

## 251 Význam sledování indukce cytochromu p450 flavonoidními sloučeninami.

Hanuštiak P.<sup>1</sup>, Kratochvílová P.<sup>2</sup>, Mareš P.<sup>2</sup>, Adam V.<sup>2,3</sup>, Šupálková V.<sup>2</sup>, Beklová M.<sup>1</sup>, Zehnálek J.<sup>3</sup>, Zeman L.<sup>2</sup>, Hodek P.<sup>4</sup>, Stiborová M.<sup>4</sup>, Kizek R.<sup>3,\*</sup>

1) Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně

2) Ústav výživy zvířat a pícninářství

3) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně

4) Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha

\*) Korespondenční autor: kizek@sci.muni.cz

### Úvod

V dnešní době se ve výživě člověka stále častěji objevují potravinové doplňky, které obsahují látky přijímané i v „běžné“ stravě. Proto není překvapením, že celková koncentrace takových látek vysoce převyšuje normální hodnoty denního příjmu. Tento efekt se nevyhnul ani velmi zajímavé skupině látek nazývaných flavonoidy. Jsou to nízkomolekulární heterocyklické látky založené na flavanovém jádře [1]. Biochemická aktivita flavonoidů či jejich metabolitů závisí na chemické struktuře a relativní orientaci kruhů v molekule [2]. Klasifikace flavonoidů je založena na jejich struktuře. Hlavní třídy zahrnují flavanoly, flavony, flavanony, katechiny (těž flavanony), anthokyany, isoflavony, dihydroxyflavonoly a chalkony [3-6].

Flavonoidy jsou klasifikovány jako sekundární rostlinné metabolity všudypřítomné v rostlinné říši. Jsou produkovány rostlinami například k ochraně před býložravci a k oxidativní ochraně buněk [5,7], dále také působí jako stimuly pro opylení, vábí hmyz ke své potravě [4] nebo se v prašnicích a pesticích a účastní se vývinu pylu a pučení [8].

Ve vztahu k člověku jsou všeobecně považovány za prospěšné látky. Z některých studií prováděných *in vitro* vyplývá, že mají výrazné antioxidační, protisrážlivé, spasmolytické, antimikrobní, protizánětlivé a antikarcinogenní vlastnosti [9-16]. Bylo identifikováno několik mechanismů, kterými flavonoidy působí cytotoxicky. Protinádorová aktivita několika flavonoidů (pinostrobin, quercetin, myricetin, morin) je připisována jejich schopnosti inhibovat topoisomerasu I a II [17,18]. A dále jsou schopny zpomalit buněčnou proliferaci jako následek jejich vazby na estrogenní receptor [19]. Oproti tomu některé flavonoidy, stejně jako jiná xenobiotiky, jsou schopny indukovat cytochrom P450 [20].

V naší práci jsme se zabývali problematikou vlivu různých flavonoidů na cytochrom P450, především na jeho indukci v játrech a tlustém střevě. Pro tyto účely jsme využili western blotting. A dále jsme se zaměřili na elektrochemické pozorování interakcí DNA s flavonoidy.

### Materiál a metody

#### Chemikálie

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, metanol, CH<sub>3</sub>COOH, CH<sub>3</sub>COONa, diosmin, chrysin, uhlíkový prášek a minerální olej byly dodány firmou Sigma Aldrich Corp. (USA). Rutin trihydrát a quercitrin dihydrát byly dodány firmou Roth GmbH, Karlsruhe (Německo). Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> byla dodaná firmou Merck, Darmstadt (Německo). Quercetin dihydrát byl dodán firmou Fluka chemie AG (USA). Všechny ostatní použité chemikálie byly ACS čistoty dodané firmou Sigma Aldrich.

#### Indukce cytochromu P450 flavonoidy

Pro experiment jsme použili β-naftoflavon, chrysin, quercetin, flavon, naringin, naringenin, diosmin, hesperetin, hesperidin, baicalin, rutin (Sigma Chemical Co.) nebo slunečnicovým olejem (vehikulum). Dospělí krysí samci (skupina třech zvířat) byli vystaveni studovaným flavonoidům v koncentraci 60 mg/kg po tři dny a následně byli usmrceni. Mikrosomální frakce z jater a tlustého střeva byly připraveny diferencíální centrifugací [21]. V těchto frakcích byl stanoven obsah CYP1A1 pomocí Western blottingu [22] na membráně Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA) za využití specifických kuřecích anti-CYP1A1 protilátek [23].

#### Stacionární elektrochemický systém

Square wave voltametrie byla prováděna pomocí elektrochemického analyzátoru AUTOLAB (EcoChemie, Nizozemí) v zapojení s tříelektrodovou celou VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byla použita pracovní uhlíková pastová elektroda, referenční (Ag/AgCl, 3 M KCl) elektroda, a jako pomocná elektroda byla použita uhlíková tyčka. Získaná data byla upravena matematickou korekcí podle algoritmů navržených Savitzkym a Golayem implementovaných do GPES softwaru (EcoChemie). Experi-

menty byly prováděny při laboratorní teplotě. Měření bylo prováděno v potenciálovém rozsahu od  $-0,1$  V do  $1,2$  V s těmito parametry: potenciálový krok  $1,95$  mV, pulzní amplituda  $49,85$  mV. Jako základní elektrolyt jsme použili fosfátový pufr o  $\text{pH} = 7,0$ . Uhlíková pasta (asi  $0,5$  g) byla vyrobena z uhlíkového prášku a minerálního oleje (bez DNáz, RNáz, a proteáz). Poměr uhlíkového prášku a minerálního oleje byl  $70/30$  (w/w). Pasta byla vložena do teflonového těla elektrody s průměrem plochy elektrody  $2,5$  mm. Před každým měřením byl povrch elektrody vždy mechanicky obnoven.

### Výsledky a diskuze

#### *Vliv různých flavonoidů na indukci CYP1A1*

O biologickém působení flavonoidů na živočišné organismy je málo známo, a tak jsme vybrali flavonoidy, flavanony a flavony, a jejich glykosidy, které jsme testovali jako potencionální induktory cytochromu P450. Vybrané flavonoidy byly podávány gaváží pokusným samcům potkanů. Tato studie je zaměřena na indukci CYP1A1, hlavního cytochromu P450 vyvolávajícím karcinogenní aktivaci. Zvýšená exprese tohoto enzymu v tkáni tlustého střeva může vést k narůstající incidenci kolorektálního karcinomu u lidí. V literatuře lze nalézt množství experimentálních dat, které se zabývají studiem indukčního efektu flavonoidů v různých umělých systémech (např. buněčných kulturách), nicméně výsledky jsou často protichůdné.

Cílem našeho experimentu bylo prokázat přímou indukci CYP1A1 flavonoidy v tlustém střevě, po jejich konzumaci experimentálními zvířaty v koncentracích identických k průměrným hodnotám v lidské stravě. Byl proveden Western blotting mikrosomálních vzorků tlustého střeva a jater pokusných potkanů, kteří byli vystaveni  $\beta$ -naftoflavonu, který je znám jako látka efektivně indukující CYP1A1 jako ve střevech, tak v játrech. Tyto vzorky byly použity jako pozitivní kontrola. Z našich výsledků vyplývá, že aglykony chrysin a quercetin a rutinoid – diosmin způsobily v obou pozorovaných tkání CYP1A1 indukci. V případě studia indukce CYP1A1 dalšími flavonoidy a to hesperetinem, hesperidinem a baicalinem jsme zjistili, že tyto flavonoidy neovlivnily CYP1A1 expresi. Z flavonoidů typicky obsažených v citrusových plodech jsme pozorovali indukci CYP1A1 v tlustém střevě pouze v případě naringenin, zatímco naringin nezpůsobil žádné změny ani v jednom druhu studované tkáně. Bylo pro nás překvapením, že flavon (flavonoid, který nemá hydroxylovou nebo methoxylovou skupinu) nebyl schopen indukovat CYP1A1 v tlustém střevě, zatímco v játrech indukce probíhá. Tento výsledek je ve shodě s předpokladem, že méně polární flavonoidy snadno prochází membránovou bariérou, a proto jsou absorbovány ze střeva do krevního oběhu. Získané výsledky demonstrují důležitost nejen zvažovat schopnost flavonoidů vázat se na Ah receptor (indukční faktor), ale také se zaměřit na jejich distribuci a metabolismu v organismu.

#### *Studium interakce flavonoidů s DNA*

Pro stanovení základního elektrochemického chování DNA na uhlíkové pastové elektrodě byly analyzovány jednotlivé nukleové kyseliny (A, G, C a T). Získali jsme dobře vyvinuté signály jednotlivých bazí při různých potenciálech (G  $-0,68$  V, A  $-0,91$  V, T  $-1,11$  V, C  $-1,27$  V. V případě analýzy celé molekuly DNA (ssDNA) byly elektrochemické signály posunuty přibližně o  $50$  mV do negativního potenciálu. A navíc, vybrané flavonoidy (quercetin a rutin) poskytovaly na povrchu uhlíkové pastové elektrody dobře separované signály. Následně byla provedena simultánní analýza ssDNA a flavonoidů. Přítomnost flavonoidů způsobila pokles signálů bazí, přičemž největší pokles byl pozorovatelný u guaninu, který byl v přítomnosti obou flavonoidů pouze  $5\%$  v porovnání s původním. Signály thyminu a cytosinu byly ovlivněny flavonoidy nejméně. Výsledky naznačují, že rozdíly v interakci flavonoidů s nukleovými bazemi souvisejí s purinovou nebo pyrimidinovou strukturou.

### Závěr

Ačkoliv jsou flavonoidy považovány za bezpečné látky obsažené v naší potravě z důvodu jejich rostlinného původu, naše data naznačují, že příjem flavonoidů by měl být kontrolován s ohledem na jejich schopnost nejen ovlivnit cytochrom P450, ale také interagovat s DNA.

**Poděkování:** Příspěvek vznikl za podpory grantů LPR 2006, RASO 2007, GAAV IAA401990701, MSM 6215712402 a VUP.

#### *Literatura*

1. Coulter TP. 2nd edition ed: The Royal Society of Chemistry; 1990.
2. Cody V. Crystal and molecular structure of flavonoids. New York, NY USA; 1988.
3. Hodnick WF, Milosajevic EB, Nelson JH, Pardini RS. Electrochemistry of flavonoids: Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration and production of oxygen radicals by flavonoids. *Biochem Pharmacol.* 1988;37:2607-11.
4. Harborne JB. Nature, distribution and function of plant flavonoids. New York, NY USA; 1986.
5. Harborne JB. Flavonoids in the environment: Structure-activity relationships. New York, NY USA; 1988.
6. Kühnau J. The flavonoids: A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *Wld Rev Nutr Diet.* 1976;24:117-91.
7. Pierpoint WS. Flavonoids in the human diet. New York, NY USA; 1986.

## VARIA

8. Mo Y, Nagel C, Taylor LP. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proc Nat Acad Sci.* 1992;89:7213-7.
9. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000;52:673-751.
10. Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M, Di Carlo R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci.* 2001;68:921-31.
11. Cassidy A, Hanley B, Lamuela-Raventos RM. Review: Isoflavones, lignans a stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food Agric.* 2000;80:1044-62.
12. Chow K, Kramer I. San Francisco, USA: China Books and Period, Inc.; 1990.
13. Ratty AK, Das NP. Effect of flavonoids on monoenzymic lipid peroxidation: Structure activity relationship. *Biochem Med Metabol Biol.* 1988;39:69-79.
14. Salvayre R, Negre A, Affany A, Lenoble M, Douste-Blazy L. Protective effect of plant flavonoids, analogs and vitamin E against lipid peroxidation of membranes. New York, NY USA; 1988.
15. Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol.* 1987;36:317-22.
16. Beretz A, Cazevane J. The effect of flavonoids on blood-vessel wall interactions. New York, NY, USA; 1988.
17. Sukardiman, Darwanto A, Tanjung M, Darmadi MO. Cytotoxic mechanism of flavonoid from Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*) in cell culture of human mammary carcinoma. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2000;23(2-4):185-90.
18. Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R. Flavonoids as DNA Topoisomerase Antagonists and Poisons - Structure-Activity-Relationships. *J Nat Prod.* 1995 Feb;58(2):217-25.
19. Primiano T, Yu R, Kong ANT. Signal transduction events elicited by natural products that function as cancer chemopreventive agents. *Pharm Biol.* 2001;39(2):83-107.
20. Kohn MC, Walker NJ, Kim AH, Portier CJ. Physiological modeling of a proposed mechanism of enzyme induction by TCDD. *Toxicology.* 2001 May 21;162(3):193-208.
21. Stiborova M, Asfaw B, Frei E, Schmeiser HH, Wiessler M. Benzenediazonium Ion Derived from Sudan-I Forms an 8-(Phenylazo) Guanine Adduct in DNA. *Chem Res Toxicol.* 1995 Jun;8(4):489-98.
22. Guengerich FP, Wang P, Davidson NK. Estimation of Isozymes of Microsomal Cytochrome-P-450 in Rats, Rabbits, and Humans Using Immunochemical Staining Coupled with Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis. *Biochemistry.* 1982;21(7):1698-706.
23. Polson A, Vonwechmar MB, Vanregenmortel MHV. Isolation of Viral Igy Antibodies from Yolks of Immunized Hens. *Immunol Commun.* 1980;9(5):475-93.