

MelQx [μM]	0	5	20	100	500
životnost [%] ± SD	100,0 ± 5,6	102,8 ± 10,1	99,2 ± 5,7	96,0 ± 6,6	79,6 ± 7,3



**Obr. 15:** Cytotoxicita MelQx pro LS174T buněčnou linii – 2. test

Výsledky obou testů vyšly shodně. MelQx není cytotoxický pro buněčnou linii LS174T při použitých koncentracích. Až při koncentraci 500 μM MelQx v inkubační směsi přežilo jen 80 % buněk 48 hodinovou inkubací.

Uvedené výsledky vycházejí z hodnot absorbance změřených na multifunkčním snímači (absorbance, fluorescence, luminiscence) mikrotitračních destiček Tekan Infinite M200, s programem Magellan. Mikrotitrační destičky byly také proměřeny čtečkou absorbance mikrotitračních destiček - Biorad Microplate Reader 550. Výsledky vyšly shodně.

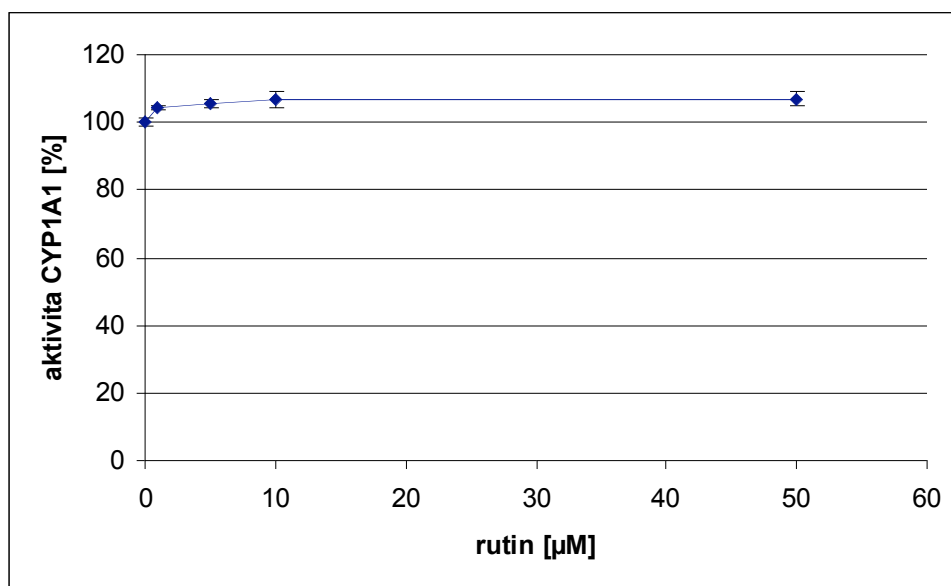
## 5.2. VLIV RUTINU, KVERCETINU, IQ A MEIQX NA AKTIVITU CYP1A V BUNĚČNÉ LINII LS174T

Vliv rutinu a kvercetinu, IQ a MeIQx na aktivitu CYP1A v buněčné linii LS174T byl testován metodou EROD/MROD popsanou v kapitole 4.2.3.

### 5.2.1. Rutin

**Tab. 12:** Vliv rutinu na aktivitu CYP1A1 v buněčné linii LS174T

rutin [ $\mu\text{M}$ ]	0	1	5	10	50
aktivita CYP1A1 [%] $\pm$ SD	100,0 $\pm$ 1,2	104,4 $\pm$ 0,6	105,4 $\pm$ 1,1	106,5 $\pm$ 2,5	106,9 $\pm$ 2,0

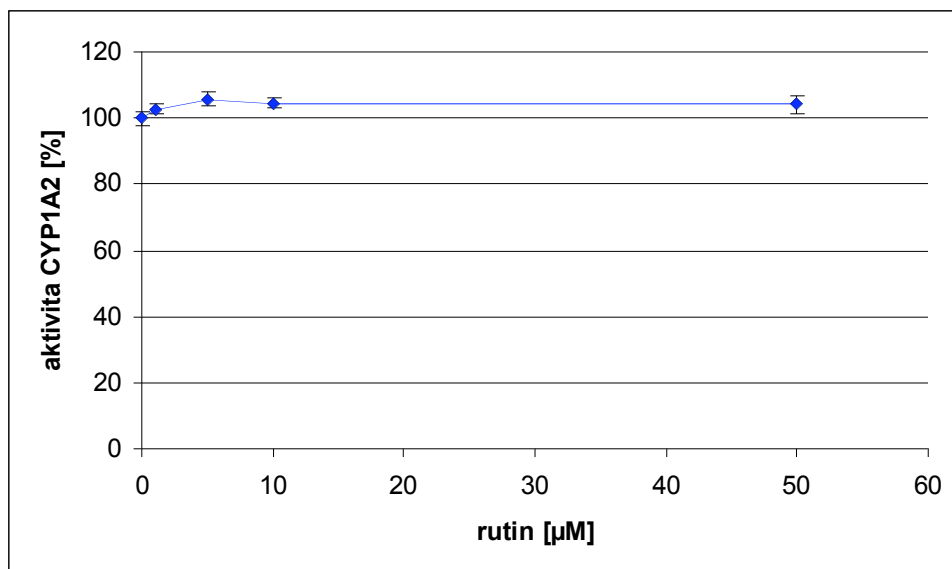


**Obr. 16:** Vliv rutinu na aktivitu CYP1A1 v buněčné linii LS174T



**Tab. 13:** Vliv rutinu na aktivitu CYP1A2 v buněčné linii LS174T

rutin [ $\mu\text{M}$ ]	0	1	5	10	50
aktivita CYP1A2 [%] $\pm$ SD	100,0 $\pm$ 2,1	102,6 $\pm$ 1,5	105,7 $\pm$ 2,0	104,4 $\pm$ 1,5	104,1 $\pm$ 2,6

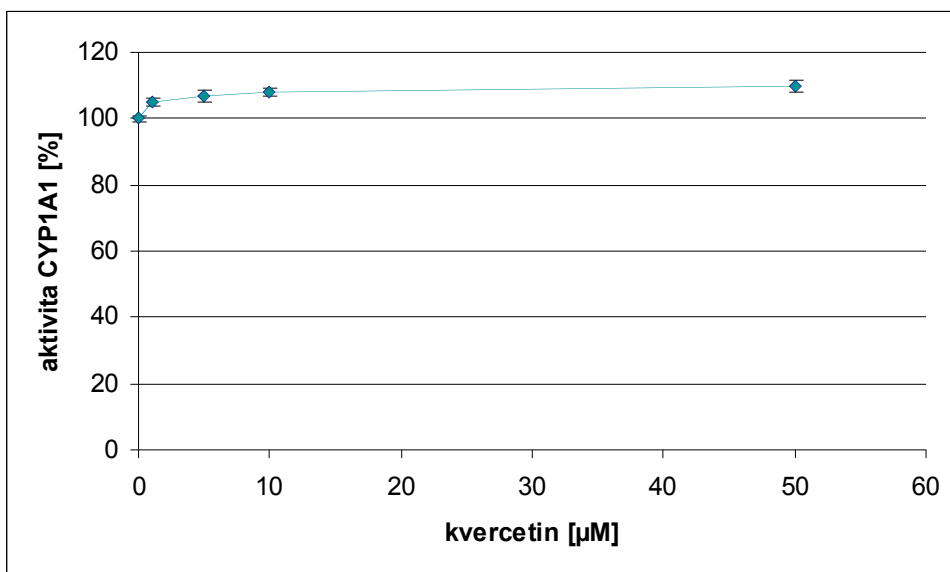
**Obř. 17:** Vliv rutinu na aktivitu CYP1A2 v buněčné linii LS174T

Podle uvedených výsledků se zdá, že rutin mírně zvyšuje jak CYP1A1 tak CYP1A2 aktivitu v buněčné linii LS174T. Toto zvýšení je však příliš nízké, aby se dalo mluvit o indukci.

### 5.2.2. Kvercetin

**Tab. 14:** Vliv kvercetinu na aktivitu CYP1A1 v buněčné linii LS174T

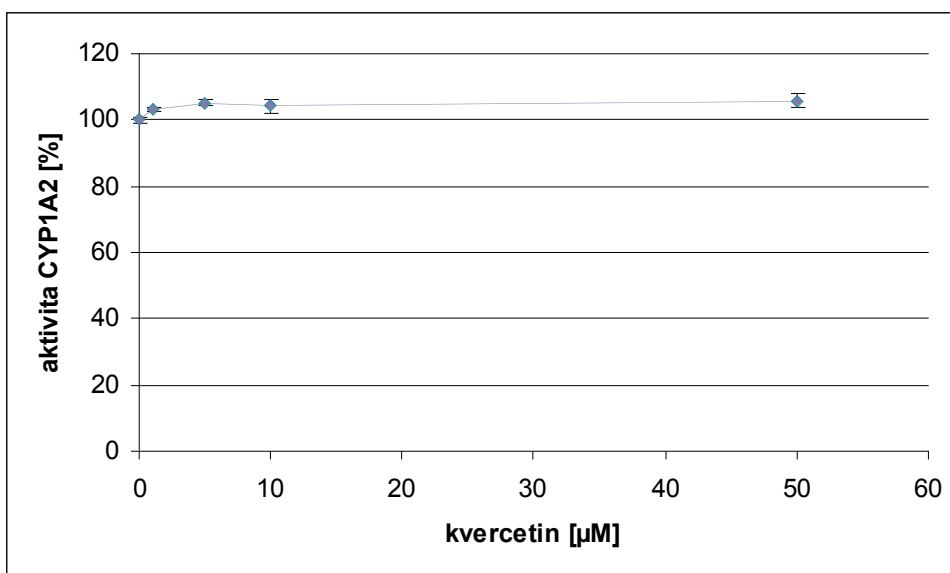
kvercetin [ $\mu\text{M}$ ]	0	1	5	10	50
aktivita CYP1A1 [%] $\pm$ SD	100,0 $\pm$ 1,0	105,1 $\pm$ 1,1	106,8 $\pm$ 1,7	108,1 $\pm$ 1,2	109,8 $\pm$ 1,5



**Obr. 18:** Vliv kvercetinu na aktivitu CYP1A1 v buněčné linii LS174T

**Tab. 15:** Vliv kvercetinu na aktivitu CYP1A2 v buněčné linii LS174T

quercetin [μM]	0	1	5	10	50
aktivita CYP1A2 [%] ± SD	100,0 ± 0,9	103,2 ± 0,6	105,3 ± 1,1	104,3 ± 2,0	105,9 ± 2,2



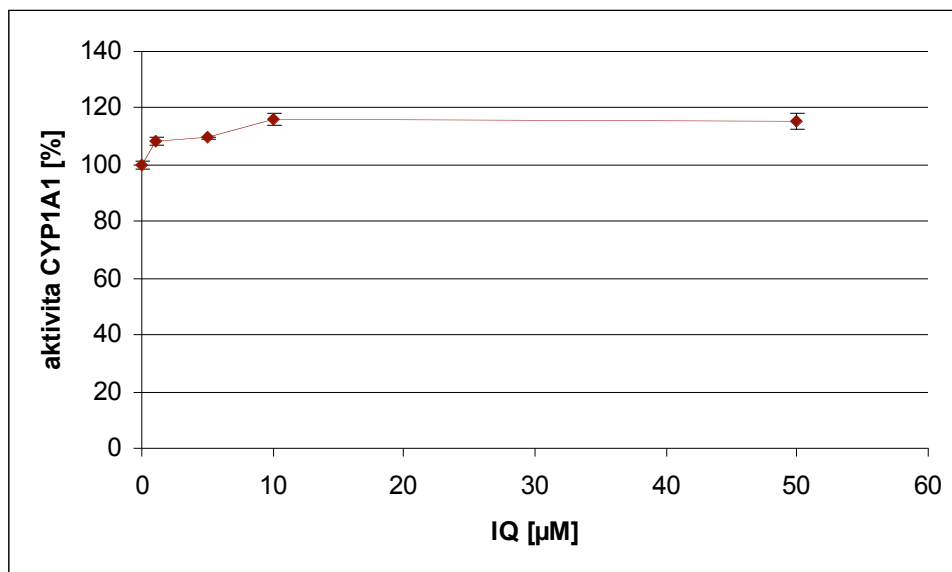
**Obr. 19:** Vliv kvercetinu na aktivitu CYP1A2 v buněčné linii LS174T

Výsledky EROD i MROD testu ukazují, že kvercetin mírně zvyšuje aktivitu CYP1A (do 10%) v buněčné linii LS174T.

### 5.2.3. IQ

**Tab. 16:** Vliv IQ na aktivitu CYP1A1 v buněčné linii LS174T

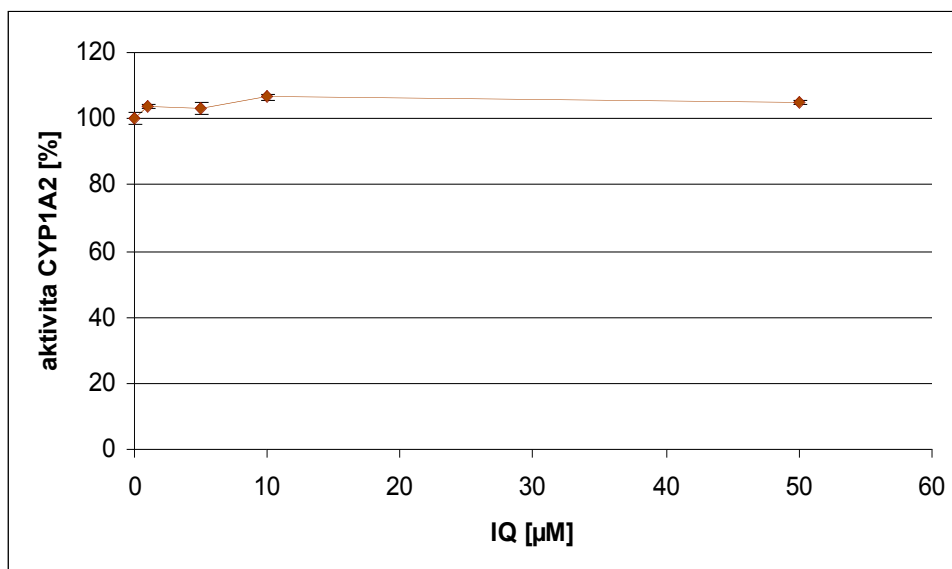
IQ [ $\mu\text{M}$ ]	0	1	5	10	50
aktivita CYP1A1 [%] $\pm$ SD	100,0 $\pm$ 1,5	108,4 $\pm$ 1,5	109,5 $\pm$ 0,3	116,1 $\pm$ 2,1	115,5 $\pm$ 3,0



**Obr. 20:** Vliv IQ na aktivitu CYP1A1 v buněčné linii LS174T

**Tab. 17:** Vliv IQ na aktivitu CYP1A2 v buněčné linii LS174T

IQ [ $\mu\text{M}$ ]	0	1	5	10	50
aktivita CYP1A2 [%] $\pm$ SD	100,0 $\pm$ 1,8	103,9 $\pm$ 0,7	103,2 $\pm$ 1,7	106,5 $\pm$ 0,9	105,0 $\pm$ 0,5



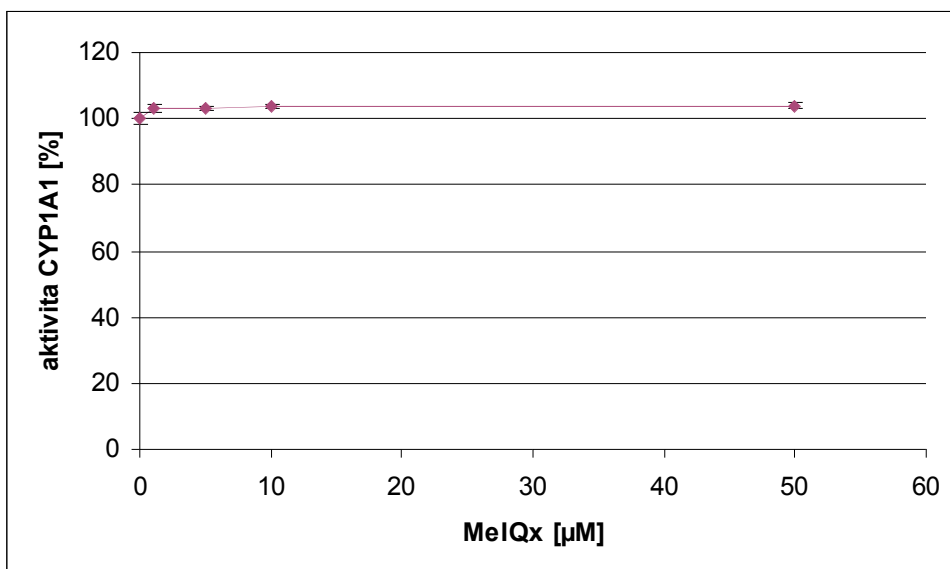
**Obr. 21:** Vliv IQ na aktivitu CYP1A2 v buněčné linii LS174T

Výsledky EROD testu ukazují zvýšené množství resorufinu asi o 15% po 48 hod expozici buněk 10 a 50 μM IQ v inkubační směsi v buněčné linii LS174T a výsledky MROD testu ukazují zvýšené množství resorufinu o 5% při expozici buněk 10 a 50 μM IQ v inkubační směsi v buněčné linii LS174T.

#### 5.2.4. MeIQx

**Tab. 18:** Vliv MeIQx na aktivitu CYP1A1 v buněčné linii LS174T

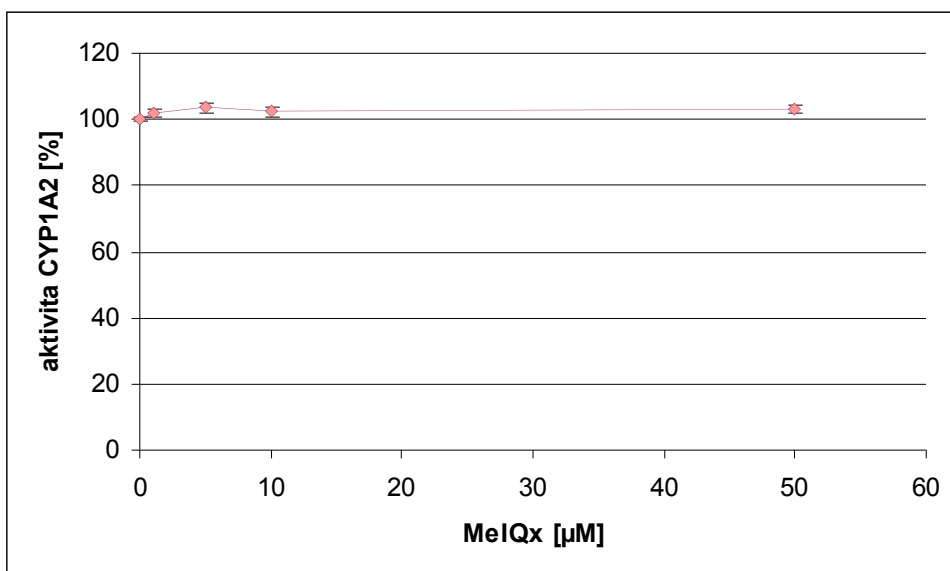
MeIQx [μM]	0	1	5	10	50
aktivita CYP1A1 ± SD	100,0 ± 1,9	102,9 ± 1,3	103,1 ± 0,8	103,5 ± 0,6	103,9 ± 0,8



**Obr. 22:** Vliv MelQx na aktivitu CYP1A1 v buněčné linii LS174T

**Tab. 19:** Vliv MelQx na aktivitu CYP1A2 v buněčné linii LS174T

MelQx [µM]	0	1	5	10	50
aktivita CYP1A2 ± SD	100,0 ± 0,8	101,9 ± 1,1	103,5 ± 1,3	102,3 ± 1,6	103,2 ± 1,0



**Obr. 23:** Vliv MelQx na aktivitu CYP1A2 v buněčné linii LS174T

Z výsledků je patrné, že MelQx nemá vliv na aktivitu CYP1A v buněčné linii LS174T.

### 5.3. POROVNÁNÍ VLIVU RUTINU, KVERCETINU, IQ A MEIQX S VLIVEM $\beta$ -NF A TCDD NA AKTIVITU CYP1A V BUNĚČNÉ LINII LS174T

Protože předchozí výsledky nejsou jednoznačné, byly provedeny následující pokusy s pozitivní kontrolou  $\beta$ -NF a TCDD, jako známými induktory CYP1A. Pokusy byly provedeny shodně s návodem v kapitole 4.2.3., jen koncentrace 10  $\mu$ M testované látky byla nahrazena buď 50  $\mu$ M  $\beta$ -NF [130] nebo 1nM TCDD [131].

**Tab. 20:** Vliv rutinu, kvercetin, IQ, MeIQx,  $\beta$ -NF a TCDD na aktivitu CYP1A1 v buněčné linii LS174T

EROD [ $\mu$ M]	aktivita CYP1A1 [%] $\pm$ SD					
	0	1	5	50	1 nM TCDD	50 $\mu$ M $\beta$ -NF
rutin	100,0 $\pm$ 2,2	105,6 $\pm$ 2,6	108,3 $\pm$ 3,3	108,8 $\pm$ 1,6	1571,0 $\pm$ 189,1	
kvercetin	100,0 $\pm$ 2,0	108,0 $\pm$ 2,9	107,8 $\pm$ 1,9	113,3 $\pm$ 2,0		200,8 $\pm$ 11,5
IQ	100,0 $\pm$ 1,7	117,2 $\pm$ 3,2	155,5 $\pm$ 4,6	161,8 $\pm$ 9,0		197,9 $\pm$ 18,7
MeIQx	100,0 $\pm$ 2,4	104,6 $\pm$ 1,9	106,4 $\pm$ 1,8	111,4 $\pm$ 1,1	1227,1 $\pm$ 112,1	

**Tab. 21:** Vliv rutinu, kvercetin, IQ, MeIQx,  $\beta$ -NF a TCDD na aktivitu CYP1A2 v buněčné linii LS174T

MROD [ $\mu$ M]	aktivita CYP1A2 [%] $\pm$ SD					
	0	1	5	50	1 nM TCDD	50 $\mu$ M $\beta$ -NF
rutin	100,0 $\pm$ 1,4	105,5 $\pm$ 2,6	105,9 $\pm$ 1,7	106,3 $\pm$ 2,3	919,4 $\pm$ 139,2	
kvercetin	100,0 $\pm$ 1,9	104,5 $\pm$ 1,2	106,4 $\pm$ 1,8	106,9 $\pm$ 1,9		117,6 $\pm$ 5,4
IQ	100,0 $\pm$ 1,6	107,4 $\pm$ 1,8	112,7 $\pm$ 4,3	124,4 $\pm$ 4,1		123,7 $\pm$ 6,5
MeIQx	100,0 $\pm$ 2,8	100,3 $\pm$ 2,2	103,5 $\pm$ 1,7	103,9 $\pm$ 2,6	685,3 $\pm$ 63,2	

Z těchto výsledků vyplývá, že rutin, kvercetin a MeIQx nemají žádný vliv na aktivitu CYP1A ve srovnání s prokázaným induktorem TCDD. Zajímavé jsou výsledky vlivu IQ, které se dají srovnávat s vlivem  $\beta$ -NF, kdy vzniklo 1,6krát vyšší množství resorufinu oproti kontrole v testu EROD, vlivem  $\beta$ -NF množství resorufinu bylo dvojnásobné. V testu MROD byl vliv IQ a  $\beta$ -NF zcela srovnatelný, množství resorufinu bylo 1,2krát vyšší oproti kontrole. IQ i v předchozích pokusech (kapitola 5.2.3.), bez pozitivní kontroly, zvýšil aktivitu CYP1A, ale ne tak výrazně.

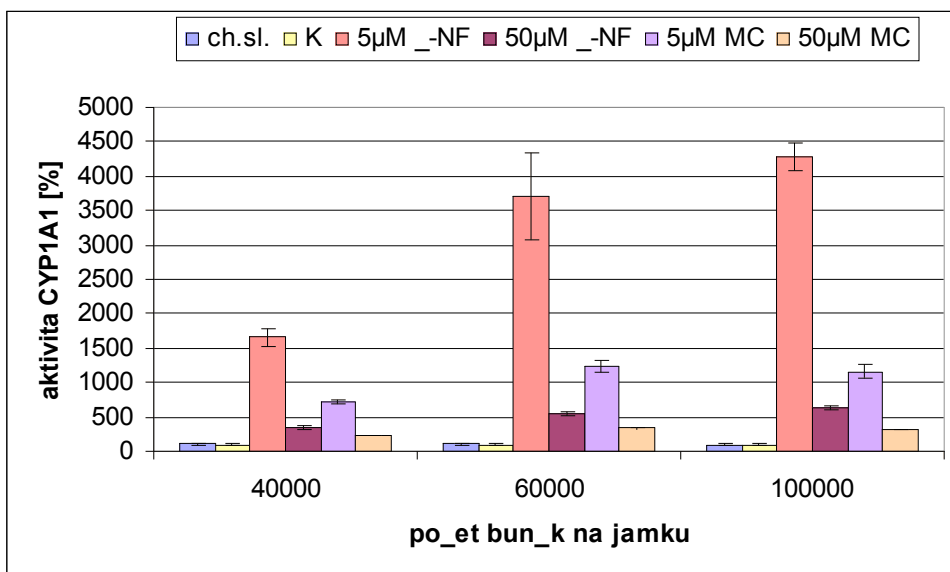
#### 5.4. VLIV POČTU BUNĚK NA JAMKU A URČENÍ VHODNÉ KONCENTRACE INDUKTORU $\beta$ -NF A MC U HCT-8 BUNĚČNÉ LINIE

Buňky HCT-8 buněčné linie byly naředěny podle návodu v kapitole 4.2.2.1 na 40, 60, a 100 tisíc buněk na jamku v mikrotitrační destičce a nechaly se narůst 72 hodin [132]. Dále se podle kapitoly 4.2.3. provedl EROD a MROD test, ale expozice trvala 24 hodin.

Testované látky byly na mikrotitrační destičce každá látka v jednom řádku v pěti jamkách pro EROD test a v pěti jamkách pro MROD test. Výsledky jsou uváděny jako průměry z pěti hodnot. Kontrola (K) byla ve dvou řádcích, v prvním a uprostřed. Všechny výsledky jsou vztaženy k průměru z deseti hodnot kontroly. Chemický slepý vzorek (ch. sl.) je průměrná hodnota z pěti jamek, které obsahovaly 100  $\mu$ l inkubačního média pro test EROD a MROD aktivity (v obvodových jamkách). Pro každý počet buněk na jamku (40, 60, 100 tisíc) byla samostatná mikrotitrační destička.

**Tab. 22:** Vliv počtu buněk a určení koncentrace induktoru v buněčné linii HCT-8, EROD test

EROD	aktivita CYP1A1 [%] $\pm$ SD		
počet buněk	40 000	60 000	100 000
ch. sl.	101,6 $\pm$ 1,6	101,1 $\pm$ 3,0	98,7 $\pm$ 2,9
K	100,0 $\pm$ 2,8	100,0 $\pm$ 3,7	100,0 $\pm$ 1,9
5 $\mu$ M $\beta$ -NF	1654,7 $\pm$ 135,9	3707,4 $\pm$ 641,2	4273,3 $\pm$ 198,0
50 $\mu$ M $\beta$ -NF	342,2 $\pm$ 21,0	551,6 $\pm$ 21,5	628,5 $\pm$ 28,3
5 $\mu$ M MC	721,5 $\pm$ 17,8	1235,9 $\pm$ 99,7	1163,7 $\pm$ 93,2
50 $\mu$ M MC	228,8 $\pm$ 10,0	332,8 $\pm$ 7,6	313,1 $\pm$ 6,1

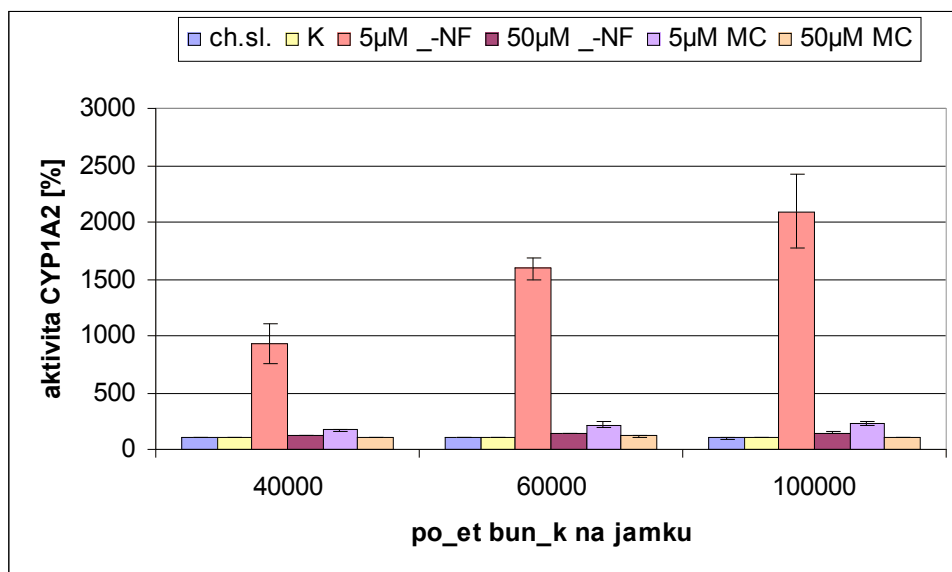


**Obr. 24:** Vliv počtu buněk a určení koncentrace induktoru v buněčné linii HCT-8, EROD test

**Tab. 23:** Vliv počtu buněk a určení koncentrace induktoru v buněčné linii HCT-8, MROD test

MROD	aktivita CYP1A2 [%] ± SD		
	40 000	60 000	100 000
počet buněk			
ch.sl.	102,9 ± 1,2	101,3 ± 2,8	99,2 ± 3,1
K	100,0 ± 3,1	100,0 ± 3,0	100,0 ± 2,8
5µM β-NF	922,5 ± 175,5	1591,3 ± 94,8	2089,6 ± 322,7
50µM β-NF	122,0 ± 4,2	138,5 ± 2,2	145,3 ± 8,6
5µM MC	171,9 ± 7,2	217,7 ± 23,4	221,8 ± 18,7
50µM MC	109,8 ± 1,7	115,7 ± 2,1	111,9 ± 1,6





**Obr. 25:** Vliv počtu buněk a určení koncentrace induktoru v buněčné linii HCT-8, MROD test

Z výsledků vyplynulo, že indukce u 40 000 buněk na jamku byla nižší a u 60 000 a 100 000 už téměř stejná, tak se dál používala koncentrace 60 000 buněk na jamku. Oba induktory se nechaly působit na buňky HCT-8 buněčné linie ve dvou koncentracích 5 a 50 µM. Koncentrace 5 µM β-NF způsobila vyšší indukci, tak se dál použila jako pozitivní kontrola.

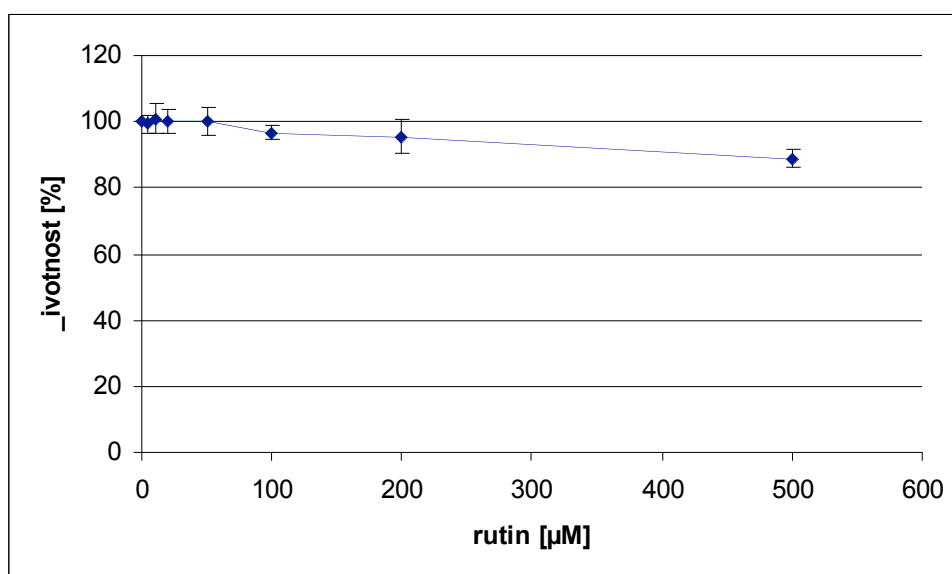
## 5.5. CYTOTOXICITA RUTINU, KVERCETINU, IQ A MEIQX PRO BUNĚČNOU LINII HCT-8

Cytotoxicita byla měřena testem Neutral Red uptake, který byl popsán v kapitole 4.2.2 při koncentraci 60 tisíc buněk na jamku.

### 5.5.1. Rutin

**Tab. 24:** Cytotoxicita rutinu pro HCT-8 buněčnou linií

rutin [ $\mu\text{M}$ ]	životnost [%] $\pm$ SD
0	100,0 $\pm$ 0,1
5	99,2 $\pm$ 2,5
10	100,8 $\pm$ 4,5
20	100,1 $\pm$ 3,6
50	100,0 $\pm$ 4,1
100	96,7 $\pm$ 2,3
200	95,5 $\pm$ 5,3
500	88,9 $\pm$ 2,8



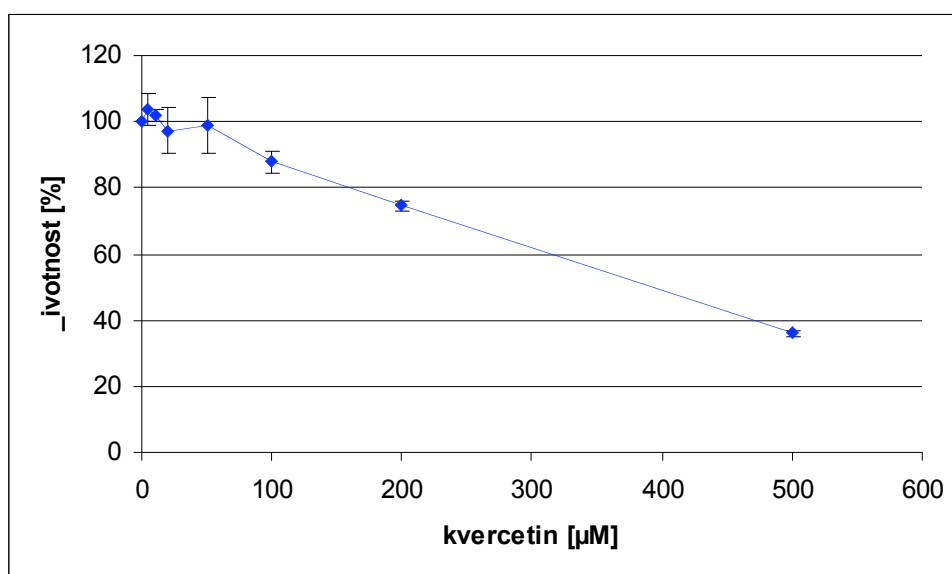
**Obr. 26:** Cytotoxicita rutinu pro HCT-8 buněčnou linií

Rutin je v testovaných koncentracích netoxický pro buněčnou linií HCT-8. Až při koncentraci 500  $\mu\text{M}$  ubylo 10% buněk.

### 5.5.2. Kvercetin

**Tab. 25:** Cytotoxicita kvercetinu pro HCT-8 buněčnou linii

kvercetin [ $\mu\text{M}$ ]	životnost [%] $\pm$ SD
0	100,0 $\pm$ 0,1
5	103,8 $\pm$ 4,8
10	101,8 $\pm$ 1,9
20	97,3 $\pm$ 7,0
50	98,8 $\pm$ 8,4
100	87,8 $\pm$ 3,1
200	74,6 $\pm$ 1,6
500	36,0 $\pm$ 1,0



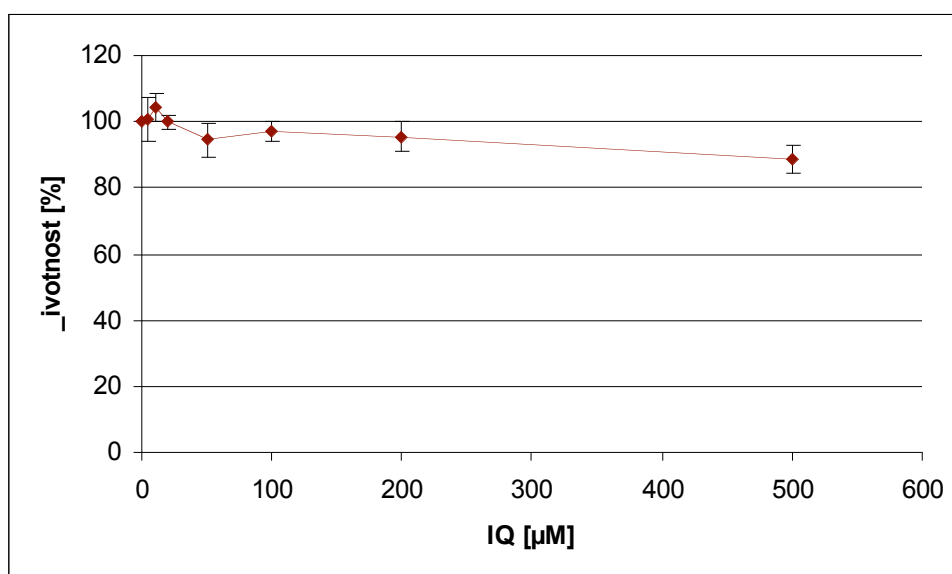
**Obr. 27:** Cytotoxicita kvercetinu pro HCT-8 buněčnou linii

Kvercetin je pro buňky HCT-8 cytotoxický při koncentracích nad 50  $\mu\text{M}$ . Při koncentraci 100  $\mu\text{M}$  ubylo 10% buněk, při koncentraci 200  $\mu\text{M}$  ubylo 25% buněk a při koncentraci 500  $\mu\text{M}$  žilo už jen 36% buněk.

### 5.5.3. IQ

**Tab. 26:** Cytotoxicita IQ pro HCT-8 buněčnou linii

IQ [ $\mu\text{M}$ ]	životnost [%] $\pm$ SD
0	100,0 $\pm$ 0,1
5	100,8 $\pm$ 6,8
10	104,4 $\pm$ 4,2
20	100,0 $\pm$ 2,2
50	94,5 $\pm$ 5,2
100	96,8 $\pm$ 3,0
200	95,5 $\pm$ 4,6
500	88,6 $\pm$ 4,3



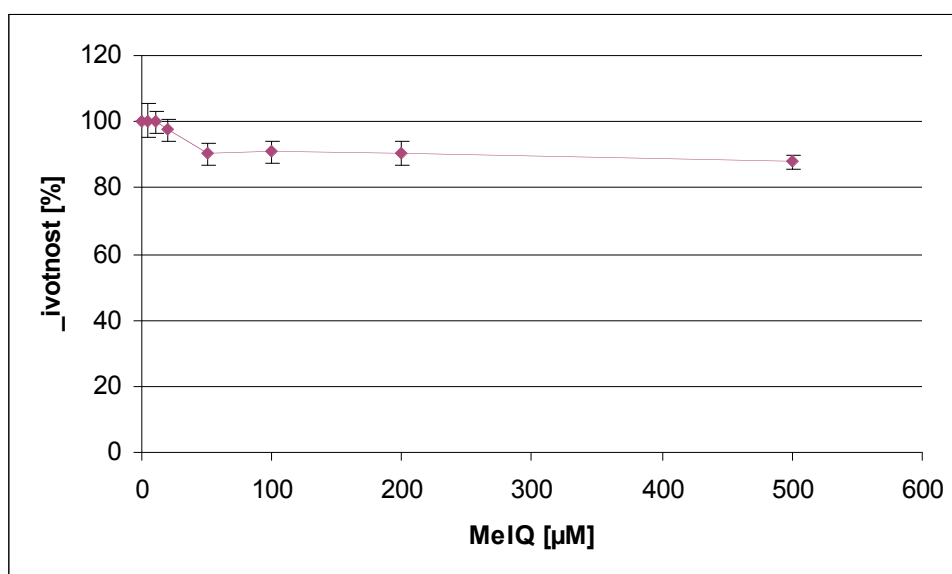
**Obř. 28:** Cytotoxicita IQ pro HCT-8 buněčnou linii

IQ je pro HCT-8 buňky v použitých koncentracích netoxický, jen při koncentraci 500  $\mu\text{M}$  ubylo 10% buněk.

#### 5.5.4. MeIQx

**Tab. 27:** Cytotoxicita MeIQx pro HCT-8 buněčnou linii

MeIQx [ $\mu$ M]	životnost [%] $\pm$ SD
0	100,0 $\pm$ 0,1
5	100,4 $\pm$ 4,9
10	99,8 $\pm$ 3,2
20	97,5 $\pm$ 3,4
50	90,2 $\pm$ 3,2
100	90,9 $\pm$ 3,2
200	90,3 $\pm$ 3,7
500	87,9 $\pm$ 2,1



**Obř. 29:** Cytotoxicita MeIQx pro HCT-8 buněčnou linii

MeIQx není pro buňky HCT-8 příliš cytotoxický, při koncentracích 50  $\mu$ M až 500  $\mu$ M MeIQx ubylo 10% buněk.

## 5.6. POROVNÁNÍ VLIVU RUTINU, KVERCETINU, IQ A MEIQX S VLIVEM $\beta$ -NF NA AKTIVITU CYP1A V BUNĚČNÉ LINII HCT-8

Jako u buněčné linie LS174T byl testován vliv rutinu, kvercetinu, IQ a MeIQx na aktivitu CYP1A. Pro srovnání byl použit jako pozitivní kontrola  $\beta$ -NF v koncentraci 5  $\mu$ M, což vyplynulo z výsledků z kapitoly 5.4.

Pokusy byly provedeny podle návodu v kapitole 4.2.3., ale na mikrotitrační destičce měla každá koncentrace svůj řádek, pět jamek s ER pro EROD test a pět jamek s MR pro MROD test. Pro každou z testovaných látek byla samostatná mikrotitrační destička. Uvedené výsledky jsou průměry z pěti jamek.

**Tab. 28:** Vliv rutinu, kvercetinu, IQ, MeIQx a  $\beta$ -NF na aktivitu CYP1A1 v buněčné linii HCT-8

EROD [ $\mu$ M]	aktivita CYP1A1 [%] $\pm$ SD			
	rutin	kvercetin	IQ	MeIQx
0	100,0 $\pm$ 1,2	100,0 $\pm$ 3,4	100,0 $\pm$ 1,5	100,0 $\pm$ 1,9
1	98,6 $\pm$ 1,2	117,5 $\pm$ 4,9	98,8 $\pm$ 3,5	98,4 $\pm$ 6,2
5	98,8 $\pm$ 2,0	97,6 $\pm$ 2,1	106,2 $\pm$ 3,1	95,0 $\pm$ 3,2
10	103,6 $\pm$ 6,8	99,1 $\pm$ 3,1	113,2 $\pm$ 2,6	97,0 $\pm$ 0,9
50	100,1 $\pm$ 1,1	103,6 $\pm$ 2,8	111,3 $\pm$ 3,1	97,3 $\pm$ 0,8
5 $\mu$ M $\beta$ -NF	2168,5 $\pm$ 188,7	3249,5 $\pm$ 713,4	4099,7 $\pm$ 610,1	3736,8 $\pm$ 573,6

**Tab. 29:** Vliv rutinu, kvercetinu, IQ, MeIQx a  $\beta$ -NF na aktivitu CYP1A2 v buněčné linii HCT-8

MROD [ $\mu$ M]	aktivita CYP1A2 [%] $\pm$ SD			
	rutin	kvercetin	IQ	MeIQx
0	100,0 $\pm$ 2,3	100,0 $\pm$ 1,7	100,0 $\pm$ 1,3	100,0 $\pm$ 1,4
1	99,5 $\pm$ 2,9	110,8 $\pm$ 3,9	101,3 $\pm$ 0,6	96,3 $\pm$ 1,2
5	102,1 $\pm$ 2,4	97,4 $\pm$ 1,7	103,0 $\pm$ 2,6	97,8 $\pm$ 1,4
10	98,6 $\pm$ 1,1	98,2 $\pm$ 1,5	106,6 $\pm$ 1,2	96,0 $\pm$ 2,0
50	103,3 $\pm$ 2,0	101,4 $\pm$ 4,9	105,4 $\pm$ 2,2	97,8 $\pm$ 0,5
5 $\mu$ M $\beta$ -NF	1278,8 $\pm$ 113,5	1244,2 $\pm$ 201,9	1658,9 $\pm$ 412,5	1605,0 $\pm$ 160,5

Výsledky ukazují, že žádná z testovaných látek nemá vliv na aktivitu CYP1A, na rozdíl od  $\beta$ -NF, který zvýšil množství vzniklého resorufinu v EROD testu asi 33x a MROD testu asi 14x.

## 6. DISKUSE

Úkolem této práce bylo zjistit vliv flavonoidů na metabolismus xenobiotik. S ohledem na velkou šíři tématu bylo třeba toto zadání trochu konkretizovat. Proto jsme se zaměřili na nejběžněji se vyskytující flavonoidy rutin a kvercetin. Při běžné domácí přípravě masa a ryb vznikají potenciálně karcinogenní heterocyklické aromatické aminy (HAA) [2] a bylo by žádoucí, kdyby vhodnou kombinací jídla docházelo ke zrušení tohoto nebezpečného účinku. Proto se jako zástupci HAA testovaly IQ a MeIQx, které jsou jako potenciální prokarcinogeny aktivovány CYP1A na aktivní N-OH aminové metabolity [115, 116].

Jak uvádí Moon et al. flavonoidy indukují nebo inhibují enzymy 1. fáze biotransformace [60], čímž by v případě IQ a MeIQx mohly urychlovat nebo brzdít aktivaci na N-OH aktivní metabolity. Enzymy 1. fáze metabolické přeměny mohou aktivovat prokarcinogeny na karcinogeny, a nebo vytvořením polárnějších metabolitů mohou urychlovat konjugační a tím detoxikační reakce. U enzymů 1. fáze biotransformace je rozhodující, jaký krok metabolické cesty indukce nebo inhibice zasáhne. Jako prevence rakoviny je považována i indukce detoxikačních enzymů 2. fáze biotransformace [60].

Protože se na tomto tématu na katedře biochemických věd farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové zatím prakticky nepracovalo, bylo nutné se tomuto tématu věnovat od základů. Jako testovací model byla zvolena buněčná linie LS174T (lidské epitelové buňky adenokarcinomu tlustého střeva) [122]. Nejdříve bylo potřeba určit cytotoxicitu látek, aby se flavonoidy i HAA používaly při testech na ovlivnění aktivity CYP1A v netoxických koncentracích.

Uvedené flavonoidy a HAA nejsou rozpustné ve vodě. Pro rozpouštění a přípravu roztoků flavonoidů a IQ a MeIQx byl použit pro buňky toxický DMSO. Proto jsme testem cytotoxicity otestovali nejdříve DMSO, které koncentrace jsou pro buňky netoxické, aby nám rozpouštědlo neovlivnilo negativně výsledky. Zjistili jsme, že koncentrace DMSO do 1% (v/v) v inkubační směsi nemá vliv na buňky LS174T buněčné linie. Při našich testech bylo nejvýše 0,5% DMSO v inkubační směsi.

Dále byla testována cytotoxicita rutinu, kvercetinu, IQ a MeIQx v buněčné linii LS174T pomocí neutrální červeně. U rutinu jsme zaznamenali úbytek živých buněk při koncentracích 500 a 1000  $\mu\text{M}$  rutinu v inkubační směsi, u kvercetinu už při 50  $\mu\text{M}$  v inkubační směsi přeživalo asi 90% buněk a při koncentraci nad 200  $\mu\text{M}$  jich už nepřeživalo ani 50%. IQ je v použitých koncentracích netoxický, až při 500  $\mu\text{M}$  IQ v inkubační směsi ubylo 10% buněk. MeIQx je netoxický pro buňky LS174T až při

koncentraci 500  $\mu\text{M}$  MelQx v inkubační směsi jich přežívalo 80%. Proto se v dalších testech používaly koncentrace flavonoidů a HAA do 50  $\mu\text{M}$  v inkubační směsi. Při těchto koncentracích jsou testované látky pro buňky LS174T netoxické. Pouze u kvercetin u koncentracích 50  $\mu\text{M}$  v inkubační směsi začíná ubývat buněk (žije 90 % buněk). Podle Conquera et al. jsou plazmatické koncentrace kvercetin u příjmu 1g kvercetin denně (to je asi dvacetinásobek běžného vegetariánského příjmu) asi 427 ng/ml, to je 1,26  $\mu\text{M}$  [133]. Tudíž plazmatická koncentrace 50  $\mu\text{M}$  kvercetin není za normálních podmínek dosažitelná.

HAA jsou potenciální prokarcinogeny, které musí být aktivovány na karcinogeny. První aktivační krok zahrnuje *N*-oxidaci katalyzovanou hlavně jaterním CYP1A2 [115, 116]. Metabolická aktivace, která vede k porušení DNA, může také nastat přímo v extrahepatální tkáni [2]. Byla popsána indukce CYP1A1 kvercetinem v buněčné linii MCF-7. Výsledkem bylo na koncentraci a čase závislé vzrůstající množství CYP1A1 mRNA. Aktivita CYP1A1 byla měřena 7-ethoxyresorufin-*O*-dealkylační (EROD) zkouškou. Zvýšení EROD aktivity následovalo po zvýšení CYP1A1 mRNA [68]. Kvercetin sice zvýší množství CYP1A1 mRNA, naopak však významně inhibuje benzo(a)pyrenem naindukovanou CYP1A1 mRNA a proteinovou expresi v lidských HepG2 buňkách [70]. Obach uvádí, že kvercetin z třezalky inhibuje CYP1A2 (fenacetin *O*-deethylasovou aktivitu s  $\text{IC}_{50} = 7,5 \mu\text{M}$ ) [69].

EROD a MROD testem se zjišťoval vliv flavonoidů i IQ a MelQx po 48 hodinové expozici na aktivitu CYP1A1 a CYP1A2 v buněčné linii LS174T. Rutin mírně zvyšoval aktivitu CYP1A1 a CYP1A2, avšak do 5%, tudíž příliš nízká změna, než aby měla jakýkoliv význam. Kvercetin mírně zvyšoval aktivitu CYP1A1 do 10% a CYP1A2 do 5% v buněčné linii LS174T. Výsledky EROD testu ukazují zvýšené množství resorufinu asi o 15% po 48 hod expozici buněk 10 a 50  $\mu\text{M}$  IQ v inkubační směsi a výsledky MROD testu ukazují zvýšené množství resorufinu o 5% při expozici buněk 10 a 50  $\mu\text{M}$  IQ v inkubační směsi. Z výsledků EROD/MROD testu je patrné, že MelQx nemá vliv na CYP1A v buněčné linii LS174T.

Podle literárních odkazů se zdálo, že flavonoidy budou mít vliv na aktivitu CYP1A, ale naše výsledky tento předpoklad nepotvrdily, ukázaly pouze mírné zvýšení aktivity CYP1A. Proto byly provedeny testy EROD/MROD znovu s pozitivní kontrolou známými induktory CYP1A  $\beta$ -NF a TCDD, pro porovnání indukce. Použitím klasických induktorů CYP1A v buněčné linii LS174T jsme si ověřili, že CYP1A je v této linii exprimován a podléhá indukci. TCDD (1 nM) zvyšuje EROD aktivitu asi 14x, MROD aktivitu asi 8x, druhý z použitých iduktorů,  $\beta$ -NF (50  $\mu\text{M}$ ), zvyšuje EROD aktivitu pouze 2x a MROD aktivitu jen 1,2x. Tabulky 20 a 21 ukazují už snáze reprodukovatelné výsledky. Prakticky rutin, kvercetin a MelQx nemají v porovnání se známými induktory



žádný vliv na CYP1A. Zajímavé jsou výsledky IQ, které v těchto testech vycházejí téměř srovnatelně s indukcí 50  $\mu\text{M}$   $\beta\text{-NF}$ , dochází k 1,6 násobnému zvýšení EROD aktivity vlivem IQ, 2x se zvýšila aktivita EROD vlivem  $\beta\text{-NF}$  a u MROD došlo v obou případech k 1,2 násobnému zvýšení aktivity. Předchozí testy bez pozitivní kontroly, však vykazovaly nižší indukci.

Následující pokusy ukázaly, že je vhodnější použití  $\beta\text{-NF}$  jako pozitivní kontroly v koncentraci 5  $\mu\text{M}$ , kdy je dosaženo mnohem výraznější zvýšení aktivity CYP1A – EROD aktivity se zvýší až 37x, MROD aktivity až 16x. Indukce aktivity CYP1A 5  $\mu\text{M}$   $\beta\text{-NF}$  už s indukčním vlivem testovaných látek srovnatelná není. Z dosažených výsledků je zřejmé, že klasické induktory CYP1A  $\beta\text{-NF}$  a TCDD mají na aktivitu CYP1A v LS174T linii mnohem vyšší indukční vliv než všechny testované látky.

Buněčné linie slouží jako modelové systémy pro testování různých látek a jejich vlivu na organismus. A protože žádný model není dokonalý, chtěli jsme potvrdit získané výsledky na jiné buněčné linii. Protože předchozí pokusy naznačily, že výsledky by mohly být ovlivněny počtem buněk na jamku, byla hledána vhodná koncentrace buněk HCT-8 buněčné linie (lidské epitelové buňky kolorektálního adenokarcinomu) [123] na jamku mikrotitrační destičky. Koncentrace klasických induktorů CYP1A,  $\beta\text{-NF}$  a MC, byla testována na mikrotitračních destičkách s různým počtem buněk. Z výsledků vyplynulo, že indukce u 40 000 buněk na jamku byla nižší a u 60 000 a 100 000 už téměř stejná, tak se dál používala koncentrace 60 000 buněk na jamku. Dva prokázané induktory  $\beta\text{-NF}$  a MC jsme nechali působit na buňky ve dvou koncentracích 5  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ . Koncentrace 5  $\mu\text{M}$  způsobila vyšší indukci, tak se dál použila jako pozitivní kontrola koncentrace 5  $\mu\text{M}$   $\beta\text{-NF}$ .

Stejně jako na linii LS174T jsme i na HCT-8 buněčné linii provedli testy cytotoxicity flavonoidů rutin a kvercetin a HAA IQ a MeIQx, které vyšly obdobně jako na LS174T buněčné linii. Rutin byl v testovaných koncentracích netoxický, až při koncentraci 500  $\mu\text{M}$  ubylo 10% buněk. Kvercetin byl cytotoxický při koncentracích nad 100  $\mu\text{M}$ . Při koncentraci 100  $\mu\text{M}$  ubylo 10% buněk, při koncentraci 200  $\mu\text{M}$  ubylo 25% buněk a při koncentraci 500  $\mu\text{M}$  žilo už jen 36% buněk. Kvercetin je pro buněčnou linii LS174T toxičtější v nižších koncentracích než pro buněčnou linii HCT-8. IQ byl pro HCT-8 buňky v použitých koncentracích netoxický, jen při koncentraci 500  $\mu\text{M}$  ubylo 10% buněk. Ani MeIQx není pro buňky HCT-8 moc cytotoxický, při koncentracích 50  $\mu\text{M}$  až 500  $\mu\text{M}$  MeIQx v inkubační směsi ubylo 10% buněk.

Na buněčné linii HCT-8 jsme také provedli EROD a MROD testy pro zjištění vlivu testovaných látek na CYP1A současně s pozitivní kontrolou  $\beta\text{-NF}$ . Ta nám usnadnila reprodukovat výsledky, které ukázaly, že žádná z testovaných látek nemá

vliv na CYP1A oproti  $\beta$ -NF, který zvýšil množství resorufinu v EROD testu asi 33x a v MROD testu asi 14x.

Naše výsledky na buněčné linii LS174T ani HCT-8 nepotvrdily literaturou uváděnou indukci CYP1A1 kvercetinem, která však byla zjištěna na buněčné linii MCF-7 [68]. Nepotvrdily ani inhibici CYP1A2 popsanou u kvercetinu z třezalky na enzymových preparátech [69]. U buněčné linie HCT-8 se nepotvrdila indukce CYP1A HAA IQ, která byla naměřena na buněčné linii LS174T. Indukce CYP1A IQ v buněčné linii LS174T je dost nízká (aktivita EROD se zvýšila 1,6x, MROD 1,2x) a při prvních pokusech byla ještě nižší, proto nelze předpokládat, že by bylo možné testovat inhibici této indukce rutinem nebo kvercetinem. Pokud by docházelo k inhibici CYP1A naindukovaného IQ flavonoidy, potvrdil by se protektivní účinek flavonoidů snižováním vzniku aktivních karcinogenů z prokarcinogenů. U obou testovaných linií však ani rutin ani kvercetin neměl inhibiční vliv na aktivitu CYP1A.

Protože nelze všechny testy provádět *in vivo* na lidech, používají se buněčné linie. Bohužel ne všechny výsledky mohou být přímo převedeny na člověka, jak uvádí Oscarson et al., kteří provedli shodné pokusy *in vivo* a *in vitro* na buněčné linii LS174T [92] a kapitola 2.4.3. Přestože se indukce ani inhibice CYP1A na námi použitých buněčných liniích kvercetinem ani rutinem nepotvrdila, není zatím vyloučená *in vivo* indukce nebo inhibice těmito flavonoidy.

Jako protektivní účinek flavonoidů proti rakovině je však považována také indukce enzymů 2. fáze biotransformace. HAA jsou po N-oxidaci konjugovány na glukuronidy a dále transportovány [2]. Byla popsána indukce UGT1A1 kvercetinem [79]. Ta by mohlo také ovlivnit vzájemné působení těchto látek v organismu. Přestože naše výsledky nepotvrdily předpoklad vzájemného ovlivnění flavonoidů a HAA na úrovni CYP1A ve zvolených buněčných liniích, je toto téma velmi široké, zajímavé a zdá se perspektivní. Bylo by zajímavé v něm pokračovat.

## 7. ZÁVĚR

Flavonoidy rutin a kvercetin a heterocyklické aromatické aminy IQ a MeIQx nejsou pro buněčnou linii LS174T ani pro buněčnou linii HCT-8 cytotoxické do koncentrace 50  $\mu\text{M}$  v inkubační směsi. Kvercetin je ve vyšších koncentracích cytotoxický. Kvercetin je toxičtější pro buněčnou linii LS174T v nižších koncentracích než v buněčné linii HCT-8.

CYP1A, aktivační enzym IQ a MeIQx, není ovlivněn koncentracemi do 50  $\mu\text{M}$  rutinu, kvercetinu a MeIQx v buněčné linii LS174T ani HCT-8. IQ zvyšuje aktivitu CYP1A1 1,6krát a CYP1A2 1,2krát v buněčné linii LS174T. K tomuto zvýšení aktivity v buněčné linii HCT-8 nedošlo.

Přestože nedošlo k ovlivnění aktivity CYP1A působením flavonoidů a heterocyklických aromatických aminů ve zvolených buněčných liniích, není vyloučeno, že se tyto látky mohou navzájem ovlivňovat při metabolických přeměnách v organismu na úrovni CYP, dalších enzymů 1. fáze biotransformace nebo v 2. fázi metabolických přeměn.

## 8. ZKRATKY

ABP	4-aminobiphenyl
AcCoA	acetyl coenzym A
AhR	aryl hydrocarbonový receptor
$\beta$ -NF	$\beta$ -naftoflavon
CYP	cytochrom P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DPBS	phosphátový pufr pro buněčné kultury
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ER	ethoxyresorufin
EROD	7-ethoxyresorufin-O-dealkylace
FBS	fetální telecí sérum
GIT	gastrointestinální trakt
GST	glutathion-S-transferasa
HAA	heterocyklické aromatické aminy
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
Ch. sl.	chemický slepý vzorek
IC <sub>50</sub>	koncentrace, která inhibuje sledovanou aktivitu na 50%
IQ	2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin
K	kontrola
LDL	low density lipoproteins
MC	methylcholantren
MeIQx	2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
MR	methoxyresorufin
MROD	7-methoxyresorufin-O-dealkylace
N-OH	N-hydroxy
PBS	fosfátový pufr
RPMI-1640	médium vyvinuté v Roswell Park Memorial Institutu
SD	směrodatná odchylka od aritmetického průměru
SULT1A1	P-forma fenolsulfotransfersy
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
T-E	trypsin-EDTA
UGT	UDP-glukuronosyl transferasa
VŠCHT	vysoká škola chemicko-technologická

## 9. SEZNAM LITERATURY

[1] Birt, D. F.; Hendrich, S.; Wang, W.: Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 90, 2001, 157-177.

[2] Turesky, R. J.; Lang, N. P.; Butler, M. A.; Teitel C. H.; Kadlubar F. F.: Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. *Carcinogenesis*, 1991, vol. 12, no. 10, 1839-1845.

[3] Harrison, R. G.: Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1907, vol. 4, 140-143.

[4] Gey, G. O.; Coffman, W. D.; Kubicek, M. T.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* 12, 1952, 364-365.

[5] Masters, J. R.: HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews. Cancer*, 2002, vol. 2, no. 4, 315-318.

[6] Langdon, S. P.: *Methods in molecular medicine, vol. 88: Cancer cell culture: Methods and protocols*. Humana Press, Totowa, 2004, 360.

[7] Eagle, H.: Nutrition needs of mammalian cells in culture. *Science*, 1955, vol. 122, 501.

[8] Dulbecco, R. .; Freeman, G.: Plaque formation by the polyoma virus. *Virology*, 1959, vol. 8, 396-397.

[9] Morgan, J. F. .; Morton, H. J.; Parker, R. C.: The nutrition of animal cells in tissue culture. Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1950, vol. 73, 1-8.

[10] Barnes, D., Sato, G.: Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell.*, 1980, vol. 22, no. 3, 649-655.

[11] Barnes, D., Sato, G.: Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Analytical Biochemistry*, 1980, vol. 102, no. 2, 255-270.

[12] Ham, R. G., McKeehan, W. L.: Development of improved media and culture conditions for clonal growth of normal diploid cells. *In Vitro*, 1978, vol. 14, no. 1, 11-22.

- [13] Weaver, V. M., Fischer, A. H., Peterson, O. W., Bissell, M. J.: The importance of the microenvironment in breast cancer progression: recapitulation of mammary tumorigenesis using a unique human mammary epithelial cell model and a three-dimensional culture assay. *Biochemistry and Cell Biology*, 1996, vol. 74, no. 6, 833-851.
- [14] Masters, J. R. W.: Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1, 2000, 233-236.
- [15] Vildová, L.: Vliv vybraných cytostatik na aktivitu cytosolických reduktas karbonylové skupiny v MCF-7 linii. *Diplomová práce*, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, 2008, 10-12.
- [16] [http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/docs/Compound/2-3-1\\_Flavonoidy%20ss.pdf](http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/docs/Compound/2-3-1_Flavonoidy%20ss.pdf) [cit. září 2008].
- [17] [http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/docs/Compound/2-3-2\\_Isoflavonoidy.pdf](http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/docs/Compound/2-3-2_Isoflavonoidy.pdf) [cit. září 2008].
- [18] Skibola, Ch. F.; Smith, M. T.: Potential health impacts of expressive flavonoid intake. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000, Vol. 29, 375-383.
- [19] Moravcová, J.: *Biologicky aktivní přírodní látky*. VŠCHT Praha, 2006, 38-42.
- [20] Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.; Kromhout, D.: Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen elderly study. *Nutrition and cancer*, 1994, vol. 22, no. 2, 175-184.
- [21] Koo, L. C.: Dietary habits and lung cancer risk among Chinese females in Hong Kong who never smoked. *Nutrition and cancer*, 1988, vol. 11, no. 3, 155-172.
- [22] Severson, R. K.; Nomura, A. M. Y.; Grove, J. S.; Stemmermann, G. N.: A prospective study of demographics, diet, and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. *Cancer research* 49, 1989, no. 7, 1857-1860.
- [23] Zheng, W.; Dai, Q.; Custer, L. J.; Shu, X. O.; Wen, W. Q.; Jin, F.; Franke, A. A.: Urinary excretion of isoflavonoids and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 1999, vol. 8, 35-40.
- [24] Deschner, E. E.; Ruperto, J.; Wong G.; Newmark, H. L.: Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*, 1991, vol. 12, no. 7, 1193-1196.

- [25] Deschner, E. E.; Ruperto, J. F.; Wong G. Y.; Newmark, H. L.: The effect of dietary quercetin and rutin on AOM-induced acute colonic epithelial abnormalities in mice fed a high-fat diet. *Nutrition and cancer*, 1993, vol. 20, no. 3, 199-204.
- [26] Makita, H.; Tanaka, T.; Fujitsuka, H.; Tatematsu, N.; Satoh, K.; Hara, A.; Mori, H.: Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis by the dietary flavonoids chalcone, 2-hydroxychalcone, and quercetin. *Cancer research* 56, 1996, 4904-4909.
- [27] Elangovan, V.; Sekar, N.; Govindasamy, S.: Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis. *Cancer Letters*, 1994, vol. 87, no. 1, 107-113.
- [28] Slanina, J. a Táborská, E.: Příklad, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*, 2004, roč. 98, 239-245.
- [29] Jaganath, I. B.; Mullen, W.; Edwards, Ch. A.; Crozier, A.: The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Radical Research*, 2006, vol. 40, no. 10, 1035.
- [30] Andlauer, W.; Stumpf, C.; Fürst, P.: Intestinal absorption of rutin in free and conjugated forms. *Biochemical Pharmacology*, 2001, vol. 62, 369.
- [31] Carbonaro, M.; Grant, G.: Absorption of quercetin and rutin in rat small intestine. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 2005, vol. 49, 178.
- [32] Miksicek, R. J.: Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1995, vol. 201, 44-50.
- [33] Kandaswami, C.; Perkins, E.; Soloniuk, D. S.; Drzewiecki, G.; Middleton, E. Jr.: Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer Letters*, 1991, vol. 56, no. 2, 147-152.
- [34] Piantelli, M.; Rinaldi, A.; Macri, E.; Maggiano, N.; Larocca, L. M.; Scerrati, M.; Roselli, R.; Iocoangeli, M.; Scambia, G.; Capelli, A.; Ranelletti, F. O.: Type II estrogen binding sites and antiproliferative activity of quercetin in human meningiomas. *Cancer*, 1993, vol. 71, 193-198.
- [35] Lee, S. J.; Choi, J. H.; Son, K. H.; Chang, H. W.; Kang, S. S.; Kim, H. P.: Suppression of mouse lymphocyte proliferation in vitro by naturally-occurring bioflavonoids. *Life Sciences*, 1995, vol. 57, 551-558.

- [36] Hosokawa, N.; Hosokawa, Y.; Sakai, T.; Yoshida, M.; Marui, N.; Nishino, H.; Kawai, K.; Aoike, A.: Inhibitory effect of quercetin on the synthesis of a possibly cell-cycle-related 17-kDa protein, in human colon cancer cells. *International Journal of Cancer*, 1990, vol. 45, 1119-1124.
- [37] Yoshida, M.; Yamamoto, M.; Nikaido, T.: Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Research* 52, 1992, 6676-6681.
- [38] Wei, Y.; Zhao, X.; Kariya, Y.; Fukata, H.; Teshigawara, K.; Uchida, A.: Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. *Cancer Research* 54, 1994, 4952-4957.
- [39] Wang, W.; Heideman, L.; Chung, C. S.; Pelling, J. C.; Koehler, K. J.; Birt, D. F.: Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Molecular Carcinogenesis* 28, 2000, 102-110.
- [40] Scalbert, A.; Morand, Ch.; Manach, C.; Rémésy Ch.: Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed. Pharmacother.* 56, 2002, 276-282.
- [41] Duthie, S. J.; Dobson, V. L.: Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack *in vitro*. *European Journal of Nutrition*, 1999, vol. 38, no. 1, 28-34.
- [42] Frankel, E. N.; Kanner, J.; German, J. B.; Parks, E.; Kinsella, J. E.: Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341, 1993, 454-457.
- [43] Talalay, P.: Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Advances in enzyme regulation*, 1989, vol. 28, 237-250.
- [44] Wattenberg, L. W.: Chemoprevention of cancer by naturally occurring and synthetic compounds. In L. W. Wattenberg, M. Lipkin, C. W. Kelloff, G. J. Kelloff (Eds.), *Cancer Chemoprevention*, Boca Raton: CRC Press, 1992, 19-39.
- [45] Talalay, P.; Fahey, J. W.; Holtzclaw, W. D.; Prestera, T.; Zhang, Y.: Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol Letters* 82-83, 1995, 173-179.
- [46] Zhang, Y.; Song, T. T.; Cunnick, J. E., Murphy, P. A.; Hendrich, S.: Daidzein and genistein glucuronides *in vitro* are weakly estrogenic and activate human natural killer cells in nutritionally relevant concentrations. *Journal of Nutrition*, 1999, vol. 129, 399-405.
- [47] Wikipedie, otevřená encyklopedie [online]. 3.1. 2009 dostupné z: <[http://cs.wikipedia.org/wiki/NK\\_bu%C5%88ky](http://cs.wikipedia.org/wiki/NK_bu%C5%88ky)> [cit. leden 2009].



- [48] Maxwell, S.; Cruickshank, A.; Thorpe, G.: Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet*, 1994, vol. 344, 193.
- [49] Serefini, M.; Maiani, G.; Ferro-Luzzi, A.: Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *The Journal of Nutrition*, 1998, vol. 128, 1003.
- [50] Young, J. F.; Nielsen, S. E.; Haraldsdottir, J.; Daneshvar, B.; Lauridsen, S. T.; Knutsen, P.; et al.: Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1999, vol. 69, 87-94.
- [51] Gee, J. M.; Du Pont, M. S.; Rhodes, M. J. C.; Johnson, I. T.: Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free radical biology & medicine*, 1998, vol. 25, 19.
- [52] Hollman, P. C. H.; DeVries J. H. M.; Vanleeuwen, S. D.; Mengelers, M. J. B.; Katan, M. B.: Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1995, vol. 62, 1276.
- [53] Scalbert, A.; Williamson, G.: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 2000, vol. 130, 2073.
- [54] van het Hof, K. H.; Wiseman, S. A.; Yang, C. S.; Tijburg, L. B.: Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1999, vol. 220, no. 4, 203-209.
- [55] Brand, W.; Schutte, M. E.; Williamson, G.; van Zanden, J. J.; Cnubben, N. H. P.; Groten, J. P.; van Bladeren, P. J.; Rietjens, I. M. C. M.: Flavonoid-mediated inhibition of intestinal ABC transporters may affect the oral bioavailability of drugs, food-borne toxic compounds and bioactive ingredients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2006, vol. 60, 508.
- [56] Manach, C.; Morand, C.; Crespy, V.; Demigné, C.; Texier, O.; Régéat, F.; Rémésy, C.: Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Letters*, 1998, vol. 426, 331.
- [57] Zhu, B. T.; Ezell, E. L.; Liehr, J. G.: Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, vol. 269, 292-299.
- [58] Kim, D. H.; Jung, E. A.; Sohng, I. S.; Han, J. A.; Kim, T. H.; Han, M. J.: Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Archives of pharmacal research*, 1998, vol. 21, 17.

- [59] Giovannelli, L.; Testa, G.; De Filippo, C.; Cheynier, V.; Clifford, M. N.; Dolara, P.; Effect of complex polyphenols and tannins from red wine on DNA oxidative damage of rat colon mucosa in vivo. *European journal of nutrition*, 2000, vol. 39, 207.
- [60] Moon, Y. J.; Wang X.; Moriss M. E.: Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro* 20, 2006, 187-210.
- [61] Eaton, E. A.; Walle, U. K.; Lewis, A. J.; Hudson, T.; Wilson, A. A.; Walle, T.: Flavonoids, potent inhibitors of the human P-form phenolsulfotransferase. Potential role in drug metabolism and chemoprevention. *Drug Metab. Dispos.*, 1996, vol. 24, 232-237.
- [62] Wattenberg, L. W.; Pae, M. A.; Leong, J. L.: Induction of increased benzpyrene hydroxylase activity by flavones and related compounds. *Cancer Research* 28, 1968, 934-937.
- [63] Conney, A. H.: Enzyme induction and dietary chemicals as approaches to cancer chemoprevention: the Seventh De Witt S. Goodman Lecture. *Cancer Research* 63, 2003, 7005-7031.
- [64] Sivaraman, L.; Leatham, M. P.; Yee, J.; Wilkens, L. R.; Lau, A. F.; Le Marchand, L.: CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer Research* 54, 1994, 3692-3695.
- [65] Brosen, K.: Drug interactions and the cytochrome P450 system. The role of cytochrome P450 1A2. *Clinica. pharmacokinetics*, 1995, vol. 29, 20-25.
- [66] Smith, T. J.; Guo, Z.; Guengerich, F. P.; Yang, C. S.: Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by human cytochrome P450 1A2 and its inhibition by phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis*, 1996, vol. 17, 809-813.
- [67] Roberts, D. W.; Doerge, D. R.; Churchwell, M. I.; Gamboa da Costa, G.; Marques, M. M.; Tolleson, W. H.: Inhibition of extrahepatic human cytochromes P450 1A1 and 1B1 by metabolism of isoflavones found in *Trifolium pratense* (red clover). *Journal of. Agricultural and Food. Chemistry.*, 2004, vol. 52, 6623-6632.
- [68] Ciolino, H. P.; Yeh, G. C.: The flavonoid galangin is an inhibitor of CYP1A1 activity and agonist/antagonist of the aryl hydrocarbon receptor. *British journal of cancer*. 1999, vol. 79, 1340-1346.

- [69] Obach, R. S.: Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2000, vol. 294, 88-95.
- [70] Kang, Z. C.; Tsai, S. J.; Lee, H.: Quercetin inhibits benzo[a]pyrene-induced DNA adducts in human Hep G2 cells by altering cytochrome P-450 1A1 gene expression. *Nutrition and cancer*, 1999, vol. 35, 175-179.
- [71] Machala, M.; Kubínová, R.; Hořavová, P.; Suchý, V.: Chemoprotective potentials of homoisoflavonoids and chalcones of *Dracaena cinnabari*: modulations of drug-metabolizing enzymes and antioxidant activity. *Phytotherapy Research*, 2001, vol. 15, 114-118.
- [72] Nahrstedt, A.; Butterweck, V.: Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*, 1997, vol. 30, 129-134.
- [73] Markowitz, J. S.; Donovan, J. L.; DeVane, C. L.; Taylor, R. M.; Ruan, Y.; Wang, J. S.; Chavin, K. D.: Effect of St John's wort on drug metabolism by induction of cytochrome P450 3A4 enzyme. *Jama*, 2003, vol. 209, 1500-1504.
- [74] Markowitz, J. S.; DeVane, C. L.; Boulton, D. W.; Carson, S. W.; Nahas, Z.; Risch, S. C.: Effect of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) on cytochrome P-450 2D6 and 3A4 activity in healthy volunteers. *Life Sci.* 2000, Vol. 66, 133-139.
- [75] Ho, P. C.; Saville, D. J.; Wanwimolruk, S.: Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 2001, vol. 4, 217-227.
- [76] Dinkova-Kostova, A. T.: Protection against cancer by plant phenylpropanoids: induction of mammalian anticarcinogenic enzymes. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2002, vol. 2, 595-610.
- [77] Talalay, P.; De Long, M. J.; Prochaska, H. J.: Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 8261-8265.
- [78] Dinkova-Kostova, A. T.; Massiah, M. A.; Bozak, R. E.; Hicks, R. J.; Talalay, P.: Protency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98, 3404-3409.

- [79] Petri, N.; Tannergren, Ch.; Holst, B.; Mellon, F. A.; Bao, Y.; Plumb, G. W.; Bacon, J.; O'Leary, K.; Kroon, P. A.; Knutson, L.; Forsell, P.; Eriksson, T.; Lennernas, H.; Williamson, G.: Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo. *Drug Metabolism and Disposition*, 2003, vol. 31, no. 6, 805 – 813.
- [80] Williams, J. A.; Ring, B. J.; Cantrell, V. E.; Campanale, K.; Jones, D. R.; Hall, S. D.; Wrighton, S. A.: Differential modulation of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1)-catalyzed estradiol-3-glucuronidation by the addition of UGT1A1 substrates and other compounds to human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 2002, vol. 30, 1266-1273.
- [81] van der Logt, E. M.; Roelofs, H. M.; Nagengast, F. M.; Peters, W. H.: Induction of rat hepatic and intestinal UDP-glucuronosyltransferases by naturally occurring dietary anticarcinogens. *Carcinogenesis*, 2003, vol. 24, no. 10, 1651-1656.
- [82] Brouard, C.; Siess, M. H.; Vernevaut, M. F.; Suschetet, M.: Comparison of the effects of feeding quercetin or flavone on hepatic and intestinal drug-metabolizing enzymes of the rat. *Food and chemical toxicology*, 1988, vol. 26, 99-103.
- [83] Canivenc-Lavier, M. C.; Vernevaut, M. F.; Totis, M.; Siess, M. H.; Magdalau, J.; Suschetet, M.: Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicology*, 1996, vol. 114, 19-27.
- [84] Siess, M. H.; Mas, J. P.; Canivenc-Lavier, M. C.; Suschetet, M.: Time course of induction of rat hepatic drug-metabolizing enzyme activities following dietary administration of flavonoids. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1996, vol. 49, 481-496.
- [85] Sun, X. Y.; Plouzek, C. A.; Henry, J. P.; Wang, T. T.; Phang, J. M.: Increased UDP-glucuronosyltransferase activity and decreased prostate specific antigen production by biochanin A in prostate cancer cells. *Cancer Research* 58, 1998, 2379-2384.
- [86] Peters, W. H.; Roelofs, H. M.; Hectors, M. P., Nagengast, F. M.; Jansen, J. B.: Glutathione and glutathione S-transferases in Barrett's epithelium. *British journal of cancer*, 1993, vol. 67, 1413-1417.
- [87] van Zanden, J. J.; Ben Hamman, O.; van Iersel, M. L.; Boeren, S.; Cnubben, N. H.; Lo Bello, M.; Vervoort, J.; van Bladeren, P. J.; Rietjens, I. M.: Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by the flavonoid quercetin. *Chemico-biological interactions*, 2003, vol. 145, 139-148.

- [88] Kvasničková, E.: *Xenobiochemie*. 1. vyd. Praha: Karolínium, 1995, 29.
- [89] Ghazali, R. A.; Waring, R. H.: The effects of flavonoids on human phenolsulphotransferases: potential in drug metabolism and chemoprevention. *Life Sciences.*, 1999, vol. 65, 1625-1632.
- [90] Harris, R. M.; Wood, D. M.; Bottomley, L.; Blagg, S.; Owen, K.; Hughes, P. J.; Waring, R. H.; Kirk, C. J.: Phytoestrogens are potent inhibitors of estrogen sulfation: implications for breast cancer risk and treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004, vol. 89, 1779-1787.
- [91] De Santi, C.; Pietrabissa, A.; Spisni, R.; Mosca, F.; Pacifici, G. M.: Sulphation of resveratrol, a natural product present in grapes and wine, in the human liver and duodenum. *Xenobiotica*, 2000, vol. 30, 609-617.
- [92] Oscarson, M.; Burk, O.; Winter, S.; Schwab, M.; Wolbold, R.; Dippon, J.; Eichelbaum, M.; Meyer, U. A.: Effects of rifampicin on global gene expression in human small intestine. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2007, vol. 17, no. 11, 907-911.
- [93] Suzuki, S.; Takada, T.; Sugawara, Y.; Muto, T.; Kominami, R.: Quercetin induces recombinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting. *Japanese journal of cancer research*, 1991, vol. 82, no. 10, 1061-1064.
- [94] Jurado, J.; Alejandre-Durán, E.; Alonso-Moraga, A.; Pueyo, C.: Study on the mutagenic activity of 13 bioflavonoids with the Salmonella Ara test. *Mutagenesis*, 1991, vol. 6, no. 4, 289-295.
- [95] Shao, Z. M.; Alpaugh, M. L.; Fontana, J. A.; Barsky, S. H.: Genistein inhibits proliferation similarly in estrogen receptor positive and negative human breast carcinoma cell lines characterized by P21WAF1/CIP1 induction, G2/M arrest, and apoptosis. *Journal of cellular biochemistry*, 1998, vol. 68, no. 1, 44-54.
- [96] Shao, Z. M.; Wu, J.; Shen, Z. Z.; Barsky, S. H.: Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Cancer Research* 58, 1998, no. 21, 4851-4857.
- [97] Prasad, K.: Reduction of serum cholesterol and hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed. *Circulation*, 1999, vol. 99, no. 10, 1355-1362.

- [98] Sazuka, M.; Itoi, T.; Suzuki, Y.; Odani, S.; Koide, T.; Isemura, M.: Evidence for the interaction between (-)-epigallocatechin gallate and human plasma proteins fibronectin, fibrinogen, and histidine-rich glycoprotein. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1996, vol. 60, no. 8, 1317-1319.
- [99] Manach, C.; Morand, C.; Texier, O.; Favier, M. L.; Agullo, G.; Demigné, C.; Régéat, F.; Rémésy, C.: Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *The Journal of Nutrition*, 1995, vol. 125, no. 7, 1911-1922.
- [100] Schröder-van der Elst, J. P.; van der Heide, D.; Rokos, H.; Morreale de Escobar, G.; Köhrle, J.: Synthetic flavonoids cross the placenta in the rat and are found in fetal brain. *Amer. J. Physiol.*, 1998, vol. 274, 253-256.
- [101] Hodnick, W. F.; Kung, F. S.; Roettger, W. J.; Bohmont, M. I.; Halprn, M.: Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. A structure-activity study. *Biochemical pharmacology*, 1986, vol. 35, no. 14, 2345-2357.
- [102] Azuma, Y.; Onishi, Y.; Sato, Y.; Kizaki, H.: Effects of protein tyrosine kinase inhibitors with different modes of action on topoisomerase activity and death of IL-2-dependent CTLL-2 cells. *The Journal of Biochemistry*, 1995, vol. 118, no. 2, 312-318.
- [103] Austin, C. A.; Patel, S.; Ono, K.; Nakane, H.; Fisher, L. M.: Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives. *Biochem. J.*, 1992, vol. 282, 883-889.
- [104] Ross, J. A.: Maternal diet and infant leukemia: a role for DNA topoisomerase II inhibitors? *International Journal of Cancer*, 1998, vol. 11, 26-28.
- [105] Lamartiniere, C. A.; Moore, J.; Holland, M.; Barnes, S.: Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1995, vol. 208, no. 1, 120-123.
- [106] Divi, R. L.; Chang, H. C.; Doerge, D. R.: Antithyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action. *Biochemical Pharmacology*, 1997, vol. 54, no. 10, 1087-1096.
- [107] Doerge, D. R.; Divi R. L.: Porphyrin pi-cation and protein radicals in peroxidase catalysis and inhibition by antithyroid chemicals. *Xenobiotica*, 1995, vol. 25, no. 7, 761-767.

- [108] Sartelet, H.; Serghat, S.; Lobstein, A.; Ingenbleek, Y.; Anton, R.; Petitfrère, E.; Aguié-Aguie, G.; Martiny, L.; Haye, B.: Flavonoids extracted from fonio millet (*Digitaria exilis*) reveal potent antithyroid properties. *Nutrition*, 1996, vol. 12, no. 2, 100-106.
- [109] Fort, P.; Moses, N.; Fasano, M.; Goldberg, T.; Lifshitz, F.: Breast and soy-formula feedings in early infancy and the prevalence of autoimmune thyroid disease in children. *Journal of the American College of Nutrition*, 1990, vol. 9, no. 2, 164-167.
- [110] Lee, H. P.; Gourley, L.; Duffy, S. W.; Estéve, J.; Lee, J.; Day, N. E.: Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet*, 1991, vol. 337, 1197-1200.
- [111] Tajima, K.; Tominaga, S.: Dietary habits and gastro-intestinal cancers: a comparative case-control study of stomach and large intestinal cancers in Nagoya, Japan. *Japanese journal of cancer research*, 1985, vol. 76, no. 8, 705-716.
- [112] Garcia-Closas, R.; Gonzalez, C. A.; Agudo, A.; Riboli, E.: Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes and Control*, 1999, vol. 10, no. 1, 71-75.
- [113] Sugimura, T.: Successful use of short-term tests for academic purposes: their use in identification of new environmental carcinogens with possible risk for humans. *Mutation research.*, 1988, vol. 205, 33-39.
- [114] Adamson, R. H.; Thorgeirsson, U. P.; Synderwine, E. G.; Thorgeirsson, S. S.; Reeves, J.; Dalgard, D. W.; Takayama, S.; Sugimura, T.: Carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in non-human primates: induction of tumors in three macaques. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1990, vol. 81, 10-14.
- [115] Yamazoe, Y.; Shimada, M.; Kamataki, T.; Kato, R.: Microsomal activation of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a pyrolysate of sardine and beef extracts, to a mutagenic intermediate. *Cancer Research* 43, 1983, 5768-5774.
- [116] Yamazoe, Y.; Abu-Zeid, M.; Manabe, S.; Toyama, S.; Kato, R.: Metabolic activation of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline by rat liver microsomes and purified cytochrome P-450. *Carcinogenesis*, 1988, vol. 9, 105-109.
- [117] Radomski, J. L.; Hearn, W. L.; Radomski, T.; Moreno, H.; Scott, W. E.: Isolation of the glucuronic acid conjugate of *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl from dog urine and its mutagenic activity. *Cancer Research* 37, 1977, 1757-1762.

- [118] Kadlubar, F. F.; Miller, J. A.; Miller, E. C.: Hepatic microsomal *N*-glucuronidation and nucleic acid binding of *N*-hydroxyarylamines in relation to urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Research* 37, 1977, 805-814.
- [119] Ilett, K. F.; David, B. M.; Detchon, P.; Castleden, W. M.; Kwa, R.: Acetylation phenotype in colorectal carcinoma. *Cancer Research* 47, 1987, 1466-1469.
- [120] Mommsen, D.; Bardof, N. M.; Aagaard, J.: *N*-Acetyltransferase phenotypes in the urinary bladder carcinogenesis of low-risk population. *Carcinogenesis*. 1985, vol. 6, 199-201.
- [121] Radomski, J. L.: The primary aromatic amines: their biological properties and structure–activity relationships. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1979, vol. 19, 129-157.
- [122] <http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/cl3261.html> [cit. říjen 2008].
- [123] [http://www.cell-lines-service.de/content/e143/e1777/e1282/index\\_ger.html](http://www.cell-lines-service.de/content/e143/e1777/e1282/index_ger.html) [cit. říjen 2008].
- [124] Takeshita, A.; Inagaki, K.; Igarashi-Migitaka, J.; Ozawa, Y.; Koibuchi N.: The endocrine disrupting chemical, diethylhexyl phthalate, activates *MDR1* gene expression in human colon cancer LS174T cells. *Journal of Endocrinology*, 2006, vol. 190, 898.
- [125] Fujino, H.; Chen, X.; Regan, J. W.; Murayama, T.: Indometacin decreases EP2 prostanoid receptor expression in colon cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, vol. 359, 568-569.
- [126] Carlson, Ch. C.; Burnham, L. L.; Shanks, R. A.; Dransfield, D. T.: 8-Cl-adenosine induces differentiation in LS174T cells. *Digestive Diseases and Sciences*, 2001, vol. 46, no. 4, 758.
- [127] Hatayama, H.; Iwashita, J.; Kuwajima A.; Tatsuya A.: The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T. *Biochemical and Biophysical Communications*, 2007, vol. 356, 600.
- [128] Huang, L.; Wring, S. A.; Woolley J. L.; Brouwer K. R.; Serabjit-Singh C.; Polli J. W.: Induction of p-glycoprotein and cytochrome P450 3A by HIV protease inhibitors. *Drug metabolism and disposition*, 2001, vol. 29, no. 5, 755.
- [129] Baliharová, V.; Velík, J.; Šavlík, M.; Szotáková, B.; Lamka, J.; Tahotná, L.; Skálová, L.: The effects of fenbendazol, flubendazole and mebendazole on activities of hepatic cytochromes P450 in pig. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2004, vol. 27, 85-90.



- [130] Baliharová, V.; Velík, J.; Lamka, J.; Balarinová, R.; Skálová, L.: The effects of albendazole and its metabolites on hepatic cytochromes P450 activities in mouflon and rat. *Research in Veterinary Science*, 2003, vol. 75, 231-239.
- [131] Zhang, Z. Y.; Pelletier R. D.; Wong Y. N.; Sugawara, M.; Zhao, N.; Littlefield, B. A.: Preferential inducibility of CYP1A1 and CYP1A2 by TCDD: Differential regulation in primary human hepatocytes versus transformed human cells. *Biochemical and Biophysical Communications*, 2006, vol. 341, 399-407.
- [132] Guo, XL.; Lin, GJ.; Zhao, H.; Gao, Y.; Qian, LP.; Xu, SR.; Fu, LN.; Xu, Q.; Wang JJ.: Inhibitory effects of docetaxel on expression of VEGF, bFGF and MMPs of LS174T cell. *World Journal of Gastroenterology*, 2003, vol. 9, no. 9, 1995. ISSN 1007-9327.
- [133] Conquer, J. A.; Maiani, G.; Azzini, E.; Raguzzini, A.; Holub, B. J.: Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *The Journal of Nutrition*, 1998, vol. 128, no. 3, 593-597.