

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



METABOLICKÉ PŘEMĚNY SILYBINU

DISERTAČNÍ PRÁCE

Olomouc 2010

Petra Jančová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Petra Jančová

METABOLICKÉ PŘEMĚNY SILYBINU

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitelka: Doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.

Obor: Lékařská chemie a biochemie

Disertační práce byla vypracována během prezenční formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2006 – srpen 2010.

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

V Olomouci dne 14.6.2010

.....

Mgr. Petra Jančová

Na tomto místě bych ráda vyjádřila svůj dík všem lidem, kteří přispěli k realizaci této práce. V první řadě bych ráda poděkovala mé školitelce Doc. RNDr. Evě Anzenbacherové, CSc. za příležitost pracovat pod jejím laskavým vedením po celou dobu mého postgraduálního studia. Současně bych ráda poděkovala pracovníkům Ústavu lékařské chemie a biochemie a Ústavu farmakologie LF UP za vytvoření dobrého pracovního prostředí a pomoc při řešení odborných problémů. Můj dík patří rovněž panu Prof. RNDr. Pavlovi Anzenbacherovi, DrSc., přednostovi Ústavu farmakologie LF UP, za jeho cenné rady, připomínky a předané zkušenosti.

Dále bych ráda poděkovala:

- Mgr. Pavlovi Kosinovi, Ph.D., Mgr. Pavle Henkové, Ph.D., Ing. Radimovi Vrzalovi, Ph.D. a Doc. RNDr. Zdeňkovi Dvořákovi Ph.D. za spolupráci při práci s lidskými hepatocyty.
- RNDr. Barboře Papouškové, Ph.D., Prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph.D. z Katedry analytické chemie PřF UP a Mgr. Michalovi Šillerovi z Ústavu farmakologie LF UP za spolupráci při identifikaci metabolitů silybinu pomocí hmotnostní spektrometrie.
- Prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc., přednostce Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP, a panu Prof. MUDr. RNDr. Vilímu Šimánkovi, DrSc. za jejich pomoc a podporu.

Zvláštní dík patří také mým rodičům a mému příteli Zdeňkovi za nekonečnou trpělivost a pochopení, a také Mgr. Aleně Tunkové a Mgr. Michalovi Šillerovi za psychickou podporu při studiu.

Tato práce byla vypracována v rámci řešení projektů MŠM 6198959216, vnitřního grantu LF UP (91110181) a grantu GAČR 303/09/H048.

SOUHRN

Standardizovaný extrakt ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* [L.] Gaertn, Asteraceae), nazývaný silymarin, je směsí nejméně 7 flavonolignanů a flavonoidu taxifolinu. Silymarin má chemoprotektivní účinky a je aktivní složkou řady fytopřípravků a doplňků stravy. Farmakologicky nejvíce studovaným flavonolignanem silymarinu je silybin, který je směsí dvou diastereomerů A a B v přibližném poměru 1:1.

První část předkládané práce je zaměřena na sledování vlivu silybinu na aktivity různých forem cytochromu P450 (CYP), hlavního enzymu I. fáze metabolismu cizorodých látek. U těch forem CYP, kde byl prokázán významný pokles aktivity způsobený silybinem, byla stanovena IC_{50} a byl popsán mechanismus inhibice. V přítomnosti silybinu byly *in vitro* významně ovlivněny aktivity forem CYP1A2, 2C8, 2C9 a 3A4. Nejvýraznější inhibiční efekt silybinu se projevil na aktivitách CYP3A4 a CYP2C9 (IC_{50} 49,8 μ mol/l a 34,1 μ mol/l). Inhibice aktivity CYP2C9 silybinem byla popsána jako nekompetitivní. V případě CYP3A4 probíhala inhibice kompetitivním mechanismem.

V další části práce byly sledovány metabolické přeměny silybinu v podmínkách *in vitro*. Výsledky našich experimentů ukázaly, že silybin je *O*-demetylován jaterním enzymem I. fáze metabolismu cizorodých látek, CYP2C8.

Metabolismus silybinu, v tomto případě jednotlivých diastereomerů silybinu A a B i směsi dvou diastereomerů (silybinu AB), za účasti enzymů II. fáze biotransformace, byl sledován po inkubaci s UDP-glukuronosyltransferasami (UGT). HPLC analýzou s UV detekcí bylo prokázáno, že UGT přítomné jak v primární kultuře lidských hepatocytů, tak v lidské jaterní mikrosomální frakci metabolizují silybin za vzniku čtyř monoglukuronidů: silybin A-7-*O*- β -D-glukuronidu, silybin B-7-*O*- β -D-glukuronidu, silybin A-20-*O*- β -D-glukuronidu a silybin B-20-*O*- β -D-glukuronidu. Použitím lidských rekombinantních forem UDP-glukuronosyltransferas byly identifikovány lidské formy UGT zodpovědné za vznik jednotlivých metabolitů. Rekombinantní UGT1A1, 1A3, 1A8, 1A10, ale také UGT1A6, 1A7, 1A9, 2B7 a 2B15 stereoselektivně a regioselektivně tvořily 7- a 20-*O*- β -D-monoglukuronidy silybinu. Rekombinantní UGT1A4, 2B4 a 2B17 se na glukuronidaci silybinu nepodílely. Bylo prokázáno, že UDP-glukuronosyltransferasy přednostně reagují s jedním ze dvou diastereomerů, a to se silybinem B. Preferovaným místem glukuronidace byl C7 uhlík molekuly silybinu.

SOUHRN

Poslední část práce se zabývala identifikací metabolitů vznikajících při biotransformaci silybinu v moči a plazmě dobrovolníků. Ve studii bylo nalezeno, že nejvýznamnější metabolity při biotransformaci silybinu jsou glukuronidy. Na rozdíl od lidské plazmy, kde jsme našli především silybin B-20-*O*- β -D-glukuronid, jsme ve vzorcích lidské moči identifikovali pouze 7-*O*- β -D-glukuronidy silybinu. Produkt I. fáze biotransformace silybinu, *O*-demethylovaný silybin, byl nalezen ve vzorcích moči i plazmy jako minoritní produkt ve formě *O*-demethylovaného silybin glukuronidu.

Klíčová slova: silybin, diastereomery, cytochrom P450, UDP-glukuronosyltransferasy, biotransformace, HPLC analýza

SUMMARY

Silymarin, a standard extract from *Silybum marianum* L. seeds, contains at least 7 flavonolignans and flavonoid taxifolin. It has been used to date as chemoprotectant. Flavonolignan silybin, the main component of silymarin, is composed of two diastereomers A and B in approximately 1:1 ratio.

In the first part of the presented work, inhibition of cytochromes P450 (CYP) by silybin in microsomal fraction was studied. The results of the inhibition of prototypic activities of individual human microsomal CYP enzymes by silybin revealed that there were four P450 activities influenced by the presence of this compound, namely, those of CYP1A2, 2C8, 2C9 and 3A4. The most prominent inhibition effect was found with CYP3A4 and CYP2C9 (IC_{50} 49.8 μ mol/l and 34.1 μ mol/l, respectively). Our results indicated the presence of a noncompetitive inhibition of the CYP2C9 activity and of a competitive inhibition of the CYP3A4 activity.

In the next part of this work the metabolism of silybin *in vitro* was observed. The results presented here showed that silybin is subjected to *O*-demethylation by cytochromes P450, enzymes of the Phase I of xenobiotic metabolism. Experiments with bacosomes confirmed that it is the CYP2C8 form which is responsible for formation of the *O*-demethylated silybin.

Contribution of UDP-glucuronosyltransferases (main phase II enzymes) to metabolism of silybin and its A and B diastereomers was also investigated. Four main metabolites of silybin formed by UGTs were identified using HPLC with UV detection. Hepatocytes and microsomes formed silybin A-7-*O*- β -D-glucuronide, B-7-*O*- β -D-glucuronide, A-20-*O*- β -D-glucuronide and B-20-*O*- β -D-glucuronide. With recombinant UGTs, it was confirmed that mainly the UGT1A1, 1A3, 1A8 and 1A10 enzymes, but also UGT1A6, 1A7, 1A9, 2B7 and 2B15 were responsible for the stereoselective and regioselective reactions leading to the respective silybin glucuronides. No silybin glucuronides were generated by UGT1A4, 2B4 and 2B17. The preferential glucuronidation of silybin B under *in vitro* conditions by human UGTs was confirmed. The phenolic –OH group at C7 position of silybin structure was the main site of glucuronidation.

The last part of this work was focused on the identification of silybin metabolites in human plasma and urine samples. Monoglucuronides of silybin were found as the main

SUMMARY

metabolites in the plasma and urine. The human *in vivo* samples yielded the 7-*O*- β -D-glucuronides of the A and B diastereomers both in the plasma and urine. In human plasma, moreover, the presence of silybin B-20-*O*- β -D-glucuronide was also confirmed. The glucuronide of the *O*-demethylated silybin was found as minor metabolite in plasma and urine samples.

Keywords: silybin, diastereomers, cytochrome P450, UDP-glucuronosyltransferases, biotransformation, HPLC analysis

1. ÚVOD	1
2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY.....	3
2.1 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK.....	3
2.1.1 ENZYMY I. FÁZE METABOLISMUS CIZORODÝCH LÁTEK.....	3
2.1.1.1 Cytochromy P450.....	4
2.1.2 ENZYMY II. FÁZE METABOLISMUS CIZORODÝCH LÁTEK.....	14
2.1.2.1 UDP-glukuronosyltransferasy	15
2.2 POLYFENOLOVÉ SLOUČENINY.....	18
2.2.1 ROZDĚLENÍ A ÚČINKY POLYFENOLŮ.....	18
2.2.2 BIODOSTUPNOST POLYFENOLŮ A JEJICH METABOLISMUS.....	19
2.3 OSTROPESTŘEC MARIÁNSKÝ.....	22
2.3.1 SILYBIN.....	23
2.3.2 LÉČEBNÉ ÚČINKY SILYBINU/SILYMARINU.....	23
2.3.3 BIODOSTUPNOST SILYBINU.....	24
2.3.4 MODULACE AKTIVIT HLAVNÍCH BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ I. A II. FÁZE A EFLUXNÍCH TRANSPORTÉRŮ SILYBINEM	25
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	27
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
4.1 ENZYMOVÉ SYSTÉMY.....	28
4.1.1 HEPATOCYTY.....	28
4.1.2 MIKROSOMY.....	28
4.1.3 REKOMBINANTNÍ ENZYMY.....	28
4.2 CHEMIKÁLIE.....	29
4.3 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	30
4.4 METABOLISMUS SILYBINU CYTOCHROMY P450 IN VITRO.....	31
4.4.1 STANOVENÍ ENZYMOVÝCH AKTIVIT JEDNOTLIVÝCH FOREM CYTOCHROMŮ P450.....	31
4.4.2 STANOVENÍ ENZYMOVÝCH AKTIVIT A INHIBIČNÍHO Vlivu SILYBINU (SAB) NA RŮZNÉ ISOFORMY CYP POMOCÍ MARKEROVÝCH SUBSTRÁTŮ.....	33
4.4.3 SLEDOVÁNÍ METABOLISMU SILYBINU METODOU HPLC.....	37

4.4.4 IDENTIFIKACE METABOLITŮ SILYBINU VZNIKLÝCH ÚČINKEM CYP PŘÍTOMNÝCH V LIDSKÉ JATERNÍ MIKROSOMÁLNÍ FRAKCI	37
4.4.5 INHIBICE CYTOCHROMU P450 OXIDEM UHELNATÝM, NESPECIFICKÝM INHIBITOREM CYP.....	38
4.4.6 INHIBICE TVORBY METABOLITŮ SILYBINU SPECIFICKÝMI INHIBITORY JEDNOTLIVÝCH CYP	38
4.4.7 METABOLISMUS SILYBINU POMOCÍ VYBRANÝCH CYP (BAKTOSOMŮ) .	40
4.5 METABOLISMUS SILYBINU UDP-GLUKURONOSYLTRANSFERASAMI IN VITRO.....	40
4.5.1 IDENTIFIKACE METABOLITŮ SILYBINU VZNIKLÝCH ÚČINKEM UGT PŘÍTOMNÝCH V LIDSKÝCH HEPATOCYTECH.....	40
4.5.2 IDENTIFIKACE METABOLITŮ SILYBINU VZNIKLÝCH ÚČINKEM ENZYMŮ PŘÍTOMNÝCH V LIDSKÉ JATERNÍ MIKROSOMÁLNÍ FRAKCI	42
4.5.3 STEREOSELEKTIVNÍ METABOLISMUS TESTOVANÉ LÁTKY POMOCÍ LIDSKÝCH REKOMBINANTNÍCH UGT	42
4.6 IDENTIFIKACE METABOLITŮ VZNIKAJÍCÍCH PŘI BIOTRANSFORMACI SILYBINU V PLAZMĚ A MOČI DOBROVOLNÍKŮ.....	43
5. VÝSLEDKY.....	45
5.1 INTERAKCE SILYBINU S CYTOCHROMY P450 A SLEDOVÁNÍ JEHO METABOLICKÝCH PŘEMĚN IN VITRO	45
5.1.1 STANOVENÍ INHIBIČNÍHO Vlivu SILYBINU (SAB) NA AKTIVITU CYTOCHROMŮ P450 PŘÍTOMNÝCH V LIDSKÉ JATERNÍ MIKROSOMÁLNÍ FRAKCI	45
5.1.2 VZNIK METABOLITŮ SILYBINU.....	47
5.1.3 INHIBICE CYTOCHROMU P450 OXIDEM UHELNATÝM, NESPECIFICKÝM INHIBITOREM CYP.....	47
5.1.4 IDENTIFIKACE METABOLITŮ SILYBINU VZNIKLÝCH ÚČINKEM CYP PŘÍTOMNÝCH V LIDSKÉ JATERNÍ MIKROSOMÁLNÍ FRAKCI	48
5.1.5 INHIBICE TVORBY O-DEMETHYLOVANÉHO SILYBINU SPECIFICKÝMI INHIBITORY JEDNOTLIVÝCH CYP.....	50
5.1.6 O-DEMETHYLACE SILYBINU ZA ÚČASTI REKOMBINANTNÍCH CYTOCHROMŮ P450.....	51

5.2 KONJUGAČNÍ REAKCE SILYBINU ZA ÚČASTI UDP- GLUKURONOSYLTRANSFERAS IN VITRO.....	52
5.2.1 IDENTIFIKACE METABOLITŮ SILYBINU VZNIKLÝCH ÚČINKEM ENZYMŮ PŘÍTOMNÝCH V LIDSKÉ JATERNÍ MIKROSOMÁLNÍ FRAKCI	52
5.2.2 IDENTIFIKACE METABOLITŮ SILYBINU VZNIKLÝCH ÚČINKEM UGT PŘÍTOMNÝCH V LIDSKÝCH HEPATOCYTECH.....	53
5.2.3 STEREOSELEKTIVNÍ METABOLISMUS SILYBINU POMOCÍ LIDSKÝCH REKOMBINANTNÍCH UGT	56
5.3 IDENTIFIKACE METABOLITŮ VZNIKAJÍCÍCH PŘI BIOTRANSFORMACI SILYBINU V PLAZMĚ A MOČI DOBROVOLNÍKŮ.....	61
6. DISKUSE	64
6.1 INHIBIČNÍ VLIV SILYBINU NA AKTIVITU CYTOCHROMU P450.....	64
6.2 METABOLISMUS SILYBINU CYTOCHROMY P450 IN VITRO	66
6.3 INTERAKCE SILYBINU S UDP-GLUKURONOSYLTRANSFERASAMI	67
6.4 METABOLISMUS SILYBINU UDP-GLUKURONOSYLTRANSFERASAMI IN VITRO.....	67
6.5 BIOTRANSFORMACE SILYBINU IN VIVO	69
7. ZÁVĚRY	71
8. SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI	73
9. OSTATNÍ PRÁCE	75
10. LITERATURA	77

SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-vázající kazeta (ATP-binding cassette)	HClO ₄	kyselina chloristá
ATP	adenosintrifosfát	HFC	7-hydroxy-4-(trifluoro- methyl)-kumarin
AP	aglykon polyfenolů	H ₃ PO ₄	kyselina fosforečná
BCRP	protein rezistence karcinomu prsů (breast cancer resistance protein)	HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
BVM	Beviramat	IC ₅₀	koncentrace látky inhibující 50 % aktivity enzymu
BVMG	Beviramat-glukuronid	K _m	Michaelisova konstanta
CH ₃ COOH	kyselina octová	K _i	Inhibiční konstanta
CO ₂	oxid uhličitý	KCl	chlorid draselný
COMT	katechol O-methyltransferasa	LCQ Fleet	hmotnostní spektrometr s iontovou pastí
CYP	cytochrom P450	LC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
DEDC	diethyldithiokarbamát	μLC/MS	mikrokapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
DMSO	dimethylsulfoxid	LPH	laktasa-florizin hydrolasa
DNA	deoxyribonukleová kyselina	luciferin-ME	luciferin 6'-methylether
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina	MRP	multidrug resistantní protein (multidrug-resistance related protein)
EFC	7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)- kumarin	MS	hmotnostní spektrometrie
ESI	ionizace elektrosprejem		
GIT	gastrointestinální trakt		
GP	glykosid polyfenolů		
GLP	glukuronid polyfenolů		
GST	glutathion S-transferasa		
³ H	tritium, radioaktivní izotop vodíku		
HCl	kyselina chlorovodíková		

SEZNAM ZKRATEK

m/z	efektivní hmotnost (m-hmotnost iontu, z-nábojové číslo)	S.E.M.	odchylka průměru (standard error of the mean)
Na ₂ CO ₃	uhličitan sodný	SPE	extrakce tuhou fází (solid phase extraction)
NaCl	chlorid sodný	SULT	sulfotransferasa
NADH	redukovaný nikotinamid- adenindinukleotid	TAO	triacetyloandomycin
NADP ⁺	oxidovaný nikotinamid- adenindinukleotid fosfát	TPMT	thiopurin S- methyltransferasa
NADPH	redukovaný nikotinamid- adenindinukleotid fosfát	UDP	Uridin 5'-difosfát
NAT	N-acetyltransferasa	UDP-GA	Uridin 5'-difosfo- glukuronová kyselina
OAT	transportér organických kationtů (organic anion transporter)	UGT	Uridine 5'-difosfo- glukuronosyltransferasa
P-gp	P-glykoprotein	UV	ultrafialové záření
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky	V _{max}	maximální rychlost enzymatické reakce
Panc-1	buněčná linie lidského adenokarcinomu slinivky		
Q-Tof	spojení kvadrupolu a ortogonálního průletového hmotnostního analyzátoru		
rpm	otáčky za minutu		
R _t	retenční čas		
SA	silybin A		
SB	silybin B		
SAB	silybin AB (směs diastereomerů A a B v poměru 1:1)		

1. ÚVOD

Nádorová onemocnění, obezita, cukrovka, vysoká hladina cholesterolu, vysoký krevní tlak, stres, deprese, nespavost a další civilizační choroby představují závažné zdravotní problémy současné populace, zvláště s ohledem na stále rostoucí počty nově diagnostikovaných pacientů. U klasické medicíny je léčba zdravotních problémů založena na vědecky ověřených poznatcích a zkušenostech generací lékařů. Vedle klasické medicíny má svůj nezastupitelný význam také medicína nazývaná jako alternativní. Alternativní a komplementární medicína je široký pojem, který zahrnuje především metody neužívané v klasickém lékařství tak, jak je tomu rozuměno v evropské či „západní“ medicíně. Jako příklad můžeme uvést akupresuru, akupunkturu, aromaterapii, homeopatii nebo přístupy, při kterých jsou k léčbě člověka využívány léčivé rostliny, tedy fytoterapii.

Využívání rostlin v lékařství je však patrně stejně staré jako lidstvo samo. Do 18. století bylo bylinářství obvyklou formou léčby, a i dnes je opět velmi rozšířené a oblíbené. Bezpočet lidí při drobných zdravotních potížích a méně závažných onemocněních volí bylinné přípravky. Z dat publikovaných Světovou zdravotnickou organizací vyplývá, že fytoterapie je na celém světě využívána třikrát až čtyřikrát častěji, než léčiva klasické medicíny. Je obecně známo, že fytopřípravky mohou přispívat ke snížení rizika vzniku rakoviny, chronicky nemocným lidem pomáhají zmírnit nepříjemné příznaky nemoci, v některých případech dokáží zmírnit vedlejší účinky náročné léčby a svým působením zvyšují kvalitu života v průběhu léčby. Jednou z nejvíce prostudovaných léčivých rostlin je ostropestřec mariánský. Extrakt ze semen této rostliny, silymarin, je užíván již po staletí jako přírodní léčivo při onemocnění jater a žlučových cest. Silymarin obsahuje směs flavonolignanů, z nichž nejvýznamnější je silybin, který je považován za nositele většiny biologických aktivit silymarinu. V současné době je silymarin/silybin aktivní složkou řady fytopřípravků a doplňků stravy. Je užíván zejména pro své účinky hepatoprotektivní, chemoprotektivní, antioxidační, protinádorové, protizánětlivé a imunomodulační.

Účinné látky léčivých rostlin i v současné době často užívané doplňky stravy jsou z organismu eliminovány stejnými mechanismy, kterými jsou odstraňovány klinicky

užívaná léčiva. Obecně platí, že léčiva podléhající intenzivnímu metabolismu (za účasti enzymů I. a II. fáze metabolismu cizorodých látek) a jejichž vstup do buňky je zprostředkován transportním proteinem, mají nízkou biodostupnost a často jsou zdrojem lékových interakcí. Silybin, jako látka rostlinného původu, se stal v posledních několika letech jedním z intenzívně zkoumaných doplňků stravy. Možná indukce nebo inhibice biotransformačních enzymů silybinem by mohla vést ke změně účinku nebo rychlosti odbourání souběžně podávaného léčiva. Interakce mezi léčivem a doplňkem stravy navzájem mohou terapii u pacienta značně zkomplikovat, způsobovat nepříjemné vedlejší účinky a může dokonce dojít i k naprostému selhání terapie.

Ve své disertační práci jsem se věnovala interakcím silybinu s hlavními enzymy I. a II. fáze metabolismu cizorodých látek (interakcím s cytochromy P450 a s UDP-glukuronosyltransferasami), charakterizaci jednotlivých forem lidských cytochromů P450 a UDP-glukuronosyltransferas zodpovědných za metabolické přeměny silybinu a identifikaci vznikajících metabolitů v podmínkách *in vitro* a *in vivo*.

2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

2.1 Biotransformace xenobiotik

Biotransformace xenobiotik je základním mechanismem pro udržení homeostázy organismu během expozice cizorodým látkám (xenobiotikům: léčivům, doplňkům stravy, chemikáliím, škodlivinám z životního prostředí, aj.). Přeměny cizorodých látek jsou v živých organismech zprostředkovány enzymy, které mají širokou substrátovou specifitu. Tyto enzymy mají svoji nezastupitelnou úlohu nejen v biotransformaci xenobiotik, ale také v metabolismu endobiotik např. vitamínů, žlučových kyselin, eikosanoidů, mastných kyselin nebo steroidních hormonů. Z pohledu lokalizace těchto enzymů lze říci, že biotransformační enzymy mají širokou tkáňovou distribuci. Svoji funkci plní především v játrech, ale jejich metabolická aktivita je důležitá i v dalších orgánech jako jsou plíce, ledviny, slinivka, slezina, srdce, mozek, varlata, vaječníky, placenta, ale také v krevních buňkách (červených krvinkách, krevních destičkách, lymfocytech) nebo v trávicím traktu (Parkinson, 2001).

Při sledování metabolických přeměn cizorodých látek se biotransformační reakce obecně rozdělují do dvou fází. V I. fázi metabolismu xenobiotik dochází k přeměně cizorodé látky (oxidací, redukcí, hydrolýzou) na polárnější metabolit. Jestliže je metabolit I. fáze dostatečně polární, může být vyloučen ledvinami. Málo polární produkty I. fáze vstupují do fáze II, při níž dochází ke konjugaci s endogenními látkami (např. UDP-glukuronovou kyselinou, 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátem, glutathionem, acetyl CoA, S-adenosylmethioninem nebo aminokyselinami) za vzniku polárních konjugátů, které jsou obvykle vyloučeny z organismu močí nebo žlučí. Reakce I. fáze mohou, ale nemusí předcházet reakcím II. fáze.

2.1.1 Enzymy I. fáze metabolismu cizorodých látek

V I. fázi biotransformace cizorodých látek dochází k oxidaci, redukcí nebo hydrolýze parentní látky za vzniku více polárního metabolitu připojením nebo odhalením funkčních skupin (-OH, -NH₂, -SH, -COOH). Mezi enzymy, které se účastní

těchto přeměn patří oxidoreduktasy, z nichž významné jsou různé typy oxidas, dále reduktasy a hydrolasy. Přehled biotransformačních enzymů I. fáze je uveden v tabulce 1. Mezi těmito enzymy zaujímají nejvýznamnější místo cytochromy P450 a bude jim věnována pozornost v následující kapitole.

Oxidace	Redukce	Hydrolytické reakce
Alkoholdehydrogenasa	Azo- a nitro-redukce	Esterasy
Aldehyddehydrogenasa	Redukce karbonylu	Peptidasy
Aldehydoxidasa	Redukce disulfidu	Epoxidhydrolasy
Xantinoxidasa	Redukce sulfoxidu	
Monoaminoxidasa	Redukce chinonu	
Diaminoxidasa	Redukční dehalogenace	
Prostaglandin H synthasa		
Polyaminoxidasa		
Flavinové monooxygenasy		
Cytochromy P450		

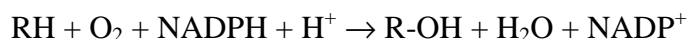
Tabulka 1: Biotransformační reakce a enzymy I. fáze metabolismu cizorodých látek (podle Parkinson, 2001).

2.1.1.1 Cytochromy P450

Pojmem cytochrom P450 (CYP) jsou označovány biotransformační enzymy I. fáze, které mají významné společné charakteristické vlastnosti. V první řadě je třeba uvést, že se jedná o hemové enzymy. Název cytochrom P450 byl odvozen od charakteristické vlastnosti těchto enzymů, kterou je schopnost absorbovat v redukovaném stavu v komplexu s oxidem uhelnatým viditelné světlo při vlnové délce 450 nm (Garfinkel, 2003). Ostatní hemoproteiny, např. hemoglobin nebo enzymy obsahující hem, jako jsou

katalasy nebo peroxidasy, vykazují absorpční maximum při jiné vlnové délce. Buněčná lokalizace cytochromů P450 je především v membráně endoplasmatického retikula.

Obecná reakce, kterou lze popsat biotransformaci substrátu za účasti cytochromu P450, se dá zjednodušeně vyjádřit následující rovnicí:



Tato rovnice popisuje, že se jedná o monooxygenasovou reakci, kdy do molekuly substrátu RH je zaveden atom kyslíku za vzniku hydroxylovaného produktu R-OH, zdrojem redukčních ekvivalentů je zde redukovaný nikotinamidadeninukleotid fosfát (NADPH). Druhý atom aktivovaného kyslíku se stává součástí molekuly vody. Jak už bylo řečeno, uvedená rovnice popisuje funkci cytochromu P450 pouze zjednodušeně, v reálné živé buňce je mechanismus enzymatických přeměn mnohem komplikovanější. Zdrojem elektronů pro redukci molekulárního kyslíku nemusí být jen NADPH, ale i NADH. Mezičlánkem při přenosu elektronů na cytochrom P450 je enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasa, lokalizovaná v endoplasmatickém retikulu, v některých případech i mitochondriální ferredoxin reduktasa a nehemový Fe-S protein. Úlohu donoru elektronu pro redukci železa v cytochromu P450 často plní další hemoprotein, cytochrom b₅. Také zdrojem kyslíku pro oxidativní reakce nemusí být jen molekulární kyslík, ale mohou být v tomto smyslu využity např. i peroxidy nebo peroxikyseliny (Stiborová a kol., 1999).

Cytochromy P450, označované v literatuře běžně zkratkou CYP, se vyskytují v různých formách, které jsou řazeny do rodin a podrodin podle stupně homologie jejich primární struktury (pořadí aminokyselin) proteinových molekul. Členové jedné rodiny jsou označovány arabským číslem následujícím po názvu enzymu (např. CYP2) a sdílí nejméně 40 % homologie aminokyselinové sekvence jejich proteinů. Členové stejné podrodiny se označují velkým písmenem, které následuje přímo za číslicí označující rodinu (CYP2C) a vykazují více jak 60 % homologie v aminokyselinové sekvenci. Jednotliví členové podrodin se označují druhým arabským číslem a výsledné označení

konkrétního enzymu pak vypadá např. CYP2C9 (Anzenbacher and Anzenbacherová, 2003).

V lidském genomu bylo nalezeno 57 genů pro cytochromy P450. Do dnešní doby identifikované enzymy u člověka byly zařazeny do 18 rodin a 41 podrodin. Většina CYP je v lidském organismu exprimována v játrech, ale významný je také jejich obsah v tenkém střevě, plicích, mozku, srdci, ledvinách, v kůži a v jiných orgánech. V tabulce 2 je uvedeno rozdělení lidských CYP vzhledem k významným skupinám substrátů (Guengerich, 2006).

Steroly	Xenobiotika (léčiva)	Mastné kyseliny	Eikosanoidy	Vitamíny	Neznámé
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	24A1	2S1
7B1	2A6	4B1	4F8	26A1	2U1
8B1	2A13	4F12	5A1	26B1	2W1
11A1	2B6		8A1	26C1	3A43
11B1	2C8			27B1	4A22
11B2	2C9				4F11
17A1	2C18				4F22
19A1	2C19				4V2
21A2	2D6				4X1
27A1	2E1				4Z1
39A1	2F1				20A1
46A1	3A4				27C1
51A1	3A5				
	3A7				

Tabulka 2: Klasifikace lidských CYP podle hlavních substrátových tříd (podle Guengerich, 2006).

Cytochromy P450 a metabolismus léčiv

Jak již bylo zmíněno, cizorodé látky (mezi které patří i většina léčiv), jsou v organismu přeměňovány na látky polárnější. Svou nezastupitelnou úlohu při těchto přeměnách plní právě cytochromy P450. Přehled CYP, které jsou zapojeny

do metabolismu léčiv je uveden v tabulce 2. Jedná se o enzymy, které se účastní biotransformace až 75 % klinicky užívaných léčiv. Znalost úlohy konkrétní formy CYP při metabolismu účinné látky podané pacientovi je důležitá hlavně z důvodu možné lékové interakce. Interakce mezi léčivy mohou terapii pacienta značně zkomplikovat. Mohou se objevit nejen vedlejší účinky, ale léčba může dokonce naprosto selhat. Lokalizace, specifické substráty a induktory lidských CYP zapojených do metabolismu léčiv jsou uvedeny v tabulce 3.

Nejdůležitějším cytochromem P450 účastnícím se metabolismu léčiv je CYP3A4. Jedná se o inducibilní enzym, jehož známými induktory jsou barbituráty, rifampicin nebo dexamethason. Největší množství CYP3A4 se nachází v játrech, ale vyskytuje se také v tenkém střevě, v plicích, v mozku nebo v placentě. V lidském plodu převládá existence formy CYP3A7, což se po porodu rychle mění, a forma CYP3A7 je téměř úplně nahrazena formou CYP3A4 (Stevens et al., 2003). Pro metabolismus léčiv je důležité, že aktivita tohoto enzymu mezi jednotlivci značně kolísá. Zatím se ovšem jednoznačně neprokázalo, že tato interindividuální variabilita aktivity CYP3A4 je dána genetickým polymorfismem.

Další důležitou formou cytochromu P450 s širokou substrátovou specificitou je CYP2D6. Stejně jako CYP3A4 se nachází především v játrech, ale také v mozku, plicích a v trávicím traktu. Je to enzym, který není indukovatelný. To znamená, že jeho množství v organismu je dáno genetickým vybavením. CYP2D6 vykazuje výrazný genetický polymorfismus, jehož důsledkem je existence tří hlavních fenotypů: pomalých, rychlých a ultrarychlých metabolizátorů. V praxi to znamená, že při podávání léčiv metabolizovaných CYP2D6 je třeba u pacienta zjistit příslušný genotyp popř. fenotyp a podle výsledku upravit dávkování. Mezi nejčastěji používané diagnostické markery pro určení fenotypu CYP2D6 patří spartein (používaný v porodnictví), debrisochin (antihypertensivum) nebo dextrometorfan (prostředek tišící kašel). Z farmakologického hlediska můžeme situaci popsat na příkladu tricyklických antidepresiv, kdy u pacientů s fenotypem pomalých metabolizátorů je nutné sledovat hladinu účinné látky v plazmě, protože zvýšené množství látky způsobené jejím pomalým metabolismem může vést ke kardiotoxickým účinkům (Baranová et al., 2004).

Členové podrodiny CYP2C (CYP2C8, 2C9, 2C10, 2C19) hrají v metabolismu léčiv rovněž významnou roli. Primárně se jedná o jaterní enzymy mající širokou substrátovou specifitu. CYP2C9 se účastní metabolických přeměn warfarinu (lék snižující krevní srážlivost), z dalších substrátů tohoto enzymu můžeme jmenovat diklofenak, ibuprofen, amitriptilin nebo karbamazepin. Druhým významným cytochromem P450 z této podrodiny je CYP2C19, který metabolizuje např. poměrně často užívaný diazepam, imipramin, omeprazol nebo (*S*)-mefenytin. Pro CYP2C19 je typický genetický polymorfismus, díky němuž je u pomalých metabolizátorů obtížné nalézt optimální dávkování léčiv.

CYP1A1 a CYP1A2 jsou dva enzymy ze stejné podrodiny. CYP1A2 je typickým jaterním enzymem, jeho hlavními substráty jsou aromatické aminy a polycyklické aromatické uhlovodíky. Z léčiv, které tento cytochrom P450 metabolizuje, můžeme jmenovat kofein, fenacetin, teofylin, takrin nebo clozapin. CYP1A1 se na rozdíl od CYP1A2 vyskytuje především extrahepatálně. Hladiny CYP1A1/2 jsou velmi variabilní, vzhledem k indukci širokým spektrem látek. Jako induktory působí např. látky obsažené v rostlinách z čeledi Brassicaceae, nebo látky přítomné v cigaretovém kouři (Anzenbacher and Anzenbacherová, 2001).

CYP	Lokalizace	Typický substrát	Typický induktor
1A1	plíce, játra, GIT, mozek, srdce, lymfocyty	PAH (polycyklické aromatické uhlovodíky)	PAH, dioxiny
1A2	játra	aromatické aminy, PAH, kofein	PAH, kouření, β-naftoflavon
1B1	srdce, plíce, kůže, placenta, játra, GIT, ledviny, slezina	PAH	dioxin
2A6	játra	kumarín, steroidy	barbituráty, dexametason
2B6	játra, srdce	nikotin	barbituráty
2C8	játra, ledviny	retinoidy, taxol	?
2C9	játra	tolbutamid, diklofenak, warfarin	rifampicin, barbituráty
2C19	játra, srdce	(S)-mefenytin, omeprazol, diazepam	rifampicin, barbituráty
2D6	játra, mozek, srdce	antidepresiva, β-blokátory	–
2E1	játra, plíce, mozek, srdce, kostní dřeň, endotel	ethanol, nitrosaminy, acetaminofen	ethanol, hladovění
2F	plíce	kumaríny	?
3A4/5	játra, GIT, ledviny, plíce, mozek, endotel, placenta, lymfocyty	steroidy, taxol, acetaminofen, cyklosporin, různé	steroidy, barbituráty
3A7	fétus, placenta, (játra)	dihydropyridiny	

Tabulka 3: Lidské cytochromy P450 zapojené v metabolismu xenobiotik a klinicky užívaných léčiv (Anzenbacher and Anzenbacherová, 2001).

Experimentální modely užívané pro studium metabolismu xenobiotik

Při studiu biotransformačních procesů nebo při vývoji nových léčiv je důležité porozumět molekulární podstatě metabolických přeměn. K tomuto účelu jsou využívány různé experimentální přístupy, které modelují reálnou situaci v lidském organismu. Pro studium metabolismu xenobiotik za účasti cytochromů P450 lze obecně využít metody *in vitro* nebo *in vivo*.

V přístupu *in vitro* patří mezi nejčastěji užívaný biologický materiál mikrosomální frakce jaterního homogenátu. Mikrosomy jsou membránové váčky vzniklé po rozbití endoplasmatického retikula. V membráně mikrosomů jsou přítomny nejen cytochromy P450, ale i další enzymy první fáze metabolismu xenobiotik (flavinové monooxygenasy, prostaglandin H syntasa) a některé enzymy druhé fáze např. UDP-glukuronosyltransferasy. V současné době se ke studiu metabolismu léčiv také často používají jednotlivé lidské rekombinantní CYP exprimované ve virových nebo bakteriálních hostitelských systémech. Komplexnější pohled na metabolické přeměny xenobiotik včetně sledování indukce proteinů umožňují hepatocyty (nebo buněčné linie odvozené od jaterních nádorových buněk), tkáňové řezy nebo perfundované orgány.

Experimenty *in vivo*, ale také *in vitro* se provádějí především na zvířecích modelech. V experimentální farmakologii patří k nejčastěji užívaným zvířatům potkan, králík, opice, prase nebo miniprase. Při vyhodnocování výsledků studií získaných na zvířecích modelech je nutné vzít v úvahu mezidruhové rozdíly v aktivitě a hlavně substrátové specifitě biotransformačních enzymů.

Je známo, že potkan není dobrým modelem pro studium metabolismu cizorodých látek probíhajícího za účasti cytochromů P450. Podstatné rozdíly existují zejména v případě lidského CYP3A4. Potkaní ortologní forma CYP3A1 není indukována rifampicinem, typickým induktorem lidských CYP3A (Lu and Li, 2001). Také řada důležitých substrátů lidského CYP3A4, např. nifedipin (dihydropyridinový blokátor kalciových kanálů) nebo steroidy, není přeměňována potkaními formami CYP3A. Nejvíce zastoupenou podrodinou v potkaních játrech jsou CYP2C, které často zastupují roli lidských CYP3A. Další enzym důležitý pro metabolismus léčiv, CYP2D6, je

u potkanů reprezentován ortologním CYP2D1. Tento enzym má sice velmi podobnou substrátovou specifitu jako lidský CYP2D6, ale chinidin (specifický inhibitor CYP2D6) nemá specifický inhibiční účinek na CYP2D1 (Zuber et al., 2002a).

Lidský CYP2D6 nemá srovnatelného partnera ani mezi CYP králíka. U králíků byly identifikovány geny dvou CYP2D (CYP2D23 a CYP2D24) (Yamamoto et al., 1998). Přibližně 1/3 léčiv testovaných na králících byla metabolizována jinými formami CYP, než je tomu u lidí. Úloha lidské formy CYP3A4 je u králíků pravděpodobně nahrazena CYP2C. Příkladem může být testosteron 6- β -hydroxylasa, což je u lidí CYP3A4, ale u králíků CYP2C3 (Zuber et al., 2002a).

Pes není tak často užívaným experimentálním modelem hlavně z důvodu etických. Určitá shoda s lidskými cytochromy P450 existuje v případě podrodiny CYP2D. Bylo prokázáno, že CYP2D15 je hlavní formou cytochromu P450 u psů a má enzymatickou aktivitu podobnou lidskému CYP2D6 (Roussel et al., 1998). Pes je mezi savci jediný druh schopný metabolizovat polycyklické aromatické uhlovodíky CYP2B11 (Guengerich, 1997).

U prasat a miniprasat byly nalezeny čtyři enzymy z podrodiny CYP3A (CYP3A22, 3A29, 3A39, 3A46) (Nannelli et al., 2008). Isolované prasečí jaterní CYP3A29 vykazovaly stejnou nifedipinoxidasovou aktivitu jako lidské CYP3A4 a CYP3A5. Hladina CYP3A29 byla zvýšena po indukci fenobarbitalem a rifampicinem, stejně jako je tomu u odpovídajících lidských forem (Monshouwer et al., 1998). Tato zjištění ukazují prase jako dobrý experimentální model pro sledování metabolismu xenobiotik zprostředkovaný lidskými CYP3A4.

Dobrým zvířecím experimentálním modelem pro metabolismus xenobiotik za účasti enzymů z podrodiny CYP2C se zdá být opice. Hydroxylace (*S*)-mefenytinu v poloze 4, za níž u člověka odpovídá CYP2C19, byla pozorována také u opic (Yasumori et al., 1993). Sharer et al. (1995) popsal mikrosomální aktivitu CYP2C u *Maccacus rhesus* podobnou jako u lidí.

Hlavní lidské mikrosomální CYP a jejich možné experimentální modely jsou uvedeny v tabulce 4.

CYP	% odhad zapojení jednotlivých CYP v metabolismu léčiv	marker aktivity	modelový systém
1A2	4	kofein	potkan, králík, prase, miniprase
2C9/2C19	11	diklofenak/(S)-mefenytol	opice (<i>Macacca mulatta</i>)
2D6	30	debrisochin, dextrometorfan, spartein	pes
2E1	2	chlorzoxazon	potkan, králík, prase, miniprase
3A4	52	nifedipin, erytromycin, alprazolam, dextrometorfan	prase, miniprase

Tabulka 4: Možné experimentální modely hlavních lidských jaterních mikrosomálních CYP (Zuber et al., 2002a).

2.1.2 Enzymy II. fáze metabolismus cizorodých látek

Produkty biotransformačních reakcí II. fáze byly v literatuře popisovány již od druhé poloviny 19. století. Vznikající konjugáty byly nalezeny v krevním séru, žluči nebo moči (Miners et al., 2006). Prvním identifikovaným konjugátem byla kyselina hipurová, která v lidském organismu vzniká konjugací reakcí kyseliny benzoové a aminokyseliny glycinu (Hutt and Caldwell, 1990).

Obecně řečeno, při biotransformačních přeměnách za účasti enzymů II. fáze vznikají takové produkty, které jsou zpravidla polárnější než výchozí látky, a proto se mohou snadněji vylučovat z těla močí nebo žlučí. Nejdůležitějšími enzymy II. fáze jsou transferasy: UDP-glukuronosyltransferasy (UGT), sulfotransferasy (SULT), N-acetyltransferasy (NAT), glutathion S-transferasy (GST), thiopurin S-methyltransferasa (TPMT) a katechol O-methyltransferasa (COMT). Z dalších významných enzymů této fáze můžeme jmenovat enzymy účastnící se konjugace s aminokyselinami.

Enzymy II. fáze metabolismu cizorodých látek hrají důležitou roli v biotransformaci jak endogenních látek, tak xenobiotik. Podrobně je zkoumána jejich úloha při inaktivaci farmakologicky aktivních sloučenin. Biotransformační reakce II. fáze jsou obecně pokládány za reakce detoxikační; mnohé metabolity jsou skutečně méně toxické než výchozí látky. Neplatí to však zdaleka univerzálně. V některých případech může docházet k metabolické aktivaci, např. některé prokarcinogeny jsou sulfatovány za vzniku vysoce reaktivních intermediátů, které mohou působit jako karcinogeny nebo mutageny kovalentní vazbou na DNA (Surh, 1998). Příkladem takové toxifikace může být sulfokonjugace aromatických hydroxylaminů, kdy vzniklé reaktivní intermediáty mají mutagenní účinky (Meinl et al., 2002).

Předmětem zájmu v poslední době je studium genového polymorfismu těchto enzymů. Různá intenzita konjugací reakcí, daná genetickým polymorfismem, může hrát roli při vzniku některých forem rakoviny např. rakoviny plic (Arslan et al., 2009), jater, střeva (Agúndez, 2008), mozku (Bardakci et al., 2008) nebo nádorů močových cest (Huang et al., 2009).

Experimentální část předkládané disertační práce je zaměřena na interakce silybinu s hlavními enzymy II. fáze metabolismu cizorodých látek, s UDP-glukuronosyltransferasami, proto budou v následujícím textu blíže popsány právě tyto enzymy.

2.1.2.1 UDP-glukuronosyltransferasy

UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) jsou klíčovými enzymy glukuronidačních reakcí. UGT tvoří superrodinu membránově vázaných enzymů, které katalyzují konjugace nukleofilních substrátů (alifatických alkoholů, fenolů, karboxylových kyselin, thiolů a aminů) s UDP-glukuronovou kyselinou (UDP-GA) (Fisher et al., 2001). Jsou zodpovědné za metabolismus jak xenobiotik (např. léčiv, chemických karcinogenů, doplňků stravy), tak i endobiotik (např. bilirubinu, steroidních hormonů, hormonů štítné žlázy, žlučových kyselin nebo vitamínů rozpustných v tucích) (Kiang et al., 2005; Cashman et al., 1996). U lidí jsou UGT nejvýznamnějšími enzymy metabolizujícími až polovinu klinicky užívaných léčiv v druhé fázi jejich biotransformace (Wells et al., 2004).

Formy UGT, jejich tkáňová a buněčná distribuce

V lidském organismu byly identifikovány čtyři rodiny UGT: UGT1, UGT2 (rozdělená do podrodin 2A a 2B), UGT3 a UGT8. Enzymy rodin UGT1 a UGT2 využívají UDP-GA ke glukuronidaci endobiotik i xenobiotik. Rodina UGT8 plní biosyntetickou roli v nervovém systému, kde využívá UDP-galaktosu ke galaktosidaci ceramidů, což je důležitý krok v syntéze glykosfingolipidů a cerebrosidů. Funkce rodiny UGT3 zůstává zatím nejasná. UGT3A1 byla nedávno identifikována jako N-acetylglukosaminyltransferasa (Mackenzie et al., 2008).

Enzymy každé rodiny se shodují přinejmenším v 40 % sekvence DNA a enzymy každé podrodiny nejméně v 60 % (Burchell et al., 1995). Podle nomenklaturního systému označuje arabská číslice (uváděná za zkratkou názvu) rodinu (UGT1), písmeno podrodinu

(UGT1A) a druhá arabská číslice konkrétní enzym odpovídající příslušnému genu (UGT1A1) (Mackenzie et al., 2005).

Do současnosti bylo identifikováno 22 lidských UGT: UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2A1, 2A2, 2A3, 2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15, 2B17, 2B28, 3A1, 3A2 a 8A1 (Miners et al., 2006; Mackenzie et al., 2008; Court et al., 2008; Patten, 2006; Sneitz et al., 2009). Popsané enzymy mají širokou tkáňovou distribuci, přičemž nejvíce jsou zastoupeny v játrech. Za nejdůležitější jaterní formy jsou považovány UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B7 a 2B15. Naproti tomu UGT1A7, 1A8 a 1A10 jsou formy exprimované výhradně v gastrointestinálním traktu (Gregory et al., 2004; Tukey and Strassburg, 2001; Cheng et al., 1999). Expres UGT byla popsána také v ledvinách (Sutherland et al., 1993), mozku, slinivce (King et al., 1999), placentě (Collier et al., 2002) a v nosním epitelu (Sneitz et al., 2009). V buňce jsou UGT lokalizovány na luminální straně endoplasmatického retikula (Tukey and Strassburg, 2000).

Substráty a inhibitory UGT

UDP-glukuronosyltransferasy vykazují širokou, překrývající se substrátovou specificitu. Do dnešní doby bylo identifikováno pouze několik selektivních substrátů pro konkrétní UGT formy. Z nich můžeme uvést jako příklad UGT1A1, která je jedinou formou, zodpovědnou za glukuronidaci bilirubinu (Wang et al., 2006). UGT2B7 je hlavní formou, která glukuroniduje opiáty (Coffman et al., 1998). UGT1A3, 1A9 a 2A1 se účastní glukuronidace karboxylové kyseliny; UGT1A4 a 1A3 katalyzují N-glukuronidaci aminů. Komplexní fenoly a primární aminy jsou substráty pro UGT1A6 (Miners et al. 2006; King et al., 2000; Tukey and Strassburg 2000). Lewinsky et al. (2005) ve svých experimentech zjistili, že ze 42 testovaných flavonoidů jich bylo 34 glukuronidováno UGT1A10, Chen et al. (2008) popsali glukuronidaci flavonoidů UGT1A3 a 1A9.

Nízkou specificitou se vyznačují také inhibitory UDP-glukuronosyltransferas. V současné době jsou popisovány jen dva selektivní inhibitory UGT forem. Jedním z nich je hecogenin (steroidální saponin), který selektivně inhibuje UGT1A4, druhým je flukokonazol selektivně inhibující UGT2B7 (Uchaipichat et al., 2006a; Uchaipichat et al.,

2006b). Aktivita UGT1A4 může být také inhibována bilirubinem, selektivním substrátem UGT1A1 (Ghosal et al., 2004).

Genetický polymorfismus UGT

Genetický polymorfismus byl identifikován u celé řady forem UGT: UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2A1, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B15 a UGT2B28 (Guillemette, 2003; Mori et al., 2005; Jinno et al., 2003; Iida et al., 2002). Nejvíce studovaným je polymorfismus UGT1A1. Kadakol et al. (2000) shromáždil informace o více jak 50 mutacích *UGT1A1*, které způsobují Criegel-Naijjar syndrom typu I. Tento syndrom byl popsán už v roce 1952 jako kongenitální familiární nehemolytická žloutenka spojená s kretenismem. Jedná se o autosomálně recesivní onemocnění (Arias et al., 1969; Labrune et al., 1989), kdy pacienti mají kompletní absenci UGT1A1 (typ I), nebo mají částečný deficit tohoto enzymu bez neurologického nebo intelektuálního poškození (typ II).

Další popsanou chorobou způsobenou mutací v *UGT1A1* genu je Gilbertův syndrom. Jedná se o autosomálně dominantní onemocnění, které se projevuje jako mírná nepřímá hyperbilirubinémie bez hyperhemolýzy či známek jaterního onemocnění. Tato benigní intermitentní žloutenka se nalézá v populaci s frekvencí ~10 % (Ehmer et al., 2008).

Mezidruhové rozdíly v UGT

Glukuronidace reprezentuje důležitou metabolickou dráhu jak u lidí, tak i u dalších živočišných druhů. Ačkoliv jsou např. opice, potkani nebo prasata velmi často užívanými experimentálními modely pro studium biotransformace xenobiotik, řada studií ukazuje mezidruhové rozdíly v procesu glukuronidace těchto látek. Ve studii, která byla provedena na našem pracovišti (Matal et al., 2008), jsme popsali rozdíly v stereoselektivitě při vzniku monoglukuronidů silybinu za účasti UDP-glukuronosyltransferas přítomných v jaterní mikrosomální frakci prasat, opic,

potkanů a psů. Z výsledků naší práce vyplývá, že nejlepším zvířecím modelem pro sledování konjugačních reakcí silybinu za účasti UGT je pes a opice.

Wen et al. (2007) se zabýval sledováním mezidruhových rozdílů v glukuronidaci léčiva proti HIV-infekci (beviramatu, BVM) a podařilo se mu identifikovat dva monoglukuronidy BVM, a to BVMG1 a BVMG2. BVMG1 byl preferenčně tvořen UGT přítomnými v psí jaterní mikrosomální frakci, zatímco BVMG2 UGT přítomnými v jaterní mikrosomální frakci kosmanů. Nejlepším glukuronidačním modelem, ve srovnání s lidským, se v tomto případě zdál být model potkana. Zajímavým poznáním je, že kočky mají velmi nízkou hladinu jaterní UGT1A6. To vysvětluje skutečnost, že kočky velmi málo glukuronidují paracetamol (Court and Greenblatt, 1997a), acetaminofen (Court and Greenblatt, 1997b) a serotonin (Krishnaswamy et al., 2003). Kočka z tohoto pohledu není vhodným zvířecím modelem pro sledování farmakokinetiky léčiv.

2.2 Polyfenolové sloučeniny

2.2.1 Rozdělení a účinky polyfenolů

Polyfenolové sloučeniny jsou skupinou biologicky aktivních přírodních látek. Mezi nejběžnější rostlinné polyfenoly patří fenolové kyseliny, stilbeny, lignany, flavonoidy (tj. flavony, flavonoly, flavanony, katechiny, flavanoly, anthokyany, isoflavony, chalkony) nebo flavonolignany (Modrianský a kol., 2003).

Do současné doby bylo ve vyšších rostlinách identifikováno několik tisíc molekul odpovídající svou strukturou polyfenolům. V rostlinách jsou tyto látky produkovány jako sekundární metabolity, které mají za úkol např. chránit rostlinu před patogenními mikroorganismy nebo před ultrafialovým zářením. Společným strukturním rysem těchto sloučenin je, že obsahují jedno nebo více aromatických jader substituovaných hydroxylovými skupinami. Polyfenolové sloučeniny se vyskytují v přírodě převážně jako β -glykosidy, sacharidovou složkou je nejčastěji glukosa, ale může jí být také galaktosa, rhamnosa, xylosa, arabinosa, kyselina glukuronová nebo jiný sacharid (Bravo, 1998).

Polyfenoly jsou zastoupeny v běžně konzumovaných potravinách, zejména v ovoci, zelenině, v některých ovocných nápojích nebo bylinných extraktech. Polyfenolové sloučeniny vykazují široké spektrum fyziologicky příznivých účinků. Známa je jejich antioxidační aktivita, která je důsledkem jejich schopnosti zhášet reaktivní kyslíkové radikály a současně omezovat jejich tvorbu chelatací především kationtů železa, odpovědného za produkci vysoce reaktivních hydroxylových radikálů. S léčebným cílem jsou polyfenolové sloučeniny také užívány např. pro své účinky antibakteriální, antivirové, protinádorové, protizánětlivé nebo hepatoprotektivní (Hodek et al., 2002).

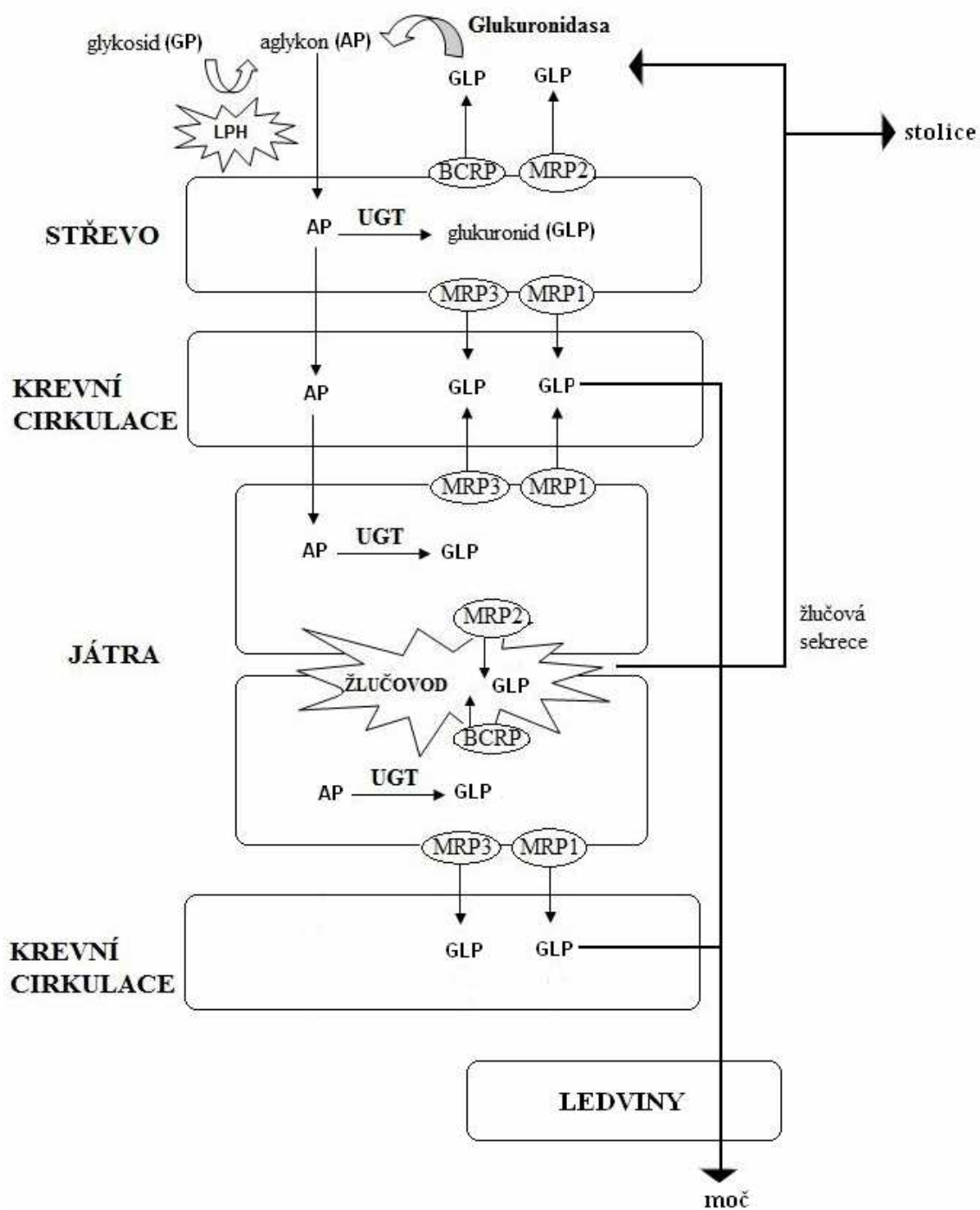
2.2.2 Biodostupnost polyfenolů a jejich metabolismus

Fyziologické účinky přírodních látek závisí na jejich biologické dostupnosti, tedy schopnosti dostat se do systémové cirkulace, a dále na možnosti jejich biodistribuce. Obecně řečeno, schopnost vstřebat se z trávicího traktu a přechod do krevní cirkulace závisí na rozpustnosti, metabolismu a exkreci daných látek. Orální biodostupnost polyfenolů je velmi nízká, pohybuje se mezi 2-20 % (Hu, 2007). Hlavním místem jejich resorpce v trávicím traktu je tenké a tlusté střevo. Polyfenolové sloučeniny, které jsou v potravě přítomné často ve formě glykosidů, jsou obvykle velmi polární nebo mají velkou molekulovou hmotnost, což brání v překonání bariéry střevní stěny. Odštěpení polární složky je nezbytné pro prostou difúzi polyfenolů přes kartáčový lem tenkého střeva do krve portálního oběhu. Pro hydrolýzu glykosidů má největší význam enzym laktasa (LPH, laktasa-florizin hydrolasa) lokalizovaná na vnější straně membrány kartáčového lemu enterocytů. Polyfenoly, které nejsou resorbovány v tenkém střevě, se dostávají do tlustého střeva, kde jsou metabolizovány střevními bakteriemi převážně na fenolové kyseliny, které se rovněž mohou resorbovat z trávicího traktu (Slanina a Táborská, 2004).

Po resorpci z trávicího traktu mohou být polyfenoly dále metabolizovány biotransformačními enzymy přítomnými v buňkách střevního epitelu nebo v játrech, do kterých se dostanou krevní cirkulací. Hlavní metabolickou přeměnou polyfenolů jsou konjugační reakce. Významné jsou konjugace s kyselinou glukuronovou, sírovou nebo

glycinem. Mezi lidské UGT, které se účastní biotransformace přírodních polyfenolů, patří UGT1A8 a 1A10 exprimované výhradně v gastrointestinálním traktu, ale také formy UGT1A1, 1A6 a 1A9 exprimované převážně v játrech (Liu and Hu, 2007).

Proces vstřebávání, metabolismu a vylučování polyfenolů je poměrně komplikovaný. Aglykony, vzniklé odštěpením sacharidové složky mohou procházet ze střeva do krve prostou difúzí. Jiná situace nastává, když za účasti UDP-glukuronosyltransferas přítomných v enterocytech vznikají konjugáty s kyselinou glukuronovou. Ty mohou být z enterocytů do krve přenášeny pomocí efluxních transportérů např. P-glykoproteinem nebo MRP (multidrug resistance protein). Z krevního oběhu dochází k vyloučení významného množství aglykonu i konjugátů močí. Dalším místem, kde dochází ke konjugačním reakcím jsou játra. Konjugáty vzniklé v hepatocytech, mohou opět za účasti efluxních transportérů přecházet buď do krve, nebo mohou být žlučovou sekrecí vylučovány do tlustého střeva, kde dochází opět ke kontaktu se střevními bakteriemi. Účinkem bakteriálních enzymů (β -glukosidasy, glukuronidasy, sulfatasy) může docházet ke štěpení jak glykosidů, tak i vzniklých konjugátů. Znovu vzniklé aglykony mohou být zpětně reabsorbovány (Liu and Hu, 2007; Ahrene and O'Brien, 2002; Zhang et al., 2007). Enterorohepatální cirkulace je znázorněna na obr. 1. Polyfenoly se vylučují z organismu převážně ve formě polárních, ve vodě dobře rozpustných konjugátů močí nebo žlučí.



Obr. 1: Enterohepatální cirkulace polyfenolů.

2.3 Ostropestřec mariánský

Ostropestřec mariánský (obr. 2), známý také pod svým botanickým názvem *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (synonymum *Carduus marianus* (L.)), je statná bodlákovitá rostlina patřící do čeledi hvězdnicovitých (Asteraceae). Jedná se o jednoletou až dvouletou, 20-150 cm vysokou rostlinu, pocházející ze středomoří. V současné době se vyskytuje se nejen v jižní Evropě, ale i v jižní a severní Americe, jižní Austrálii, střední Evropě, Číně a Asii (Radjabian et al., 2008). U nás se pěstuje v zahrádkách, někdy roste divoce na rumišťích a kamenitých stráních. Má purpurové květy a ostnaté listy mají bílé žilkování, které je rozlišovacím znakem typickým pro ostropestřec. Kvete od června do srpna a koncem léta se sbírají jeho semena, která se používají k léčebným účelům. Ostropestřec je jednou z nejvíce studovaných léčivých bylin. Extrakt ze semen této rostliny, nazývaný silymarin, se užívá již po staletí jako přírodní léčivo chorob jater a žlučových cest. Pozitivní účinky silymarinu byly známy již v době antiky. Semena dále obsahují olej s vysokým podílem nenasycených mastných kyselin, aminokyseliny, sacharidy, alkaloidy, saponiny, hořčiny, silice, organické kyseliny a vitamíny C, E a K (Morazzoni and Bombardelli, 1995).



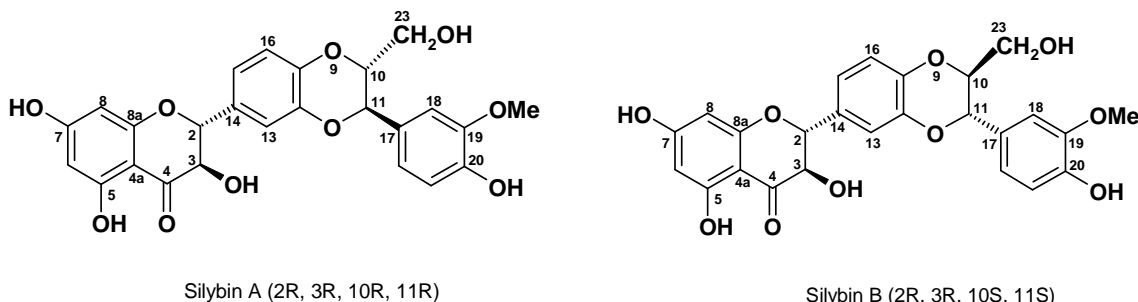
Obr. 2: Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.).

Jak již bylo zmíněno, aktivní složkou ostropestřce mariánského je silymarin. Názvem silymarin se označuje přečištěný standardizovaný extrakt ze sušených semen rostliny, který obsahuje přibližně 70-80 % tzv. silymarinového komplexu (silymarinové flavonolignany a flavonoidy) a 20-30 % zatím přesně chemicky nedefinované polyfenolické frakce. Hlavní obsahovou složkou silymarinového komplexu je silybin, považovaný také za nositele většiny biologických aktivit silymarinu. Další důležité

součástí silymarinového komplexu jsou flavonolignany isosilybin, dehydrosilybin, silydianin, silychristin a několik flavonoidů, z nichž můžeme jmenovat např. taxifolin (Gažák et al., 2007).

2.3.1 Silybin

Flavonolignan silybin (synonymum silibinin, CAS No. 22888-70-6) je směsí dvou diastereomerů (obr. 3), silybinu A (3-(*R*),5,7-trihydroxy-2-(*R*)-[3-(*R*)-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(*R*)-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl]chroman-4-on) a silybinu B (3-(*R*),5,7-trihydroxy-2-(*R*)-[3-(*S*)-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(*S*)-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl]chroman-4-on) v přibližném poměru 1:1.



Obr. 3: Struktura diastereomerů silybinu.

2.3.2 Léčebné účinky silybinu/silymarinu

Silybin/silymarin je v humánním lékařství znám jako rostlinné hepatoprotektivum. V *in vivo* pokusech na zvířatech bylo zjištěno, že silybin/silymarin redukuje poškození jater způsobené acetaminofenem (Campos et al., 1989; Muriel et al., 1992), tetrachlormethanem (Halim et al., 1997), radiací (Haková and Misúrová, 1993),

fenylhydrazinem (Valenzuela and Guerra, 1985), alkoholem (Comoglio et al., 1995) nebo muchomůrkou zelenou (*Amanita phalloides*) (Vogel et al., 1984).

Do dnešní doby je nejvýznamnější indikací silymarinu otrava muchomůrkou zelenou. Toxickou látkou této houby je α -amanitin, což je cyklický oktapeptid, který inhibuje RNA polymerasu II, a tak zasahuje do syntézy proteinů. Důsledkem tohoto procesu je poškození buněčných membrán, organel a jader hepatocytů. Pozitivní působení silymarinu při otravě muchomůrkou zelenou spočívá v zásahu do následujících mechanismů: 1) přerušení enterohepatální recirkulace α -amanitinu; 2) inhibice vazby phalloidinu a α -amanitinu na membránu hepatocytů a 3) kompetice s α -amanitinem o transmembránové transportéry (Stickel and Schuppan, 2007). Z publikovaných dat vyplývá, že silymarin významně snižuje mortalitu při otravě muchomůrkou zelenou vzhledem ke standardní léčbě (9,8 % vs. 18,3 %) (Saller et al., 2001).

Výčet kladných vlastností silybinu/silymarinu je třeba doplnit také informací o jeho chemoprotektivním, antioxidačním, protinádorovém (založeném na cytoprotektivní aktivitě), protizánětlivém nebo imunomodulačním působením; snižuje také hladinu cholesterolu v krvi (Gažák et al., 2007).

Silybin/silymarin je považován za bezpečný doplněk stravy. Obvykle je užíván ve formě tablet, které obsahují okolo 100 mg extraktu ze semen ostropestřce mariánského. Podobně jako u všech přípravků nebo léčiv, může mít i přípravek silymarin nežádoucí účinky. Z možných nežádoucích účinků se mohou objevit zažívací obtíže (jako je nevolnost nebo mírně projímavý účinek) a hypersenzitivní reakce (vyrážka, svědění nebo dušnost) (Jacobs et al., 2002).

2.3.3 Biodostupnost silybinu

Biodostupnost silybinu je nízká, což je dáno jednak jeho špatnou rozpustností ve vodě, dalším důvodem je rychlý metabolismus zejména za účasti konjugačních enzymů II. fáze biotransformace. Po perorálním podání tablety silymarinu (což v daném případě odpovídalo 120 mg silybinu) byla naměřena plasmatická koncentrace celkového silybinu (konjugovaného + nekonjugovaného) u zdravých mužských dobrovolníků

v rozmezí 1,1-1,3 µg/ml (Kim et al., 2003). Doba, kdy bylo dosaženo maximální koncentrace silybinu v plasmě (hodnota T_{max}) se pohybovala mezi 1 a 2 hodinami.

V roce 1989 byla objevena fytosomová technologie založená na poznatku, že některé polyfenoly mají silnou vazebnou afinitu pro fosfolipidy obsažené v neporušených tkáních rostlin. Chemickou reakcí fosfatidylcholinu s polyfenolem vzniká fytosom, který má rozpustnost podobnou jako amfipatický fosfatidylcholin (Kidd, 2009). Důležitým faktem je, že zvýšením rozpustnosti polyfenolů prostřednictvím fytosomů se zvyšuje také jejich biodostupnost. Prvním popsáním fytosomem byl fytosom vytvořený ze silybinu a fosfatidylcholinu. V klinické studii byl silybin (120 mg) ve fytosomové formě podáván dobrovolníkům po dobu 8 dní. Po této době bylo zjištěno, že silybin je absorbován 4,6 krát lépe z fytosomů ve srovnání s jeho běžnou aplikací (Barzaghi et al., 1990).

2.3.4 Modulace aktivit hlavních biotransformačních enzymů I. a II. fáze a efluxních transportérů silybinem

Cytochromy P450 a UDP-glukuronosyltransferasy

Silybin se stal v posledních několika letech jedním z nejvíce zkoumaných doplňků stravy zejména z důvodů modulace nejen enzymových aktivit, ale také aktivit efluxních transportérů. Možné lékové interakce se mohou objevovat jak na úrovni enzymů I. fáze metabolismu cizorodých látek, hlavně cytochromů P450 (CYP), tak na úrovni enzymů II. fáze, zejména UDP-glukuronosyltransferas (UGT). V literatuře jsou popisovány inhibice aktivit několika forem CYP silybinem. Nejenom aktivita CYP3A4 byla inhibována mikromolárními dávkami silybinu (Beckmann-Knopp et al., 2000; Zuber et al., 2002b; Sridar et al., 2004; Jančová et al., 2007), ale také další aktivity forem cytochromu P450, CYP2D6 a CYP2C9, byly silybinem inhibovány.

Inhibiční vlastnosti silybinu na aktivitu UGT byly také sledovány na několika výzkumných pracovištích. D'Andrea et al. (2005) navrhl, že inhibiční efekt silybinu je omezen především na UGT1A enzymy. Interferenci silybinu s modelovými substráty lidských rekombinantních UGT studoval Sridar et al. (2004). Silybin v jeho experimentu

inhiboval enzymatickou aktivitu forem UGT1A1, 1A6, 1A9, 2B7 a 2B15. Inhibice aktivit UGT1A6 a UGT1A9 silybinem byla popsána také dalším autorem Venkataramanan et al. (2000).

ABC transportní proteiny (efluxní transportéry)

Klinický a toxikologický význam ABC transportérů (z anglického *ATP-binding cassette*) spočívá v jejich značném podílu na distribuci a eliminaci xenobiotik. Tyto transportéry se podílejí jak na importu (influxu) látek do buněk, tak na jejich exportu (efluxu) z buněk. Jsou preferenčně lokalizovány v orgánech a strukturách s exkreční a bariérovou funkcí, tj. v játrech, střevě, ledvinách, plicích, placentě, mozku a gonádách (Morris and Zhang, 2006). Polyfenoly jsou substráty většiny farmakologicky významných ABC transportérů, P-glykoproteinu (P-gp), multidrug resistantního proteinu (MRP), BCRP (protein rezistence karcinomu prsu) nebo OAT (transportér organických kationtů). Modulací (inhibicí, indukci) těchto transportérů se výrazně snižuje nebo zvyšuje orální biodostupnost podávaných léčiv nebo obecně xenobiotik (Alvarez et al., 2010).

Modulace aktivity lidského OAT1 silybinem byla popsána v práci Hong et al. (2007). Silybin zde inhiboval vstup [³H]-*para*-aminohipurové kyseliny do psích buněk transfekovaných lidským OAT1. Nguyen et al. (2003) popsali inhibici transportéru MRP1 silybinem. 100 μmol/l silymarin významně zvyšoval akumulaci daunomycinu a vinblastinu v buněčné linii Panc-1 (buněčná linie lidského adenokarcinomu slinivky), která exprimuje MRP1. V jiné práci byla rovněž popsána inhibice P-gp silymarinem. Silymarin zvyšoval cytotoxicitu doxorubicinu v P-gp pozitivních buňkách inhibicí P-gp ATPasové aktivity (Zhang and Morris, 2003). Studie vlivu silymarinu na farmakokinetiku digoxinu v podmínkách *in vivo* ale navrhl, že silymarin nemoduluje aktivitu P-gp u zdravých dobrovolníků (Gurley et al., 2006).

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Záměrem předkládané disertační práce bylo doplnit poznatky v oblasti interakcí silybinu s biotransformačními enzymy I. a II. fáze metabolismu cizorodých látek a identifikovat vznikající metabolity.

Konkrétní cíle:

1. Interakce silybinu s cytochromy P450:

- * ověřit míru inhibice lidských jaterních mikrosomálních cytochromů P450 silybinem (*in vitro*)
- * identifikovat metabolity silybinu vzniklé účinkem cytochromů P450 přítomných v mikrosomální frakci jater
- * zjistit, která forma cytochromu P450 je odpovědná za tvorbu metabolitu

2. Interakce silybinu s UDP-glukuronosyltransferasami (UGT):

- * identifikovat metabolity silybinu vzniklé působením UGT přítomných
 - a) v lidských hepatocytech
 - b) v mikrosomální frakci jater
- * zjistit, které formy UGT jsou odpovědné za tvorbu metabolitů
- * popsat stereoselektivní metabolismus silybinu pomocí lidských rekombinantních UGT

3. Identifikace metabolitů vznikajících při biotransformaci silybinu v plazmě a moči dobrovolníků.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Enzymové systémy

4.1.1 Hepatocyty

Segmenty lidských jater byly získány od multiorgánových dárců, muže 55 let a ženy 61 let. Odběr a zpracování materiálu bylo prováděno s povolením etické komise v souladu s platnou českou legislativou. Hepatocyty byly izolovány podle metody Pichard-Garcia et al. (2002). Po izolaci byly hepatocyty vysety na kultivační desky pokryté vrstvou kolagenu o hustotě $1,4 \times 10^5$ buněk/ml. Kultivační médium (složené dle Isom et al., (1985)) bylo obohaceno pro vysetí 2% fetálním bovinním sérem. Médium bylo vyměněno za bezsérové den poté a kultura byla ponechána stabilizaci po dobu 48 - 72 hodin před vlastní aplikací testované látky (silybinu). Kultury byly uchovány v inkubátoru při teplotě 37 °C a v 5% CO₂.

4.1.2 Mikrosomy

Směsné lidské jaterní mikrosomy (váčky vzniklé z endoplazmatického retikula při homogenizaci jaterní tkáně) byly zakoupeny od firem Advancell (Barcelona, Španělsko) a Biopredic (Rennes, Francie). Mikrosomy byly získány v souladu s etickými pravidly země původu.

směsné lidské mikrosomy (Advancell): $c_{\text{proteinu}} = 38,4 \text{ mg/ml}$ $c_{\text{P450}} = 8 \text{ } \mu\text{mol/l}$

směsné lidské mikrosomy (Biopredic): $c_{\text{proteinu}} = 25 \text{ mg/ml}$ $c_{\text{P450}} = 15,5 \text{ } \mu\text{mol/l}$

4.1.3 Rekombinantní enzymy

Baktosomy (bakteriální membránová frakce z *Escherichia coli*) obsahující rekombinantní lidské cytochromy P450 (CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2D6, 2E1 a 3A4), koexprimované s lidskou NADPH-cytochrom P450 reduktasou, byly zakoupeny od firmy Cypex (Dundee, Velká Británie).

Lidské UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7, 2B15 a 2B17 Supersomy (lidské UDP-glukuronosyltransferasy exprimované v buňkách hmyzu infikovaných rekombinantním bakulovirem) byly zakoupeny od firmy BD Biosciences zprostředkovaně přes firmu Interact (Praha, Česká republika).

4.2 Chemikálie

Silybin (SAB, směs diastereomerů A a B v přibližném poměru 1:1) byl darován Dr. Cvakem z firmy TEVA, Divize TAPI (Opava, Česká republika).

Diastereomery silybinu (silybin A (SA) a silybin B (SB)) a standardy 7-*O*- β -D- a 20-*O*- β -D- glukuronidů silybinu byly získány darem od prof. Křena z Mikrobiologického ústavu AV ČR.

Chlorzoxazon, 6-hydroxychlorzoxazon, diklofenak, 4-hydroxydiklofenak, bufuralol, 6-hydroxybufuralol a 6 β -hydroxytestosteron byly dodány firmou Ultrafine Chemicals (Salford, Velká Británie).

P450-Glo luminiscenční substrát pro stanovení aktivity CYP2C8 byl zakoupen od firmy Promega (Madison, Wiskonsin, USA) zprostředkovaně přes firmu East Post (Praha, Česká republika).

7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)kumarin byl dodán firmou Fluka (Buchs, Švýcarsko).

Testosteron, 7-ethoxyresorufin, kumarin, (*S*)-mefenytin, furafylin, sulfafenazol, triacetyloleandomycin, diethyldithiokarbamát, guanidin, 8-methoxypsoralen, 7-pentoxyresorufin, kvercetin, síran hořečnatý, chlorid hořečnatý, DL-isocitrát, isocitrátdehydrogenasa, nikotinamidadenindinukleotidfosfát, Trizma base, propan-2-ol, ethylacetát, trisodná sůl kyseliny uridin 5'-difosfoglukuronové a 1,4-lakton D-sacharové kyseliny (monohydrát) byly dodány firmou Sigma Aldrich (Praha, Česká republika).

Od firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) byly zakoupeny: dichlormethan, dimethylsulfoxid, chloroform, kyselina mravenčí, kyselina octová, kyselina chlorná, kyselina chloristá, kyselina fosforečná, dihydrofosforečnan draselný a chlorid sodný.

Další chemikálie byly následujícího původu: acetonitril a methanol (Merck, Česká republika), dusík a oxid uhelnatý (Linde Technoplyn, Česká republika), uhličitan sodný a chlorid draselný (Lachema, Česká republika).

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a., vhodné pro experimenty s biologickým materiálem a pro enzymová stanovení.

4.3 Přístrojové vybavení

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

analytické váhy GR-202 (dodáno firmou Schoeller Instruments, Praha, CZ)

analytické váhy Sartorius 4503 MP 6E (Göttingen, Německo)

centrifuga BR4i (Jouan, Saint Nazaire, Francie)

centrifuga Eppendorf mini spin (Eppendorf, Hamburg, Německo)

centrifuga chlazená Z 323 K (Hermle, dodává Biotech, Praha, CZ)

koncentrátor vzorků TERMOVAP TV 10 (ECOM, Praha, CZ)

magnetická míchačka Heidolph MR 1 000

(dodáno firmou Fischer Scientific, Pardubice, CZ)

minitřepačka IKA MS 3 basic (dodáno firmou MERCI s.r.o, Brno)

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

sonikátor (Dynatech, Brno, CZ)

spektrofluorofotometr Shimadzu RF-1501 (Shimadzu, Tokyo, Japonsko)

UV-VIS spektrofotometr, TECAN Infinite M200

(dodáno firmou Schoeller Instruments, Praha, CZ)

suchá lázeň MD-MP01-D (dodáno firmou Biotech, Praha, CZ)

ultrazvuk K 10 (Kraintek, Podhájska, Slovensko)

vakuový extraktor Visiprep SPE Vacuum Manifold (Supelco, Praha, CZ)

vodní lázeň WB 14 (Memmert, Schwabach, Německo)

vortex Heidolph Reax Top (dodáno firmou Fischer Scientific, Pardubice, CZ)

zařízení pro přípravu čisté a ultračisté vody Watrex Ultrapur (Watrex, Praha, CZ)

HPLC systém:

Software (Shimadzu CLASS-VP, Japonsko), řídicí jednotka (Shimadzu systém controller SCL-10AVP, Japonsko), detektor (Shimadzu UV-VIS detektor SPD-10AVP, Japonsko), vyhřívání kolony (Shimadzu column oven CTO-10AC, Japonsko), autosampler se smyčkou 50 μ l (Shimadzu Autoinjector SIL-10ADVP, Japonsko), degaser mobilní fáze (Prominence degasser DGU-20A5, Japonsko), pumpa (Shimadzu Liquid chromatograph LC-10AT, Japonsko).

LC/MS systém:

Hmotnostní spektrofotometr LCQ Fleet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) vybavený ESI (ionizace elektrospřejem) sondou a iontovou pastí. Software Mass Frontier 5.0 (HighChem; Bratislava, Slovenská republika).

μ LC/MS systém:

Mikrokapalinový chromatograf CapLC XE spojený s Q-ToF Premier hmotnostním spektrofotometrem (Waters, Milford, USA).

4.4 Metabolismus silybinu cytochromy P450 in vitro

4.4.1 Stanovení enzymových aktivit jednotlivých forem cytochromů P450

Aktivity jednotlivých forem cytochromu P450 se studují pomocí markerových substrátů. Používané markerové substráty, principy metod stanovení enzymových aktivit jednotlivých CYP a Michaelisovy konstanty (K_m) stanovené v lidské jaterní mikrosomální frakci jsou uvedeny v tabulce 5.

CYP	Markerový substrát a princip stanovení enzymové aktivity CYP	K _m
1A2	7-ethoxyresorufin je O-deethylován za vzniku fluorescenčního produktu resorufinu, který je detekován spektrofluorimetry při excitační vlnové délce 535 nm a emisní vlnové délce 585 nm.	2,4 μmol/l
2A6	Kumarin je hydroxylován na fluoreskující produkt 7-hydroxykumarin jehož množství se měří při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 465 nm.	8,2 μmol/l
2B6	7-ethoxy-4-(trifluoromethyl)-kumarin (EFC) je O-deethylován za vzniku fluorescenčního produktu 7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)-kumarinu (HFC), který se detekuje spektrofluorimetry s excitační vlnovou délkou 410 nm a emisní vlnovou délkou 510 nm.	14,1 μmol/l
2C8	Luminiscenční substrát luciferin-ME (luciferin 6'-methylether) je 6'-demethylován za vzniku luciferinu. Následnou oxidací luciferasou se uvolňuje světelné záření- luminiscence.	–
2C9	Diklofenak je hydroxylován za vzniku 4'-hydroxydiklofenaku jehož množství je detekováno při vlnové délce 280 nm.	15,9 μmol/l
2C19	(S)-mefenytin je 4'-hydroxylován za vzniku 4'-hydroxymefenytinu, který je detekován při vlnové délce 200 nm.	81 μmol/l
2D6	Bufuralol je hydroxylován za vzniku produktu 1'-hydroxybufuralolu, který je fluorescenčně detekován (excitační filtr 252 nm a emisní 302 nm).	25,3 μmol/l
2E1	Chlorzoxazon je 6-hydroxylován za vzniku 6-hydroxychlorzoxazonu jehož množství se měří při vlnové délce 287 nm.	52 μmol/l
3A4	Testosteron je hydroxylován za vzniku 6β-hydroxytestosteronu, který je detekován při vlnové délce 254 nm.	77,5 μmol/l

Tabulka 5: Používané markerové substráty, principy metod stanovení aktivit jednotlivých CYP a Michaelisovy konstanty (K_m) stanoveny v lidské jaterní mikrosomální frakci.

4.4.2 Stanovení enzymových aktivit a inhibičního vlivu silybinu (SAB) na různé isoformy CYP pomocí markerových substrátů

Inhibiční vliv silybinu byl testován v 6 koncentračních hladinách (10, 50, 100, 150, 200 a 400 $\mu\text{mol/l}$). Zásobní roztok silybinu byl připraven v 60% (v/v) DMSO. Z důvodu silného inhibičního vlivu DMSO na CYP2E1 a 2C19 byl pro stanovení aktivity těchto isoformem použit 17,3 mmol/l zásobní roztok silybinu v acetonitrilu. Experimentální podmínky pro stanovení enzymových aktivit a inhibičního vlivu silybinu na jednotlivé isoformy CYP jsou uvedeny v tabulkách 6, 7 a 8. V této studii byly užity koncentrace markerového substrátu, které se pohybovaly v blízkosti K_m stanovené v lidské jaterní mikrosomální frakci (viz tabulka 5).

Míra inhibice byla stanovena jako procentuální úbytek vzniklého produktu vzhledem ke kontrole, která neobsahovala silybin. V případě, že silybin signifikantně inhiboval některou z testovaných forem CYP, byla z výnosu Dixonova grafu s použitím tří koncentrací markerového substrátu ($0,5 K_m$, $1 K_m$ a $2 K_m$) stanovena hodnota K_i . Parametry enzymové kinetiky (K_m a V_{max}), IC_{50} a intercept pro určení hodnoty K_i byly získány užitím Sigma Plot 8.0.2 softwaru (SPSS, Chicago, IL).

CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6
Objem reakční směsi 100 μ l	Objem reakční směsi 100 μ l	Objem reakční směsi 100 μ l
100 mmol/l fosfátový pufr (pH 7,4)	100 mmol/l fosfátový pufr (pH 7,4)	100 mmol/l fosfátový pufr (pH 7,4)
Mikrosomální frakce 35 pmol cytochromu P450	Mikrosomální frakce 35 pmol cytochromu P450	Mikrosomální frakce 35 pmol cytochromu P450
Markerový substrát 2,5 μ mol/l 7-ethoxyresorufin	Markerový substrát 10 μ mol/l kumarin	Markerový substrát 15 μ mol/l EFC
Inhibitor - silybin (0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 μ mol/l)	Inhibitor - silybin (0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 μ mol/l)	Inhibitor - silybin (0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 μ mol/l)
PREINKUBACE 30 min při 37 °C	PREINKUBACE 30 min při 37 °C	PREINKUBACE 30 min při 37 °C
NADPH generující systém (NADP ⁺ 0,8 mmol/l; isocitrát 5,8 mmol/l, isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml, Mg ²⁺ 8 mmol/l)	NADPH generující systém (NADP ⁺ 0,8 mmol/l; isocitrát 5,8 mmol/l, isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml, Mg ²⁺ 8 mmol/l)	NADPH generující systém (NADP ⁺ 0,8 mmol/l; isocitrát 5,8 mmol/l, isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml, Mg ²⁺ 8 mmol/l)
INKUBACE 15 min při 37 °C	INKUBACE 15 min při 37 °C	INKUBACE 15 min při 37 °C
Zastavení reakce 200 μ l methanolu	Zastavení reakce 200 μ l methanolu	Zastavení reakce 200 μ l methanolu
Centrifugace při 14000 rpm, přepipetování do mikrotitrační destičky, fluorescenční detekce (Tecan Infinite M200) (Chang and Waxman, 1998)	Centrifugace při 14000 rpm, přepipetování do mikrotitrační destičky, fluorescenční detekce (Tecan Infinite M200) (Waxman and Chang, 1998).	Centrifugace při 14000 rpm, přepipetování do mikrotitrační destičky, fluorescenční detekce (Tecan Infinite M200) (Donato et al., 2004)

Tabulka 6: Stanovení enzymových aktivit a inhibičního vlivu silybinu na CYP1A2, 2A6 a 2B6 pomocí markerových substrátů.

CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19
Objem reakční směsi 50 μ l	Objem reakční směsi 200 μ l	Objem reakční směsi 200 μ l
100 mmol/l fosfátový pufr (pH 7,4)	100 mmol/l fosfátový pufr (pH 7,4)	100 mmol/l fosfátový pufr (pH 7,4)
Mikrosomální frakce 60 pmol cytochromu P450	Mikrosomální frakce 35 pmol cytochromu P450	Mikrosomální frakce 50 pmol cytochromu P450
Markerový substrát 150 μ mol/l luciferin-ME (Anonymous 1, 2010)	Inhibitor - silybin (0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 μ mol/l)	Inhibitor - silybin (0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 μ mol/l)
Inhibitor - silybin (0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 μ mol/l))	NADPH generující systém (NADP ⁺ 0,8 mmol/l; isocitrát 6 mmol/l, isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml, Mg ²⁺ 8 mmol/l)	NADPH generující systém (NADP ⁺ 0,8 mmol/l; isocitrát 5,8 mmol/l, isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml, Mg ²⁺ 8 mmol/l)
PREINKUBACE 10 min při 37 °C	PREINKUBACE 30 min při 37 °C	PREINKUBACE 30 min při 37 °C
NADPH generující systém (NADP ⁺ 0,8 mmol/l; isocitrát 6 mmol/l, isocitrátdehydrogenasa 0,3 U/ml, Mg ²⁺ 8 mmol/l)	Markerový substrát 16 μ mol/l diklofenak	Markerový substrát 80 μ mol/l (<i>S</i>)-mefenytol
INKUBACE 30 min při 37 °C	INKUBACE 25 min při 37 °C	INKUBACE 30 min při 37 °C
Zastavení reakce 50 μ l detekčního činidla inkubace 20 min při pokojové teplotě	Zastavení reakce 50 μ l směsi acetonitril (94%)/kyselina octová (6%), vloženo do ledu	Zastavení reakce 20 μ l 1mol/l HCl
Luminiscenční detekce (Tecan Infinite M200)	centrifugace 4 min při 4000 rpm, 150 μ l supernatantu přepipetováno do vialek, HPLC detekce (Crespi et al., 1998a)	vířivá extrakce do 2 ml dichlormethanu po dobu 15s, centrifugace 5 min při 3000 rpm; 1,5 ml spodní fáze extraktu odpareno dusíkem, odparek rozpuštěn ve 150 μ l mobilní fáze (100 mmol/l KH ₂ PO ₄ , pH 2 : acetonitril, 71:29), HPLC detekce (Anonymous 2, 2010)

Tabulka 7: Stanovení enzymových aktivit a inhibičního vlivu silybinu na CYP2C8, 2C9 a 2C19 pomocí markerových substrátů.

CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4
Objem reakční směsi 200 μ l	Objem reakční směsi 1000 μ l	Objem reakční směsi 500 μ l
100 mmol/l fosfátový pufr (pH 7,4)	100 mmol/l fosfátový pufr (pH 7,4)	50 mmol/l trizna base, KCl 150 mmol/l, pH 7,4
Mikrosomální frakce 70 pmol cytochromu P450	Mikrosomální frakce 160 pmol cytochromu P450	Mikrosomální frakce 70 pmol cytochromu P450
Markerový substrát 25 μ mol/l bufuralol	Inhibitor - silybin (0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 μ mol/l)	Inhibitor - silybin (0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 μ mol/l)
Inhibitor - silybin (0, 10, 50, 100, 150, 200, 400 μ mol/l)	NADPH generující systém (NADP ⁺ 0,5 mmol/l; isocitrát 4 mmol/l, isocitrátdehydrogenasa 0,2 U/ml, Mg ²⁺ 5 mmol/l)	NADPH generující systém (NADP ⁺ 0,5 mmol/l; isocitrát 4 mmol/l, isocitrátdehydrogenasa 0,2 U/ml, Mg ²⁺ 5 mmol/l)
PREINKUBACE 30 min při 37 °C	PREINKUBACE 30 min při 37 °C	PREINKUBACE 30 min při 37 °C
NADPH generující systém (NADP ⁺ 0,5 mmol/l; isocitrát 4 mmol/l, isocitrátdehydrogenasa 0,2 U/ml, Mg ²⁺ 5 mmol/l)	Markerový substrát 50 μ mol/l chlorzoxazon	Markerový substrát 100 μ mol/l testosteron
INKUBACE 20 min při 37 °C	INKUBACE 30 min při 37 °C	INKUBACE 30 min při 37 °C
Zastavení reakce 20 μ l 70% HClO ₄	Zastavení reakce 50 μ l 42,5% H ₃ PO ₄	Zastavení reakce 100 μ l směsi 1 mol/l Na ₂ CO ₃ a 2 mol/l NaCl
Centrifugace 5 min při 3000 rpm, 150 μ l supernatantu přepipetováno do vialek, HPLC detekce (Crespi et al., 1998b)	20s extrakce do 2 ml směsi propan-2-ol/chloroform (1,5/85), centrifugace 10 min při 2000 rpm; 1 ml spodní fáze extraktu odpařen dusíkem, odpárek rozpuštěn ve 200 μ l mobilní fáze (0,5% CH ₃ COOH:acetonitril, 3:1), HPLC detekce (Lucas et al., 1996)	extrakce do 2 ml dichlormethanu po dobu 15 s, centrifugace 5 min při 3000 rpm; 1 ml spodní fáze extraktu odpařen dusíkem, odpárek rozpuštěn ve 200 μ l mobilní fáze (64% methanol), HPLC detekce (Guengerich et al., 1986)

Tabulka 8: Stanovení enzymových aktivit a inhibičního vlivu silybinu na CYP2D6, 2E1 a 3A4 pomocí markerových substrátů.

4.4.3 Sledování metabolismu silybinu metodou HPLC

Reakční směs obsahující 250 pmol mikrosomálních CYP, NADPH-generující systém (0,5 mmol/l NADP^+ , 3,7 mmol/l isocitrát a 0,5 U/ml isocitrátdehydrogenasy), 50 mmol/l fosfátový pufr (pH 7,4) a silybin (SAB) dávající finální koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ ve výsledném objemu reakční směsi 250 μl byla inkubována v třepací vodní lázni po dobu 30 minut při 37 °C. Reakce byla zastavena přidavkem 1 ml ethylacetátu. Po vířivé extrakci do ethylacetátu a centrifugaci 10 min při 1800 rpm byla vrchní organická fáze odebrána do zkumavky a následně dosucha odpařena pod dusíkem. Odparek byl rozpuštěn ve 100 μl mobilní fáze (acetonitril: methanol: 0,1% kyselina mravenčí; 27:5:68) a analyzován modifikovanou již dříve publikovanou HPLC metodou (Gunaratna and Zhang, 2003). Chromatografická separace silybinu a jeho metabolitů byla provedena na koloně LiChrospher 100 RP-18 (250 mm \times 4,6 mm i.d.) s velikostí částic 5 μm . Byla provedena isokratická eluce s průtokem mobilní fáze (acetonitril: methanol: 0,1% kyselina mravenčí; 27:5:68) 1ml/1min; teplota kolony byla 40 °C. Separované látky byly detekovány spektrofotometricky na HPLC systému (Class-VP; Shimadzu, Kyoto, Japonsko) při 289 nm.

Výsledek byl porovnán s kontrolou, do jejíž reakční směsi byl NADPH-generující systém přidán až po zastavení reakce ethylacetátem.

4.4.4 Identifikace metabolitů silybinu vzniklých účinkem CYP přítomných v lidské jaterní mikrosomální frakci

Reakční směs o celkovém objemu 1 ml obsahující 250 pmol mikrosomálních CYP, NADPH-generující systém (0,5 mmol/l NADP^+ , 3,7 mmol/l isocitrát a 0,5 U/ml isocitrátdehydrogenasy), 50 mmol/l fosfátový pufr a silybin (SAB) dávající finální koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ v celkovém objemu reakční směsi byla inkubována v třepací vodní lázni po dobu 30 minut při 37 °C. Reakce byla zastavena přidavkem 2 ml ethylacetátu. Po vířivé extrakci do ethylacetátu a centrifugaci 10 min při 1800 rpm byla vrchní organická fáze odebrána do zkumavky a následně odpařena pod dusíkem. Vzorek byl rozpuštěn v 50 μl acetonitrilu a dále ve 200 μl mobilní fáze A (5,7 mmol/l kyselina octová + 5% acetonitril). $\mu\text{LC/MS}$ analýza byla provedena na Gemini C-18 mikrokoloně (150 mm \times 300 μm i.d.; Phenomenex, Torrance, CA) při průtoku mobilní fáze 6 $\mu\text{l/min}$.

Eluce probíhala za isokratických podmínek v objemovém poměru 65 % mobilní fáze A a 35 % mobilní fáze B (acetonitril). Separované látky byly detekovány pomocí Q-ToF Premier hmotnostního spektrofotometru (Waters, Milford, USA). Optimální podmínky elektrospreje byly: kapilární voltáž -2,8 kV, teplota zdroje 80 °C, desolvatační teplota 180 °C, průtok kónového plynu 50 litrů/hod, průtok desolvatačního plynu 400 litrů/hod. Fragmentace vybraných iontů probíhala při kolizní energii 5 – 30 eV.

4.4.5 Inhibice cytochromu P450 oxidem uhelnatým, nespecifickým inhibitorem CYP

Oxid uhelnatý inhibuje všechny formy cytochromu P450. Pokud je silybin metabolizován některým z cytochromů P450, musí být po inhibici všech forem CYP oxidem uhelnatým zamezeno vzniku jeho metabolitu.

Reakční směs obsahující 250 pmol mikrosomálních CYP, NADPH-generující systém (0,5 mmol/l NADP⁺, 3,7 mmol/l isocitrát a 0,5 U/ml isocitrátdehydrogenasy) a 50 mmol/l fosfátový pufr (pH 7,4) v celkovém objemu 1 ml byla preinkubována 10 min při teplotě 37 °C a následně byla 1 minutu probublána oxidem uhelnatým. Po přidání 5 mmol/l zásobního roztoku silybinu (SAB) v 60% DMSO (v/v) dávající finální koncentraci 100 μmol/l byla reakční směs utěsněna parafilmem a inkubována v třepací vodní lázni po dobu 30 minut při 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 2 ml ethylacetátu.

Po vířivé extrakci do ethylacetátu a centrifugaci 10 min při 1800 rpm byla vrchní organická fáze odebrána do zkumavky, následně odpařena pod dusíkem, rozpuštěna ve 100 μl mobilní fáze (acetonitril: methanol: 0,1% kyselina mravenčí; 27:5:68) a analyzována HPLC metodou. Podmínky analýzy viz kapitola 4.4.3.

Výsledek byl porovnán s kontrolou, jejíž reakční směs nebyla oxidem uhelnatým probublána.

4.4.6 Inhibice tvorby metabolitů silybinu specifickými inhibitory jednotlivých CYP

Účinek specifických inhibitorů jednotlivých forem cytochromů P450 na inhibici tvorby metabolitu silybinu byl testován v této studii. Pokud je silybin metabolizován

některým z testovaných CYP, musí být po specifické inhibici testované formy cytochromu P450 také inhibována tvorba metabolitu silybinu.

Reakční směs obsahující v 50 mmol/l fosfátovém pufru (pH 7,4) 250 pmol mikrosomálních CYP, NADPH-generující systém (0,5 mmol/l NADP⁺, 3,7 mmol/l isocitrát a 0,5 U/ml isocitrátdehydrogenasy) a příslušný inhibitor (viz tabulka 9) byla preinkubována po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Následně byl do každé reakční směsi přidán silybin (SAB) (konečná koncentrace 50 μmol/l). Tato reakční směs o celkovém objemu 1 ml byla inkubována 30 min při 37 °C. Reakce byly zastaveny ethylacetátem, po vířivé extrakci byly reakční směsi centrifugovány při 1800 rpm po dobu 10 minut. Následně odebrané vrchní organické fáze byly dosucha odpařeny pod dusíkem a rozpuštěny v mobilní fázi (acetonitril: methanol: 0,1% kyselina mravenčí; 27:5:68). Podmínky provedené HPLC analýzy jsou popsány v kapitole 4.4.3. Výsledky byly porovnány s kontrolou bez inhibitoru.

CYP	Inhibitor	Výsledná koncentrace inhibitoru v reakční směsi (μmol/l)
1A2	furafylin	22,5
2A6	8-methoxypsoralen	1
2B6	7-pentoxyresorufin	2
2C8	kvercetin	70
2C9	sulfafenazol	3
2C19	(S)-mefenytin	160
2D6	chinidin	0,3
2E1	diethyldithiokarbamát (DEDIC)	75
3A4	triacetyloleandomycin (TAO)	3

Tabulka 9: Specifické inhibitory jednotlivých forem CYP a jejich výsledná koncentrace v reakční směsi (Baldwin et al., 1995; Newton et al., 1995; Dierks et al., 2001; Goldstein et al., 1994).

4.4.7 Metabolismus silybinu pomocí vybraných CYP (baktosomů)

Baktosomy obsahující jednotlivé formy cytochromu P450 (CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2D6, 2E1 a 3A4) byly využity pro sledování metabolismu silybinu.

Reakční směs, obsahující ve 100 mmol/l Tris-HCl pufru (pH 7,4) 5 pmol jednotlivého enzymu (společně s P450 reduktasou), 5 mmol/l MgCl₂, NADPH-generující systém (0,5 mmol/l NADP⁺, 3,7 mmol/l isocitrát a 0,5 U/ml isocitrátdehydrogenasy) a 25 nebo 50 μmol/l silybin (SAB) ve výsledném objemu reakční směsi 250 μl, byla inkubována 30 minut při 37 °C. Poté byla reakce zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a vzorek byl dále extrahován, centrifugován, odpařen, rozpuštěn v mobilní fázi a analyzován (viz kapitola 4.4.3).

Výsledek byl porovnán s kontrolou, do jejíž reakční směsi byl NADPH-generující systém přidán až po zastavení reakce ethylacetátem.

4.5 Metabolismus silybinu UDP-glukuronosyltransferasami in vitro

4.5.1 Identifikace metabolitů silybinu vzniklých účinkem UGT přítomných v lidských hepatocytech

Do média kultury lidských hepatocytů byl přidán silybin, buď jako směs dvou diastereomerů (SAB) nebo jako jednotlivý diastereomer (SA nebo SB), ve finální koncentraci 100 μmol/l. Do kontroly byl místo silybinu přidán DMSO (finální koncentrace 0,1% (v/v)). Kultury byly uchovány v inkubátoru po dobu 16 hodin, při teplotě 37 °C a v 5% CO₂. Poté bylo 100 μl média deproteinováno 200 μl methanolu a vzorek byl centrifugován 5 min při 5000 rpm. 280 μl supernatantu bylo dosucha odpařeno pod dusíkem, rozpuštěno ve 150 μl mobilní fáze A (acetonitril: methanol: 0,1% kyselina mravenčí; 13,5:2,5:84) a vzorek byl analyzován metodami HPLC a LC/MS.

Podmínky HPLC analýzy

Glukuronidy silybinu byly separovány na koloně LiChrospher 100 RP-18 (250 mm × 4,6 mm i.d.) s velikostí částic 5 μm. Separované látky byly detekovány spektrofotometricky na HPLC systému (Class-VP; Shimadzu, Kyoto, Japonsko) při 289 nm. Pro separaci glukuronidů silybinu (7-*O*-β-D- a 20-*O*-β-D-) byly použity dvě gradientové metody.

Gradientová eluce 20-*O*-β-D-glukuronidů silybinu probíhala za následujících podmínek: doba analýzy 35 min, teplota kolony 40 °C, průtok mobilní fáze 1 ml/min – počáteční poměr mobilní fáze A (acetonitril: methanol: 0,1% kyselina mravenčí; 13,5:2,5:84) a mobilní fáze B (acetonitril: methanol: 0,1% kyselina mravenčí; 29:3:68) byl 100:0, ve 20. minutě bylo dosaženo poměru mobilní fáze A:B 0:100, po 30. minutě následovala doba reekvilibrace, kdy se gradient vracel na počáteční podmínky (100:0).

Pro separaci 7-*O*-β-D-glukuronidů silybinu byla použita modifikovaná již dříve publikovaná metoda (Han et al., 2004). Separace probíhala za následujících podmínek: doba analýzy 23 min, teplota kolony 25 °C, průtok mobilní fáze 0,9 ml/min – počáteční eluce byla uskutečněna mobilní fází A (methanol: voda: kyselina mravenčí; 42:58:0,125) po dobu 9 min, následně probíhala eluce mobilní fází B (methanol) do 16. min, a poté reekvilibrace kolony na počáteční podmínky.

Podmínky LC/MS analýzy

Glukuronidy silybinu byly současně detekovány pomocí hmotnostního spektrofotometru LCQ Fleet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) vybaveného ESI (ionizace elektrosprejem) sondou a iontovou pastí. Analyzovaný vzorek byl přímo nastříknut do hmotnostního detektoru. Optimální podmínky elektrospreje byly: kapilární voltáž -5,5 kV, teplota kapiláry 190 °C, průtok nosného plynu 30 a.u., množství dávkovaného vzorku 5 μl/min. Teoretické fragmentační mechanismy potenciálních metabolitů silybinu byly vytvořeny pomocí softwaru Mass Frontier 5.0 (HighChem; Bratislava, Slovenská republika).

4.5.2 Identifikace metabolitů silybinu vzniklých účinkem enzymů přítomných v lidské jaterní mikrosomální frakci

V této studii byly použity směsné lidské jaterní mikrosomy zakoupené od firmy Biopredic (Rennes, Francie). Před vlastním použitím byly mikrosomy aktivovány sonikací na ledu (5×5 s) a poté byly pipetovány do reakční směsi, která obsahovala 350 μg mikrosomálního proteinu, 5 mmol/l MgCl_2 , 10 mmol/l 1,4-lakton D-sacharové kyseliny (Gaiser et al., 2003) a 50 $\mu\text{mol/l}$ silybin (SA, SB nebo SAB). Po 5min preinkubaci při 37 °C byla do reakční směsi přidána trisodná sůl kyseliny uridin 5'-difosfoglukuronové (UDP-GA) o koncentraci 2,5 mmol/l v celkovém objemu reakční směsi (100 μl). Reakční směs byla inkubována 30 min při 37 °C na třepací vodní lázni. Reakce byla zastavena přidáním 200 μl vychlazeného methanolu. Následně byl vzorek centrifugován 5 min při 1800 rpm a 250 μl supernatantu bylo odpařeno pod dusíkem. Vzorek byl rozpuštěn ve 150 μl mobilní fáze A (acetonitril: methanol: 0,1% kyselina mravenčí; 13,5:2,5:84) a analyzován metodami HPLC a LC/MS (podmínky analýz viz kapitola 4.5.1).

Výsledek byl porovnán s kontrolou, do jejíž reakční směsi byla UDP-GA přidána až po zastavení reakce vychlazeným methanolem.

4.5.3 Stereoselektivní metabolismus testované látky pomocí lidských rekombinantních UGT

Reakční směs, jejíž objem byl 100 mmol/l fosfátovým puforem (pH 7,4) doplněn na 100 μl , obsahovala rekombinantní protein (1 mg/ml UGT2B7; 0,5 mg/ml UGT1A1, 1A3, 1A6, 1A10, 2B17; 0,25 mg/ml UGT1A4, 1A8, 2B4, 2B15; 0,1 mg/ml UGT1A7, 1A9), 5 mmol/l MgCl_2 , 10 mmol/l 1,4-lakton D-sacharové kyseliny a silybin (SA, SB nebo SAB) o výsledné koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$. Po 5min preinkubaci při 37 °C byla do reakce přidána UDP-GA. Reakce byla zastavena po 1 hod inkubace při 37°C přidáním 200 μl vychlazeného methanolu. Následně byl vzorek centrifugován 5 min při 5000 rpm a 250 μl supernatantu bylo dosucha odpařeno pod dusíkem. Vzorky byly rozpuštěny ve 150 μl mobilní fáze A (acetonitril: methanol: 0,1% kyselina mravenčí; 13,5:2,5:84) a analyzovány metodami HPLC a LC/MS (podmínky analýz viz kapitola 4.5.1).

Výsledky byly porovnány s kontrolami, do jejichž reakčních směsí byla UDP-GA přidána až po zastavení reakce vychlazeným methanolem.

4.6 Identifikace metabolitů vznikajících při biotransformaci silybinu v plazmě a moči dobrovolníků

Prováděná studie byla součástí studie, která byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Vzorky moči byly získány od 3 zdravých dobrovolníků (2 žen a 1 muže) ve věku 26 let.

Nejprve byl každému dobrovolníkovi odebrán vzorek kontrolní moči, který byl zamražen na $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby jeho zpracování. Poté byly dobrovolníkům podány dvě tablety silymarinu, z nichž každá obsahovala 190 mg extraktu z ostropestřce mariánského. Během následujících 24 hod byly u dobrovolníků sbírány každé 4 hod frakce moči, které byly až do doby analýzy zamrazeny na $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Úprava vzorků moči před HPLC a LC/MS analýzou

Před vlastní HPLC a LC/MS analýzou silybinu a jeho metabolitů (zejména II. fáze metabolismu cizorodých látek) přítomných ve vzorcích moči byly testované vzorky přečištěny a zakoncentrovány pomocí extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction-SPE). Pro SPE bylo použito vakuového extraktoru Visiprep SPE Vacuum Manifold (Supelco). K extrakci byly použity kolony SPE Oasis MCX (Mixed-Mode CationeXchange) pro objem 3 ml zakoupené od firmy Waters (Praha, CZ). Nejprve byly kolony kondicionovány methanolem ($2 \times 2,5\text{ ml } 100\%$ a následně $2 \times 2,5\text{ ml } 10\%$). Vzorky moči byly aplikovány na kondicionovanou kolonku v celkovém objemu 10 ml ($4 \times 2,5\text{ ml}$). Po promytí 5% hydroxidem amonným ($2 \times 2,5$) a následně 100% methanolem ($2 \times 2,5\text{ ml}$) byla uskutečněna eluce glukuronidů 1 ml 2% kyseliny mravenčí v methanolu. Sbírané frakce byly dosucha odpařeny pod dusíkem, a poté rozpuštěny ve 150 μl mobilní fáze A (acetonitril: methanol: 0,1% kyselina mravenčí; 13,5:2,5:84). Podmínky HPLC a LC/MS analýz jsou popsány v kapitole 4.5.1.

Během prováděné studie byly oběma dobrovolnicím odebrány dva vzorky krve. První vzorek (kontrolní) byl odebrán před podáním dvou tablet silymarinu do odběrových zkumavek s EDTA. Po centrifugaci 15 min při 1500 rpm byly vzorky kontrolní plazmy zamraženy na $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby dalšího zpracování. Další odběr následoval 2 hod po podání tablet silymarinu. Vzorky byly zpracovány a zamraženy stejným způsobem jako vzorky kontrolní.

Úprava vzorků plazmy před HPLC a LC/MS analýzou

1 ml krevní plazmy byl deproteinován 2 ml acetonitrilu a vzorek byl následně centrifugován po dobu 10 min při 12000 rpm. Supernatant byl dosucha odpařen pod dusíkem, poté byl vzorek rozpuštěn ve 150 μl mobilní fáze A (acetonitril: methanol: 0,1% kyselina mravenčí; 13,5:2,5:84) a analyzován metodami HPLC a LC/MS. Podmínky analýz viz kapitola 4.5.1.

5. VÝSLEDKY

5.1 Interakce silybinu s cytochromy P450 a sledování jeho metabolických přeměn *in vitro*

Cílem prováděných experimentů bylo stanovit, zda je flavonolignan silybin potenciálním inhibítoem některých z forem cytochromu P450. Následně bylo třeba při studiu jeho metabolických přeměn nejenom identifikovat vznikající metabolity, ale také potvrdit domněnku, že za tvorbu metabolitů silybinu je zodpovědná jedna z forem CYP, a nikoliv jiné enzymy přítomné v mikrosomální frakci.

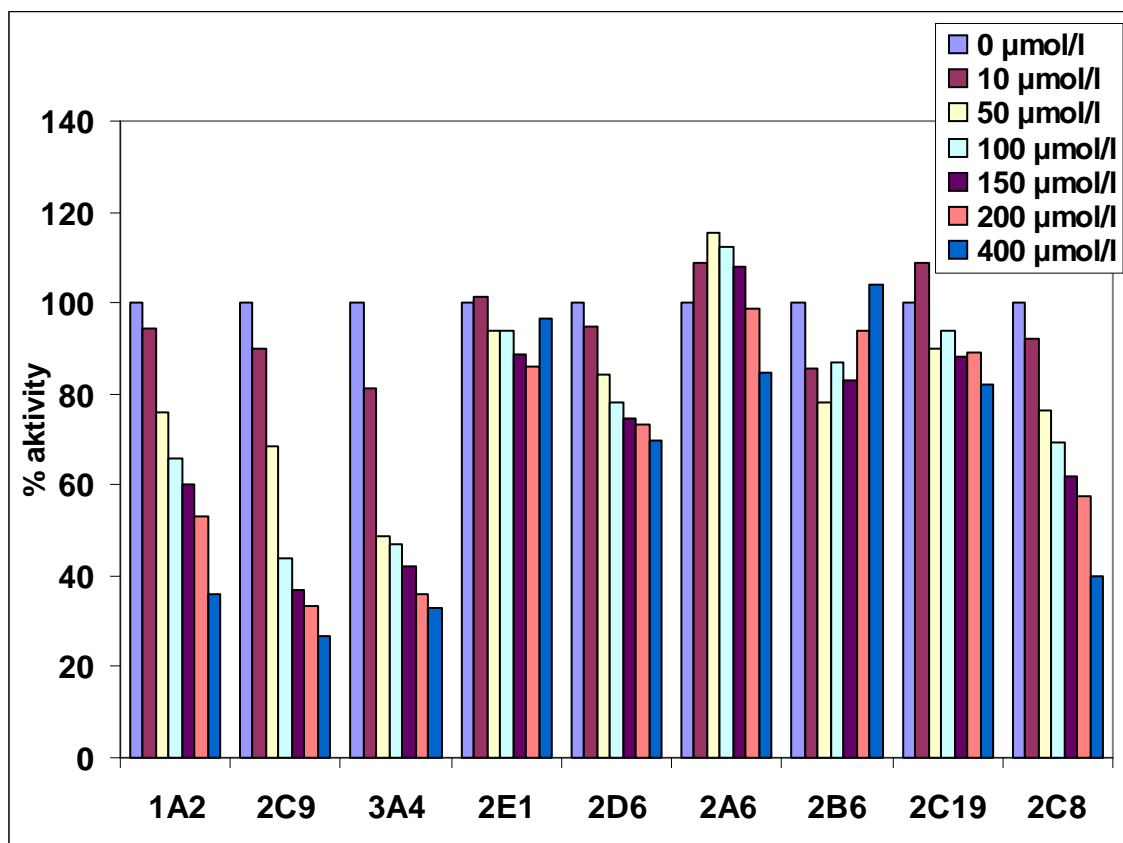
5.1.1 Stanovení inhibičního vlivu silybinu (SAB) na aktivitu cytochromů P450 přítomných v lidské jaterní mikrosomální frakci

Pro testování interakce silybinu s cytochromů P450, konkrétně směsi dvou diastereomerů A a B (SAB), bylo vybráno devět jaterních enzymů podílejících se nejčastěji na metabolismu léčiv. Jednalo se o CYP1A2, 2A4, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4. Po provedení experimentů se silybinem jako potencionálním inhibítoem byly měřeny aktivity testovaných forem CYP přítomných v lidské jaterní mikrosomální frakci a výsledek byl udán jako procento aktivity vzhledem k reakci, kde nebyl silybin přítomen. Výsledky závislosti aktivity jednotlivých enzymů na koncentraci silybinu (0, 10, 50, 100, 150, 200 a 400 $\mu\text{mol/l}$) v reakční směsi jsou shrnuty na obr. 4. Ze získaných dat vyplývá, že aktivity CYP2E1, 2A6, 2B6, 2C19 a 2D6 nejsou silybinem ovlivněny buďto vůbec, nebo je inhibiční vliv silybinu na tyto formy velmi slabý. Mírná inhibice silybinem byla pozorována u CYP1A2 a CYP2C8. Pro inhibici aktivity CYP1A2 (substrát ethoxyresorufin) silybinem byla zjištěna hodnota IC_{50} za daných podmínek 220 $\mu\text{mol/l}$, pro CYP2C8 (substrát luciferin-methylether) byla $IC_{50} \geq 250 \mu\text{mol/l}$. Nejvýraznější inhibiční efekt silybinu se projevil na aktivitách CYP3A4 a CYP2C9. Z výnosu Dixonova grafu s použitím tří koncentrací markerového substrátu (pro CYP3A4 testosteron o koncentraci 38,8; 77,5 a 155 $\mu\text{mol/l}$, pro CYP2C9 diklofenak o koncentraci 8; 15,9 a 31,8 $\mu\text{mol/l}$) byla stanovena hodnota K_i (viz tabulka 10). Výpočet hodnot jednotlivých parametrů enzymové kinetiky (K_m a V_{max}), hodnoty IC_{50} a průsečíku s osou x (pro určení hodnoty K_i) byly získány užitím software Sigma Plot 8.0.2 (SPSS, Chicago, IL).

Vyhodnocením získaných dat bylo zjištěno, že inhibice aktivity CYP2C9 silybinem probíhá nekompetitivním mechanismem, v případě CYP3A4 se jednalo o inhibici kompetitivní.

CYP	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)	K _i ($\mu\text{mol/l}$)
2C9	34,1 \pm 11	75 \pm 12
3A4	49,8 \pm 14	21 \pm 6

Tabulka 10: Inhibice CYP silybinem vyjádřená jako IC₅₀ a K_i \pm S.E.M.



Obr. 4: Účinek silybinu na specifickou aktivitu CYP.

Výsledné koncentrace silybinu v reakční směsi byly: 0, 10, 50, 100, 150, 200 a 400 $\mu\text{mol/l}$.

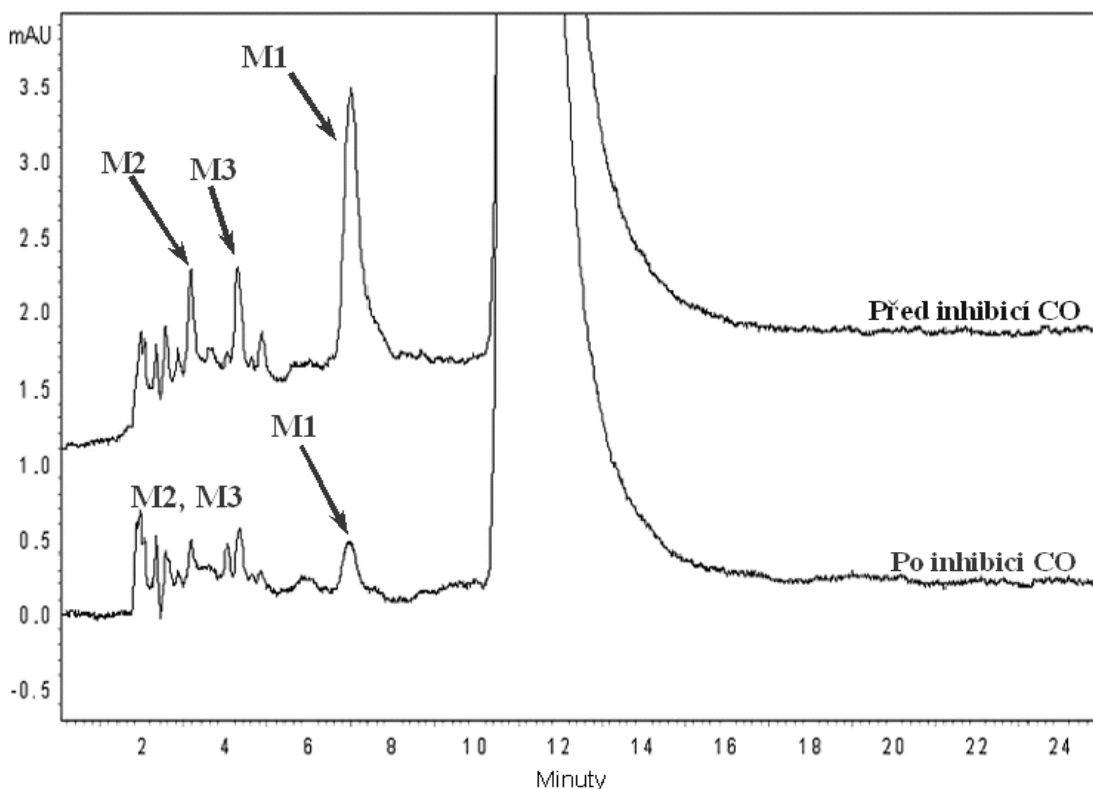
Experimenty byly provedeny duplicitně, uvedené výsledky jsou vyjádřeny jako průměr; naměřená data se nelišila o více jak 5 %.

5.1.2 Vznik metabolitů silybinu

Cílem dalšího experimentu bylo stanovit, zda je flavonolignan silybin (SAB) metabolizován enzymy přítomnými v jaterní mikrosomální frakci. Pro zjištění, zda dochází ke vzniku metabolitů, byla provedena inkubace silybinu s lidskou jaterní mikrosomální frakcí a reakční směs (kontrolní i testované vzorky) pak byla analyzována metodou HPLC. Analýza potvrdila, že silybin je za daných podmínek metabolizován, protože při vlnové délce 289 nm byly detekovány tři píky metabolitů (M1, M2, M3) (viz obr. 5, záznam před inhibicí oxidem uhelnatým). Metabolit M1 s retenčním časem 7 minut byl považován za hlavní produkt metabolismu silybinu.

5.1.3 Inhibice cytochromu P450 oxidem uhelnatým, nespecifickým inhibitorem CYP

K potvrzení domněnky, že za tvorbu metabolitů silybinu je odpovědná jedna z forem cytochromu P450, a nikoliv jiné enzymy přítomné v mikrosomální frakci, byla provedena inhibice CYP oxidem uhelnatým, nespecifickým inhibitorem těchto enzymů. Pro získání kvalitních výsledků bylo nutné v reakčním roztoku nahradit kyslík oxidem uhelnatým. I když se přes veškerou snahu při experimentu nepodařilo odstranit veškerý kyslík z reakční směsi, chromatografická analýza potvrzuje, že skutečně došlo k nespecifické inhibici cytochromů P450. Inhibicí CYP přítomných v lidské jaterní mikrosomální frakci oxidem uhelnatým bylo zamezeno vzniku metabolitů silybinu (viz obr. 5).



Obr. 5: Záznam z HPLC analýzy metabolitů silybinu před a po inhibici oxidem uhelnatým.

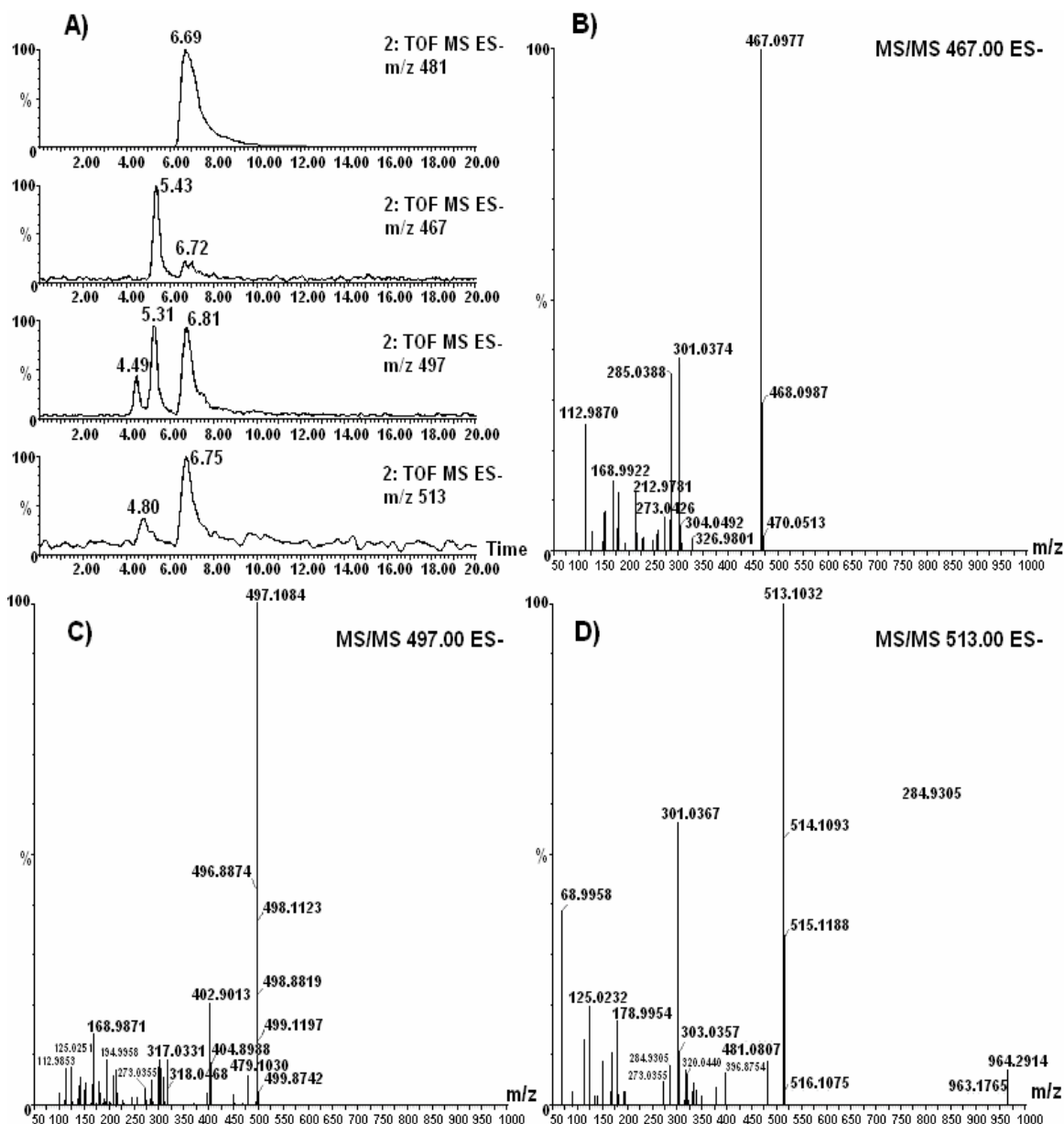
Po inkubaci silybinu s lidskými mikrosomy byly při vlnové délce 289 nm detekovány tři píky metabolitů (M1, M2, M3) s retenčními časy 7; 3,2 a 4,2 minuta. Při inhibici oxidem uhelnatým vzniklo viditelně méně metabolitů silybinu.

5.1.4 Identifikace metabolitů silybinu vzniklých účinkem CYP přítomných v lidské jaterní mikrosomální frakci

Poté, co bylo s využitím HPLC s UV detekcí zjištěno, že silybin je metabolizován cytochromy P450 přítomnými v mikrosomální frakci jater, bylo potřeba identifikovat neznámé metabolity. Po inkubaci silybinu s lidskou jaterní mikrosomální frakcí byl vzorek analyzován metodou μ LC/MS.

Jako hlavní metabolit byl identifikován *O*-demetylovaný silybin (m/z 467; viz obr. 6B). μ LC/MS analýzou byly rovněž identifikovány další dva minoritní metabolity (viz obr. 6C a 6D), mono- (m/z 497) a dihydroxyderivát silybinu (m/z 513). Je patrné, že monohydroxylace silybinu nastává na dvou různých místech jeho molekuly; retenční časy

(R_t) dvou píků monohydroxyderivátů jsou 4,49 a 5,31 minut (viz obr. 6A). Identita metabolitů byla ověřena na základě MS/MS spekter.



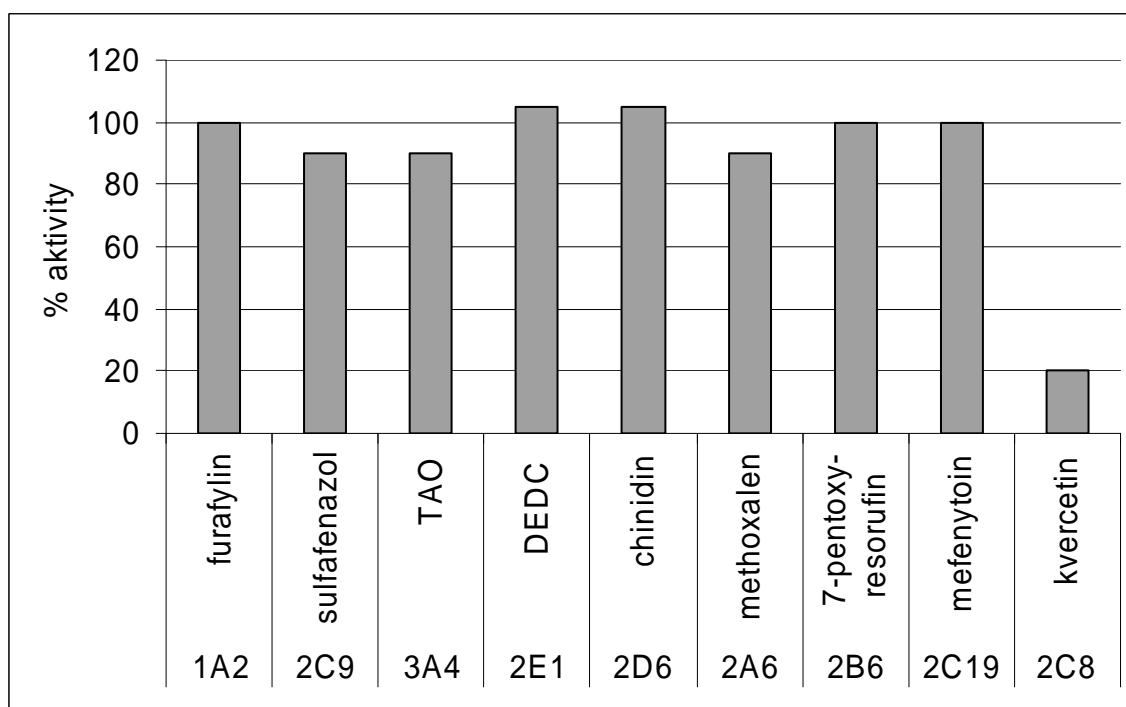
Obr. 6: Metabolity silybinu identifikované μ LC/MS analýzou.

- A) μ LC/MS analýza (R_t silybin 6,7 – 6,8 min, *O*-demethylovaný silybin 5,43 min, monohydroxyderiváty silybinu 4,49 a 5,31 min, dihydroxyderivát silybinu 4,8 min)
- B) *O*-demethylovaný silybin (m/z 467)
- C) monohydroxyderivát silybinu (m/z 497)
- D) dihydroxyderivát silybinu (m/z 513)

5.1.5 Inhibice tvorby *O*-demetylovaného silybinu specifickými inhibitory jednotlivých CYP

V dalším kroku při studiu metabolických přeměn silybinu bylo třeba zjistit, jaká konkrétní forma cytochromu P450 je odpovědná za vznik nejvýznamnějšího metabolitu, *O*-demetylovaného silybinu. Za tímto účelem byly provedeny inhibice jednotlivých CYP specifickými inhibitory a současně byl sledován úbytek tvorby hlavního metabolitu.

Množství vzniklého *O*-demetylovaného silybinu po specifické inhibici testované isoformy cytochromu P450 (CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4) přítomné v lidské jaterní mikrosomální frakci bylo stanoveno jako procento aktivity vzhledem k neinhibované reakci. Výsledky inhibice tvorby *O*-demetylovaného produktu po specifické inhibici jednotlivých isoform CYP jsou sumarizovány na obr. 7. Z výsledků vyplývá, že inhibitor kvercetin, relativně specifický inhibitor CYP2C8 (Walsky et al., 2005), inhiboval tvorbu *O*-demetylovaného silybinu z 80 %. Mírné snížení tvorby hlavního metabolitu (kolem 15 %) se projevilo také při inhibici CYP2C9 sulfafenazolem, CYP3A4 triacetyloleandomycinem (TAO) a CYP2A6 methoxalenem.



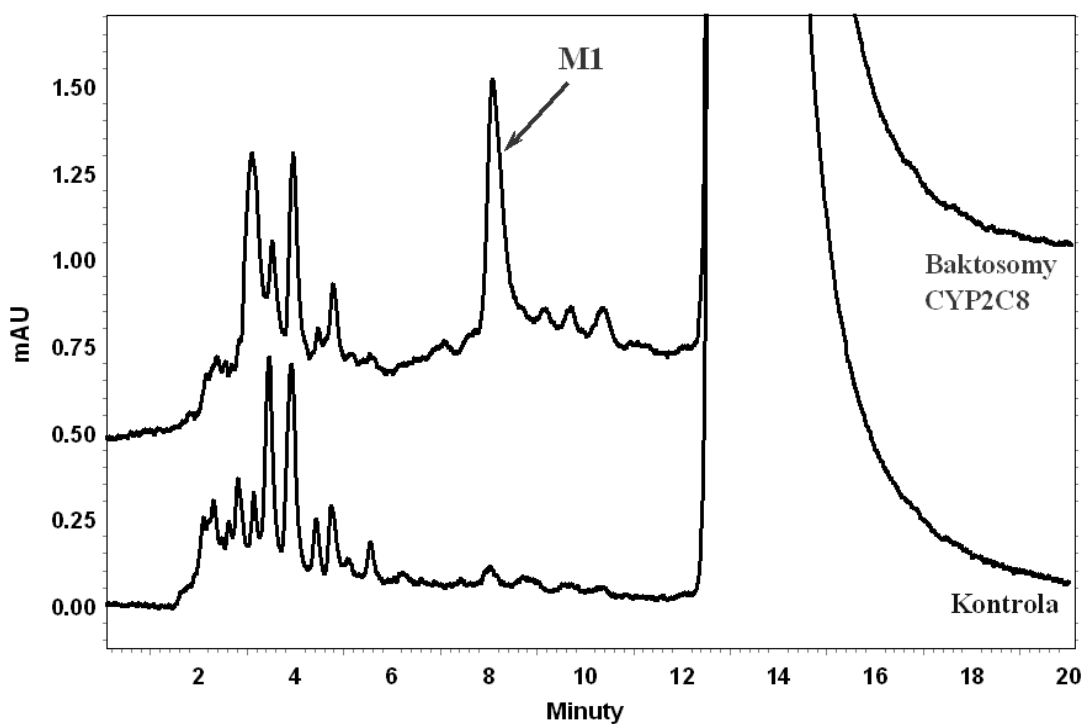
Obr. 7: Účinek selektivních inhibitorů CYP přítomných v lidské jaterní mikrosomální frakci na tvorbu *O*-demetylovaného silybinu.

Experimenty byly provedeny duplicitně, uvedené výsledky jsou vyjádřeny jako průměr; naměřená data se nelišila o více jak 5 %.

5.1.6 *O*-demethylace silybinu za účasti rekombinantních cytochromů P450

Inhibiční experimenty prokázaly zapojení cytochromů P450, zejména CYP2C8, do oxidační přeměny silybinu. Pro potvrzení tohoto výsledku byl proveden další experiment, v němž byl metabolismus silybinu sledován za použití tzv. baktosomů, bakteriální membránové frakce z *Escherichia coli* obsahující vždy jednu formu rekombinantního lidského cytochromu P450 (CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2D6, 2E1 a 3A4), koexprimovanou s lidskou NADPH-cytochrom P450 reduktasou.

Získané výsledky dokumentují, že CYP2C8 (viz obr. 8) hraje významnou roli ve tvorbě *O*-demethylovaného produktu, hlavního metabolitu silybinu.



Obr. 8: HPLC analýza silybinu metabolizovaného rekombinantními CYP2C8 (baktosomy).

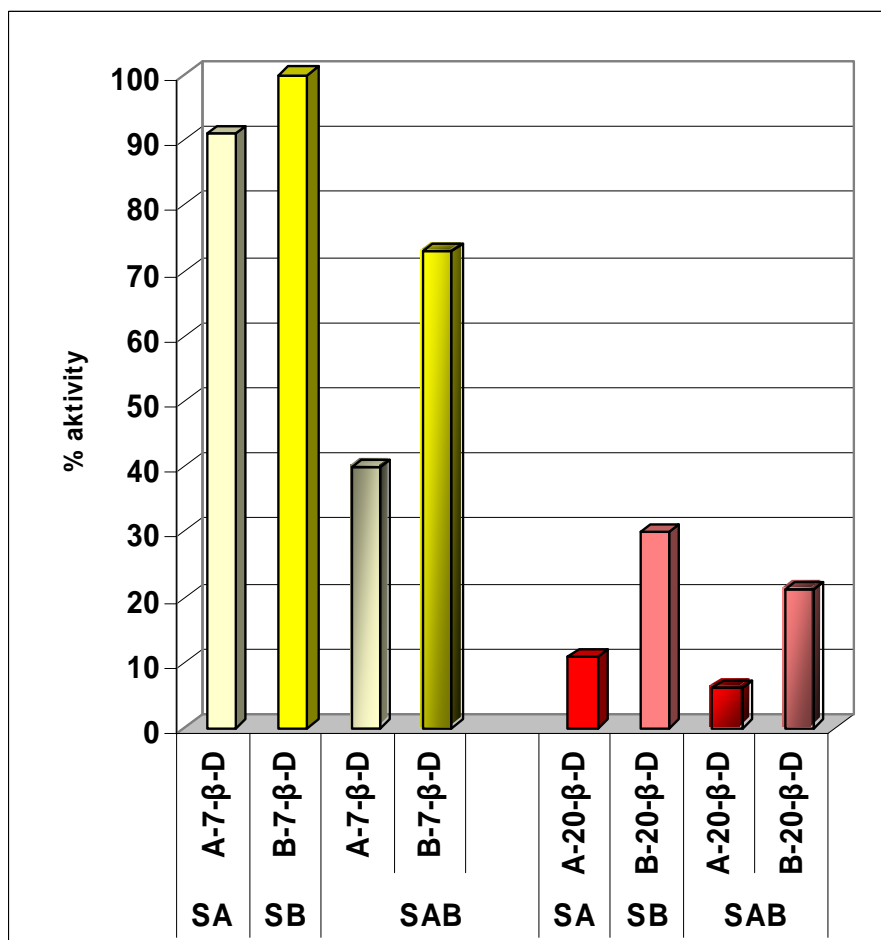
5.2 Konjugační reakce silybinu za účasti UDP-glukuronosyltransferas *in vitro*

Nejvýznamnějšími konjugačními reakcemi polyfenolových sloučenin v lidském organismu jsou reakce s kyselinou glukuronovou katalyzované UDP-glukuronosyltransferasami. Z tohoto důvodu jsme se detailně věnovali identifikaci všech glukuronidů vzniklých z obou diastereomerů silybinu a současně jsme se pokusili přispět k charakterizaci enzymů, které ke vzniku těchto glukuronidů přispívají.

5.2.1 Identifikace metabolitů silybinu vzniklých účinkem enzymů přítomných v lidské jaterní mikrosomální frakci

Mikrosomy, membránové váčky vzniklé po rozbití endoplasmatického retikula, obsahují ve své membráně nejen enzymy první fáze metabolismu xenobiotik (cytochromy P450, flavinové monooxygenasy, prostaglandin H syntasu), ale také UDP-glukuronosyltransferasy, enzymy II. fáze biotransformace. Pro studium glukuronidace byl silybin (čisté diastereomery A a B (SA a SB) a směs obou diastereomerů (SAB)) inkubován s lidskou jaterní mikrosomální frakcí.

HPLC analýzou s UV detekcí bylo zjištěno, že působením UGT přítomných v jaterní mikrosomální frakci vznikly čtyři metabolity silybinu: silybin A-7-O- β -D-glukuronid, silybin B-7-O- β -D-glukuronid, silybin A-20-O- β -D-glukuronid a silybin B-20-O- β -D-glukuronid. Pro separaci všech diastereomerů musely být použity dvě různé HPLC metody s rozdílnými elučními podmínkami. Relativní proporce v množství vzniklých glukuronidů jsou shrnuty na obr. 9. Následně provedená LC/MS analýza reakční směsi potvrdila dominantní tvorbu monoglukuronidů.

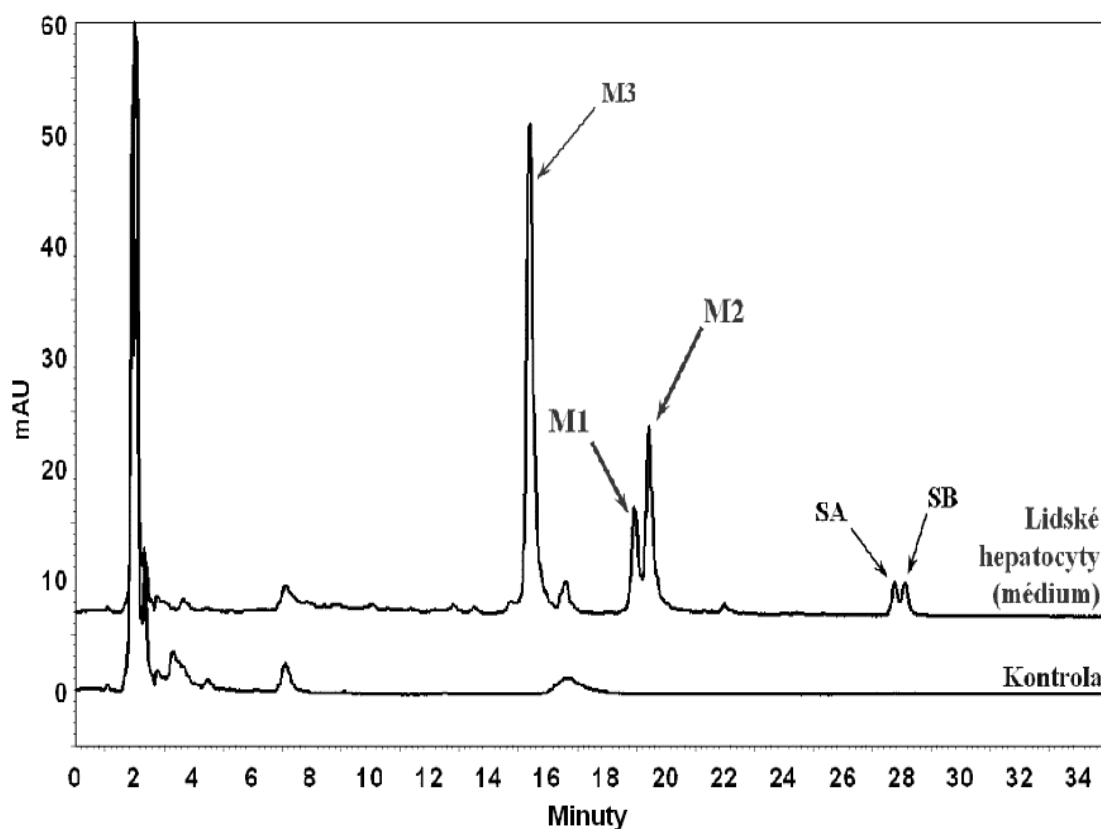


Obr. 9: Relativní proporce 7- a 20-*O*-β-D-glukuronidů silybinu tvořených účinkem UGT přítomných v lidské jaterní mikrosomální frakci.

5.2.2 Identifikace metabolitů silybinu vzniklých účinkem UGT přítomných v lidských hepatocytech

Pro celkové posouzení vzniku glukuronidovaných metabolitů silybinu byly použity, jako zdroj příslušných enzymů, lidské hepatocyty. Po inkubaci primární kultury lidských hepatocytů se silybinem (SA, SB a SAB) po dobu 16 hodin bylo kultivační médium analyzováno stejnými analytickými přístupy jako v případě studia metabolických přeměn silybinu v jaterní mikrosomální frakci. HPLC analýzou byly identifikovány čtyři metabolity vzniklé působením UGT přítomných v hepatocytech. Jednalo se, stejně jako u lidských jaterních mikrosomů, o následující monoglukuronidy silybinu: silybin A-7-*O*-β-D-glukuronid, silybin B-7-*O*-β-D-glukuronid, silybin A-20-*O*-β-D-

glukuronid a silybin B-20-*O*- β -D-glukuronid. Záznam z HPLC analýzy extraktu kultivačního média dokumentující separaci příslušných diastereomerů vzniklých glukuronidací v poloze 20 (20-*O*- β -D-glukuronidy silybinu) je na obr. 10. Podobný chromatogram byl získán při separaci 7-*O*- β -D-glukuronidů silybinu, ovšem za jiných elučních podmínek.

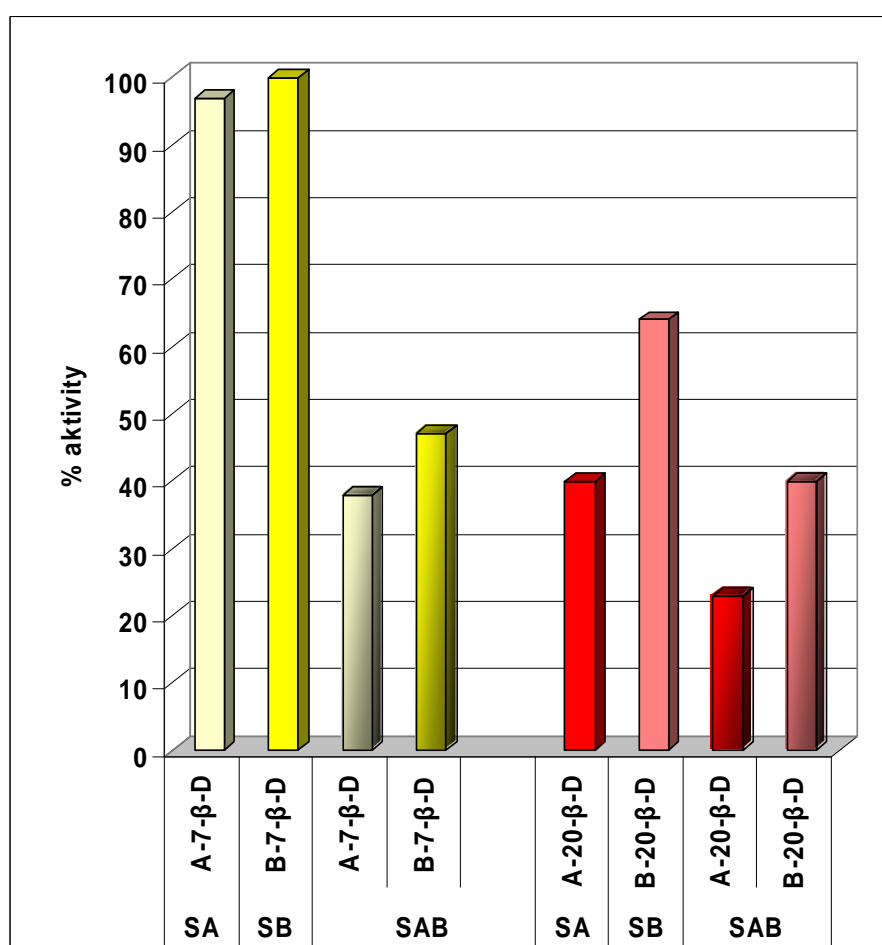


Obr. 10: HPLC analýza po inkubaci primární kultury lidských hepatocytů se silybinem (SAB).

Chromatogram znázorňuje separaci 20-*O*- β -D-glukuronidů silybinu. Oproti kontrole lze pozorovat píky silybin A-20-*O*- β -D-glukuronidu (M1) a silybin B-20-*O*- β -D-glukuronidu (M2) v retenčních časech 18,9 a 19,4 minut. SA a SB jsou diastereomery silybinu.

7-*O*- β -D-glukuronidy silybinu nejsou při této gradientové eluci separovány (M3). Do kontrolního média byl místo silybinu přidán DMSO.

Míra stereospecifity zúčastněných enzymů je dokumentována na obr. 11, kde jsou sumarizovány relativní proporce glukuronidů vytvořených za účasti UGT přítomných v primární kultuře lidských hepatocytů. Pokud byly s hepatocyty inkubovány čisté diastereomery A a B, k žádným významným rozdílům v poměru tvorby silybin A-7- a silybin B-7-*O*- β -D-glukuronidu nedošlo. V případě tvorby 20-*O*- β -D-glukuronidů je zřejmé, že silybin B je více preferovaným diastereomerem. Obdobné výsledky byly získány i v případě, kdy byl s lidskými hepatocyty inkubován silybin (SAB) jako směs dvou diastereomerů v přibližném poměru 1:1.



Obr. 11: Relativní proporce 7- a 20-*O*- β -D-glukuronidů silybinu tvořených účinkem UGT přítomných v primární kultuře lidských hepatocytů.

Využitím dalšího analytického přístupu, hmotnostní detekce, se nám podařilo i zde potvrdit dominantní úlohu UGT v metabolických přeměnách studované látky. Monoglukuronidy silybinu byly pomocí LC/MS analýzy identifikovány jako hlavní metabolity II. fáze biotransformace silybinu. *O*-demetylovaný silybin glukuronid a silybin monosulfát byly nalezeny jako minoritní metabolity.

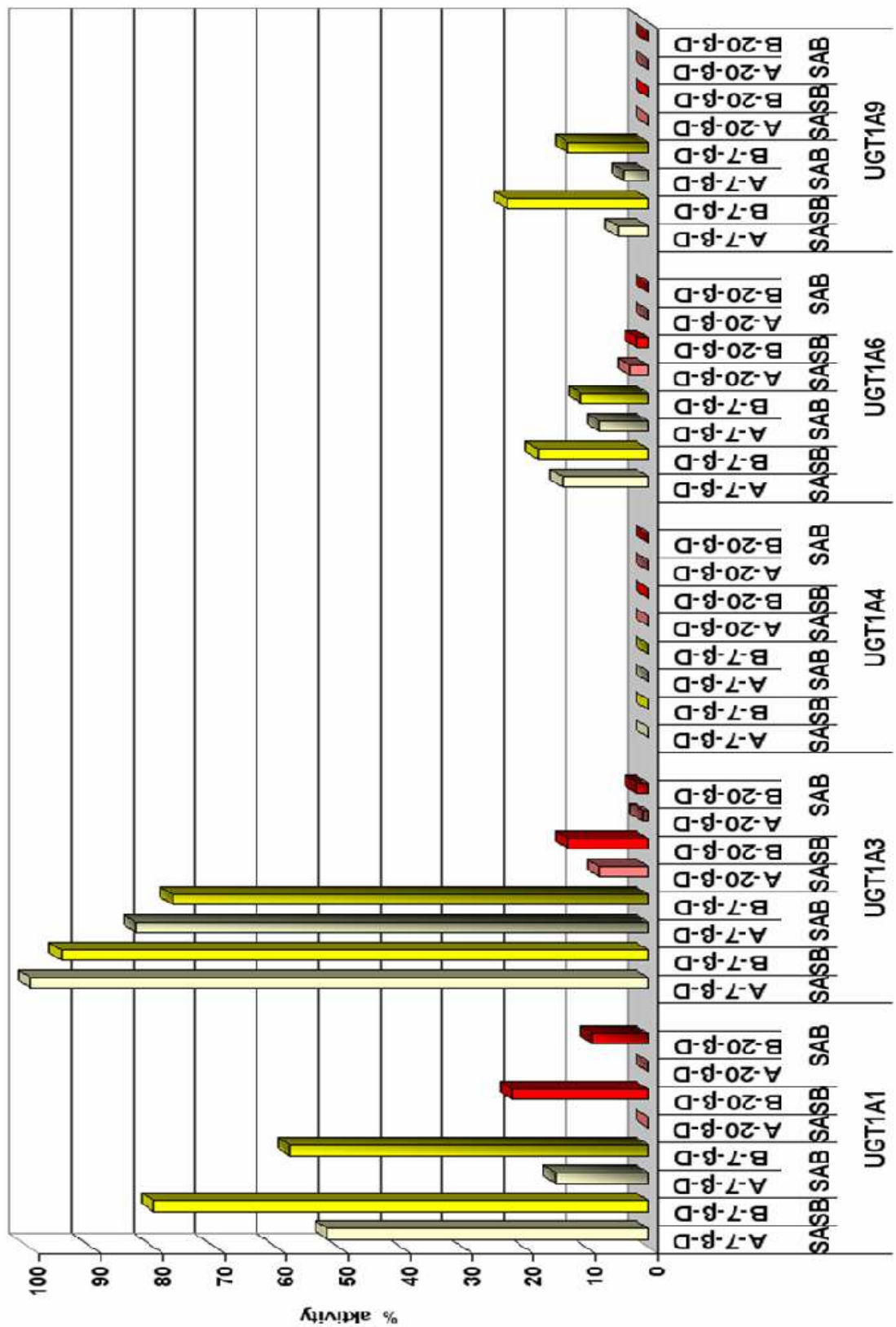
5.2.3 Stereoselektivní metabolismus silybinu pomocí lidských rekombinantních UGT

K identifikaci enzymů zodpovědných za vznik jednotlivých metabolitů byly použity lidské rekombinantní formy UGT (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7, 2B15 a 2B17). V prováděných experimentech byly sledovány jak interakce čistých diastereomerů silybinu (SA a SB), tak interakce silybinu v podobě směsi dvou diastereomerů (SAB) s příslušnými enzymy. Získané výsledky ukázaly, že z dvanácti testovaných forem UGT devět katalyzovalo glukuronidaci silybinu. Rekombinantní UGT1A1, 1A3, 1A8, 1A10, ale také UGT1A6, 1A7, 1A9, 2B7 a 2B15 stereoselektivně tvořily 7- a 20-*O*- β -D-glukuronidy silybinu. Z naměřených dat zároveň vyplynulo, že UGT přednostně reagují s jedním ze dvou diastereomerů silybinu.

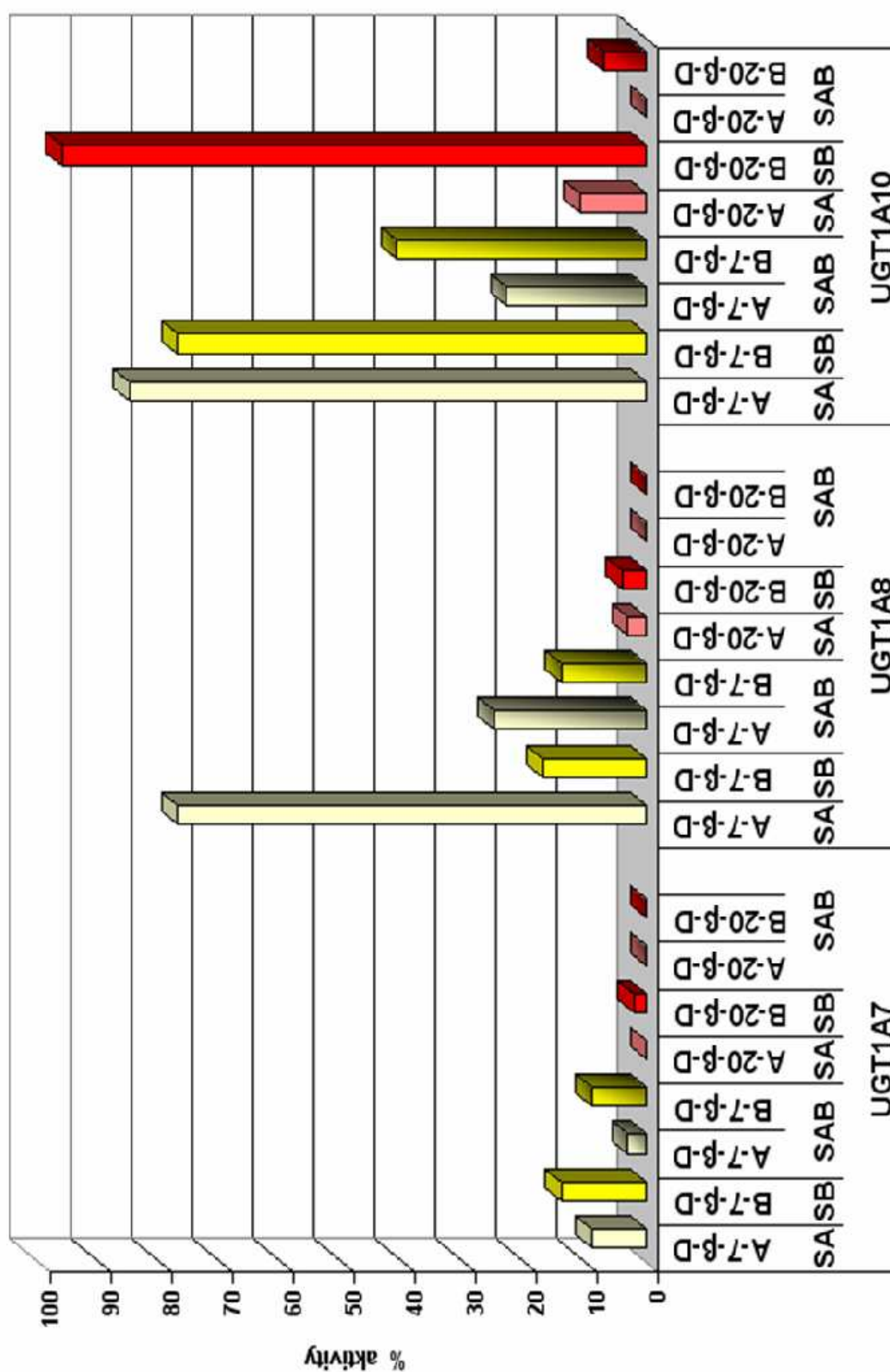
Provedené experimenty prokázaly, že enzymy z rodiny UGT1, které jsou exprimované zejména v játrech (UGT1A1, 1A3, 1A6 a 1A9), reagovaly s SA, SB i SAB za vzniku silybin A-7-*O*- β -D-glukuronidu a silybin B-7-*O*- β -D-glukuronidu. Silybin A-20-*O*- β -D-glukuronid byl nalezen pouze v reakční směsi obsahující čistý SA a enzymy UGT1A3 nebo UGT1A6. Silybin B-20-*O*- β -D-glukuronid byl identifikován v reakčních směsích, ve kterých byl inkubován čistý SB s UGT1A1, 1A3 a 1A6. Ze směsi obou diastereomerů silybinu SAB pouze v přítomnosti UGT1A1 a UGT1A3 vznikl silybin B-20-*O*- β -D-glukuronid. Z výsledků dále vyplynulo, že UGT1A9 netvoří metabolity silybinu glukuronidované v poloze 20 a rekombinantní UGT1A4 se na glukuronidaci silybinu vůbec nepodílí (viz obr. 12).

Střevní UDP-glukuronosyltransferasy (UGT1A7, 1A8, 1A10) reagovaly se silybinem za vzniku silybin A-7-*O*- β -D-glukuronidu, silybin B-7-*O*- β -D-glukuronidu a silybin B-20-*O*- β -D-glukuronidu. Silybin A-20-*O*- β -D-glukuronid byl nalezen v reakčních směsích, kde byl inkubován čistý SA s UGT1A8 a UGT1A10 (viz obr. 13).

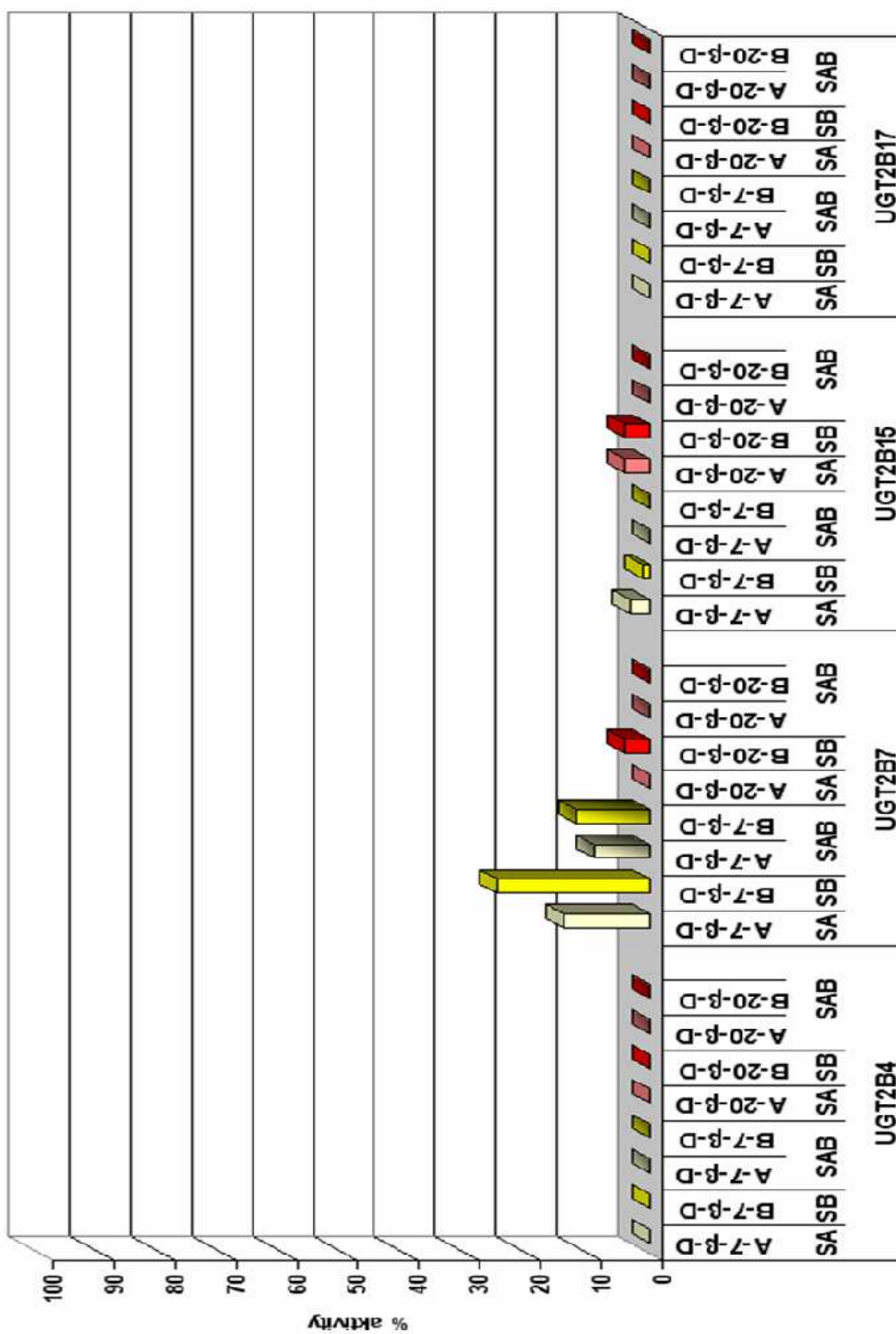
Další výsledky ukázaly, že enzymy z podrodiny UGT2B se na metabolismu silybinu podílejí podstatně méně než členové rodiny UGT1. Data získaná s rekombinantním enzymem UGT2B7 sice ukazují, že tato forma je zodpovědná za tvorbu silybin A-7-*O*- β -D-glukuronidu, silybin B-7-*O*- β -D-glukuronidu a silybin B-20-*O*- β -D-glukuronidu, nicméně tyto sloučeniny byly identifikovány v relativně malém množství. Ještě nižší katalytickou aktivitu vzhledem k silybinu vykazala forma UGT2B15 a dále bylo zjištěno, že rekombinantní UGT2B4 a UGT2B17 se na metabolismu silybinu nepodílí vůbec (viz obr. 14).



Obr. 12: Profil identifikovaných glukuronidů silybinu tvořených jaterními enzymy UGT1 rodiny.



Obr. 13: Profil identifikovaných glukuronidů silybinu tvořených střevními enzymy UGT1 rodiny.



Obr. 14: Profil identifikovaných glukuronidů silybinu tvořených UGT2B enzymy.

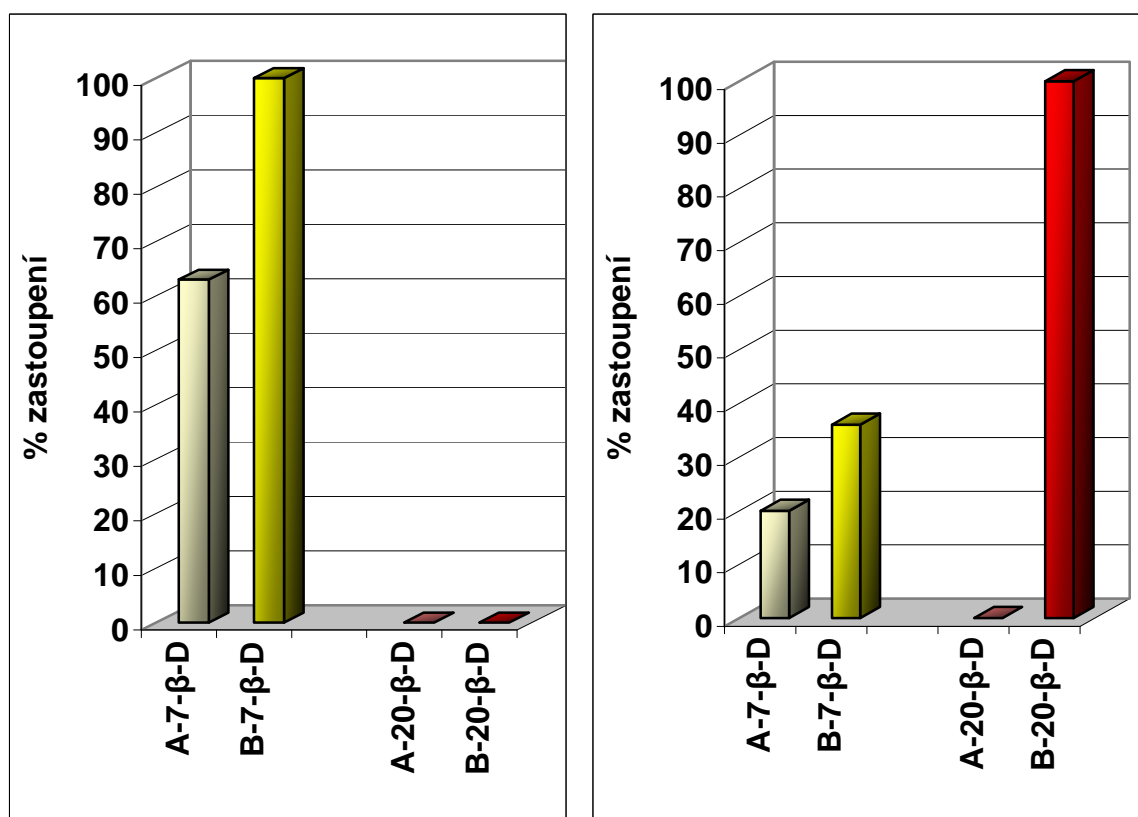
5.3 Identifikace metabolitů vznikajících při biotransformaci silybinu v plazmě a moči dobrovolníků

Po ukončení experimentů *in vitro* byly změřeny hladiny silybinu a jeho metabolitů v lidské plazmě a moči. Třem dobrovolníkům byly podány dvě tablety silymarinu, z nichž každá obsahovala 190 mg extraktu z ostropestřce mariánského, a po skončení experimentu byly vzorky plazmy a moči podrobeny HPLC a LC/MS analýze.

V moči dobrovolníků byly HPLC analýzou s UV detekcí identifikovány dva metabolity: silybin A-7-*O*-β-D-glukuronid a silybin B-7-*O*-β-D-glukuronid. 20-*O*-β-D-glukuronidy silybinu nebyly v moči dobrovolníků nalezeny (viz obr. 15A). LC/MS analýza potvrdila, že glukuronidace silybinu je v podmínkách *in vivo* hlavní cestou biotransformace. Monoglukuronidy silybinu byly identifikovány jako hlavní metabolity. *O*-demetylovaný silybin glukuronid byl nalezen v moči dobrovolníků jako minoritní produkt.

Na rozdíl od lidské moči, kde byly nalezeny jen 7-*O*-β-D-glukuronidy silybinu, byl ve vzorcích lidské plazmy identifikován především silybin B-20-*O*-β-D-glukuronid (viz obr. 15B). Silybin se ve vzorcích plazmy nacházel hlavně ve formě konjugátů, ve volné formě byl nalezen pouze silybin A, a to ve velmi nízké koncentraci. LC/MS analýza opět potvrdila monoglukuronidy jako hlavní metabolity biotransformace silybinu. Minoritní metabolit *O*-demetylovaný silybin glukuronid byl rovněž jak v moči dobrovolníků (viz obr. 16) identifikován také v plazmě.

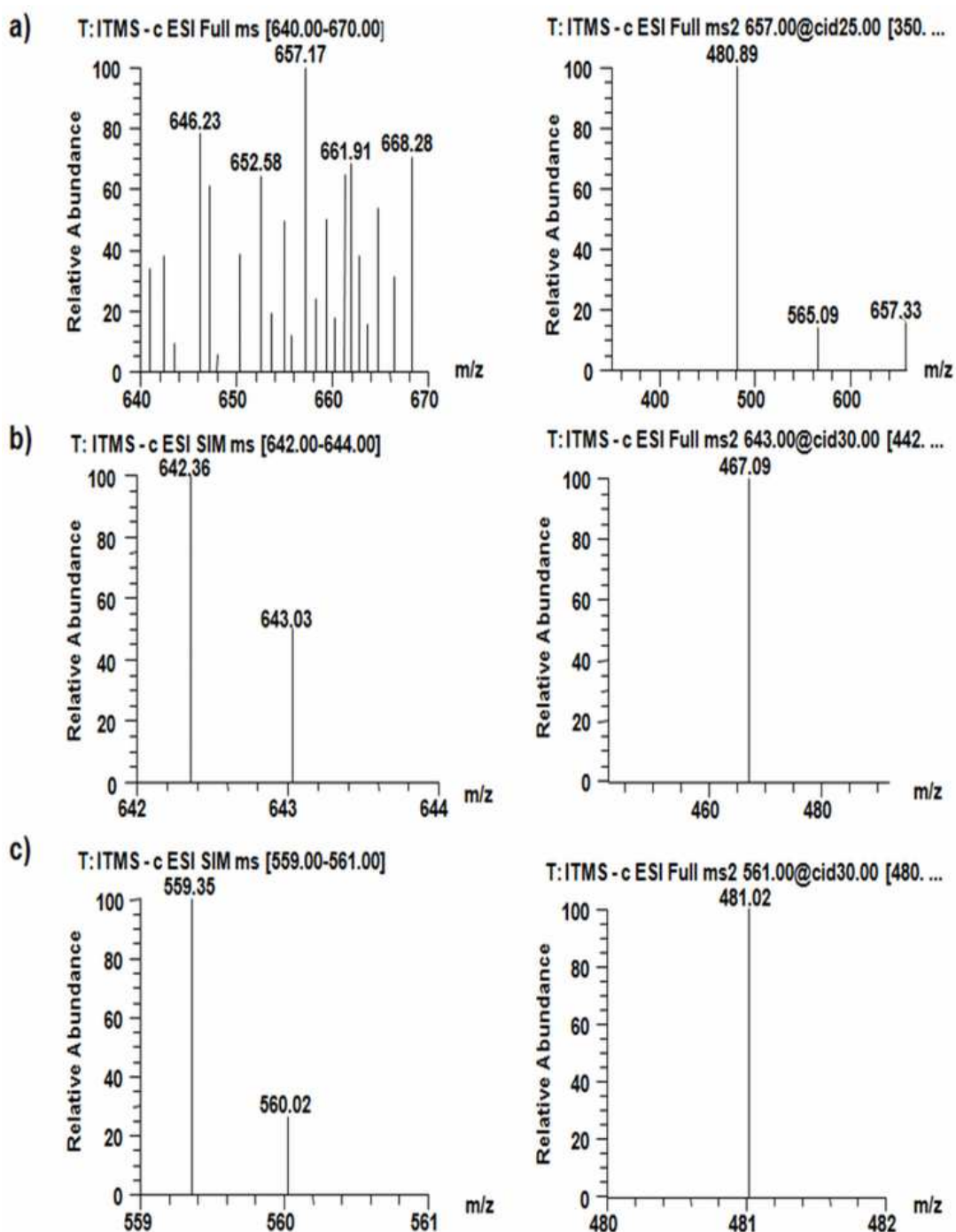
Protože nebyl dobrovolníkům podán čistý silybin, ale extrakt z ostropestřce mariánského, který kromě silybinu obsahuje i další flavonolignany a flavonoidy, byly ve vzorcích identifikovány také metabolity těchto sloučenin. HPLC analýzou byl v plazmě i v moči dobrovolníků nalezen např. monoglukuronid isosilybinu. Mezi minoritními metabolity byl LC/MS analýzou identifikován monosulfát flavonolignanů, který se nám nepodařilo blíže specifikovat z důvodu stejných molekulových hmotností přítomných flavonolignanů.



(A)

(B)

Obr. 15: Proporce 7- a 20-*O*-β-D-glukuronidů silybinu identifikovaných v moči (A) a v plazmě (B) dobrovolníků. Uvedené výsledky jsou vyjádřeny jako průměr; naměřená data se nelišila o více jak 5 %.



Obr. 16: Hmotnostní spektra molekulových iontů metabolitů II. fáze silybinu a jejich fragmenty ve vzorku moči dobrovolníka.

(a) silybin monoglukuronid (m/z 657) a jeho fragmentační iont (m/z 565)

(b) monoglukuronid *O*-demethylovaného silybinu (m/z 643) a jeho fragmentační iont (m/z 467)

(c) monosulfát blíže nespécifikovaného flavonolignanu (m/z 560) a jeho fragmentační iont (m/z 481)

6. DISKUSE

Studium interakcí přírodního flavonolignanu silybinu s hlavními biotransformačními enzymy I. a II. fáze, stejně tak charakterizace jednotlivých forem cytochromů P450 a UDP-glukuronosyltransferas zodpovědných za metabolické přeměny silybinu, přináší důležité poznatky nezbytné pro posouzení bezpečnosti při aplikaci této sloučeniny, zejména z hlediska možných lékových interakcí.

6.1 Inhibiční vliv silybinu na aktivitu cytochromu P450

V literatuře byla popsána inhibice několika forem cytochromu P450 silybinem. Beckmann-Knopp et al. (2000) studovali vliv silybinu na aktivitu nejvýznamnějších CYP přítomných v lidské jaterní mikrosomální frakci. Autoři v tomto článku popisují mírný efekt silybinu na snížení intenzity metabolických přeměn kofeinu (typického substrátu CYP1A2) a dalších substrátů: kumarinu (CYP2A6), *S*(+)-mefenytoinu (CYP2C19), chlorzoxazonu (CYP2E1) a erythromycinu (CYP3A4). Ve všech případech byla zjištěna hodnota IC_{50} větší než 200 $\mu\text{mol/l}$. Poměrně velký inhibiční vliv silybinu se projevil na oxidaci denitronifedipinu za účasti CYP3A4 (hodnoty IC_{50} 29 $\mu\text{mol/l}$ a 46 $\mu\text{mol/l}$ pro lidské jaterní mikrosomy ze dvou zdrojů) a pro 7-hydroxylaci (*S*)-warfarinu za účasti CYP2C9 (hodnoty IC_{50} 43 $\mu\text{mol/l}$ a 45 $\mu\text{mol/l}$ pro lidské jaterní mikrosomy ze dvou zdrojů). Střední efekt silybinu na aktivitu CYP zaznamenali autoři pouze pro CYP2D6 (substrát dextromethorphan), kdy stanovili $IC_{50}=173$ $\mu\text{mol/l}$. Venkataramanan et al. (2000) popsali silybin jako významný inhibitor aktivity CYP3A4 ve své studii na lidských hepatocytech. Pokles aktivity testovaného CYP3A4 zaznamenali až u vyšších koncentrací silybinu (100 $\mu\text{mol/l}$ a 250 $\mu\text{mol/l}$). Inhibiční vliv silybinu na aktivitu třech isoform CYP (2D6, 2E1 a 3A4) prokázali také Zuber et al. (2002b). Pro aktivitu CYP3A4 (substrát nifedipin) se IC_{50} pohybovala v této práci výrazně pod 100 $\mu\text{mol/l}$ pro dvě různé mikrosomální frakce. Aktivita CYP2D6 (se substrátem bufuralolem) byla sledována na mikrosomech tzv. pomalých metabolizátorů, kde byl silybin značně silným inhibitorem aktivity CYP2D6 (IC_{50} 4 $\mu\text{mol/l}$ resp. 44 $\mu\text{mol/l}$). Silný inhibiční efekt silybinu byl také pozorován u CYP2E1, kdy opět na dvou zdrojích mikrosomů byla stanovena IC_{50} (1,8 $\mu\text{mol/l}$ a 42 $\mu\text{mol/l}$) se substrátem *p*-nitrofenolem.

Sledování inhibice aktivit jednotlivých mikrosomálních cytochromů P450 silybinem v naší studii odhalilo, že v přítomnosti silybinu jsou ovlivněny aktivity isoform CYP1A2, 2C8, 2C9 a 3A4. Výsledky nepotvrdily výrazný inhibiční vliv silybinu na aktivitu CYP2E1 nebo CYP2D6. Nicméně závěry autorů Beckmann-Knopp et al. (2000) a Zuber et al. (2002b) o tom, že silybin významně inhibuje aktivitu CYP3A4 a CYP2C9, se shodují s našimi závěry.

Výše diskutované výsledky popisují inhibice aktivit enzymů silybinem, který je vlastně směsí dvou diastereomerů A a B v přibližném poměru 1:1. V práci autorů Brantley et al. (2010) byl studován inhibiční vliv jednotlivých diastereomerů (silybinu A a silybinu B) na aktivitu CYP2C9 přítomného v lidské jaterní mikrosomální frakci. Hodnota IC_{50} byla (u substrátu (*S*)-warfarinu) v tomto případě 18 $\mu\text{mol/l}$ pro silybin A a 8,2 $\mu\text{mol/l}$ pro silybin B. Dále bylo zjištěno, že oba diastereomery silybinu (silybin A a silybin B) významně inhibovaly 7-hydroxylaci (*S*)-warfarinu ($K_i = 10$ a 4,8 $\mu\text{mol/l}$).

Inhibiční vliv silybinu, ať už jednotlivých diastereomerů nebo jejich směsi, na aktivitu různých CYP v podmínkách *in vitro* byl prokázán v mikromolárních koncentracích studovaného flavonolignanů. Takto vysokých koncentrací, vzhledem k nízké biodostupnosti silybinu, nelze orální aplikací prakticky dosáhnout a z tohoto důvodu jsou interakce s cytochromy P450 pravděpodobně klinicky nevýznamné. To dokazuje řada studií, které dokumentují, že silybin/silymarin signifikantně neinhibuje CYP *in vivo*. Fuhr et al. (2007) ve své práci popsali, že silybin/silymarin, jakožto potenciální inhibitor CYP3A4, neovlivňuje farmakokinetiku antihypertenziva nifedipinu (substrátu CYP3A4) u zdravých dobrovolníků. Silybin rovněž neměl vliv na farmakokinetiku antidepresiva trazodonu (Chang et al., 2009), který je metabolizován CYP3A4 a CYP1A2. Han et al. (2009) se ve své studii zabývali otázkou, zda má silybin *in vivo* inhibiční efekt na aktivitu CYP2C9 stejně jako v podmínkách *in vitro*. Popsal inhibici metabolismu antihypertenziva losartanu (substrátu CYP2C9) silymarinem v souvislosti s rozdílným genotypem CYP2C9 u zdravých čínských dobrovolníků.

Kim et al. (2010) studoval účinek silybinu na farmakokinetiku tamoxifenu u potkanů. Závěrem tohoto experimentu bylo zjištění, že silybin zvyšuje biodostupnost tohoto nesteroidního antiestrogenu zvýšením absorpce tamoxifenu v tenkém střevě a snížením jeho "first-pass" metabolismu v tenkém střevě a játrech. Ačkoliv jsou potkani často užívaným experimentálním modelem pro studium farmakokinetiky a biotransformace xenobiotik, je potřeba při vyhodnocování výsledků brát v úvahu

mezidruhové rozdíly v aktivitě a hlavně v substrátové specifitě biotransformačních enzymů.

Z výsledků, které vyplývají z *in vitro* a *in vivo* studií, je zřejmé, že silybin lze považovat za poměrně bezpečný doplněk stravy bez signifikantních rizik lékových interakcí na úrovni cytochromu P450.

6.2 Metabolismus silybinu cytochromy P450 *in vitro*

Po inkubaci silybinu s lidskou jaterní mikrosomální frakcí identifikovali Guanaratna and Zhang (2003) *O*-demetylovaný silybin jako hlavní produkt metabolismu silybinu. Tři monohydroxyderiváty a dihydroxyderivát silybinu byly nalezeny jako minoritní produkty. V naší studii jsme po inkubaci s lidskými jaterními mikrosomy identifikovali stejné metabolity silybinu jako citované autoři.

Inhibicí všech cytochromů P450 oxidem uhelnatým jsme zabránili tvorbě *O*-demetylovaného metabolitu, čímž jsme prokázali, že cytochrom P450 nebo jiný enzym vyskytující se v mikrosomální frakci, jehož aktivita je závislá na přístupu kyslíku do reakční směsi, jsou odpovědné za tvorbu tohoto produktu.

V dalším kroku se nám podařilo identifikovat konkrétní formy cytochromu P450, které jsou za *O*-demethylaci silybinu zodpovědné. Pomocí specifického inhibitoru studované formy CYP jsme sledovali inhibici tvorby *O*-demetylovaného silybinu. Mezi testovanými inhibitory výrazně ovlivnil vznik tohoto produktu zejména kvercetin, relativně specifický inhibitor CYP2C8 (Walsky et al., 2005). Malý inhibiční efekt na tvorbu *O*-demetylovaného silybinu byl pozorován také u sulfafenazolu a triacetyloleandomycinu, inhibitorů CYP2C9 a CYP3A4. Toto zjištění koreluje s výsledky získanými v inhibičních studiích (Beckmann-Knopp et al., 2000; Sridar et al., 2004). V našich experimentech jsme s použitím baktosomů obsahujících jednotlivé rekombinantní formy CYP potvrdili, že CYP2C8 je hlavní forma zodpovědná za *O*-demethylaci silybinu. Nevýznamnou roli v přeměně silybinu na *O*-demetylovaný produkt hrál také CYP3A4. Žádný z dalších testovaných CYP se na metabolismu silybinu nepodílel. Částečnou inhibici metabolismu silybinu sulfafenazolem (inhibitorem CYP2C9) a inhibici aktivity CYP2C9 silybinem je možné vysvětlit na základě výrazné strukturální podobnosti isoforem CYP2C8 a CYP2C9 (73 %; Mestres, 2005). Obě formy

vzájemně vykazují překrývající se substrátovou i inhibiční specificitu, nicméně pouze forma CYP2C8 je schopna metabolizovat silybin.

6.3 Interakce silybinu s UDP-glukuronosyltransferasami

K lékovým interakcím na úrovni metabolismu může docházet nejen s enzymy I. fáze biotransformace cizorodých látek např. CYP, ale také s enzymy II. fáze (UGT, SULT, NAT apod.). Tyto interakce bývají poměrně vzácné, nicméně inhibice aktivity UGT silybinem může mít za následek toxický vliv současně podaného léčiva. Silybin je v několika studiích popisován jako inhibitor různých forem UGT.

Venkataramanan et al. (2000) popsali inhibici UGT1A6 a 1A9 silybinem v buněčné kultuře lidských hepatocytů. Inhibiční vliv silybinu na aktivitu lidských rekombinantních UGT (UGT1A1, 1A6, 1A9, 2B7 a 2B15) studovali také Sridar et al. (2004). Silybin zde inhiboval aktivitu uvedených forem UGT v mikromolárním množství. Naše experimenty popisují všechny tyto formy UGT jako zodpovědné za metabolismus silybinu.

I když z citovaných prací vyplývá, že silybin inhibuje enzymy jak rodiny UGT1, tak UGT2, D'Andrea et al. (2005) popsali, že inhibiční efekt silybinu je omezen na enzymy z podrodiny UGT1A. Na základě vyhodnocení našich experimentů můžeme konstatovat, že enzymy rodiny UGT2 se účastní metabolických přeměn silybinu, ale na rozdíl od členů rodiny UGT1, vykazují vzhledem k silybinu velmi nízkou aktivitu.

6.4 Metabolismus silybinu UDP-glukuronosyltransferasami *in vitro*

Flavonoidy jako polyfenolové sloučeniny mají ve své molekule několik hydroxylových skupin, což je předurčuje být dobrými substráty pro lidské UGT. Konjugace s kyselinou glukuronovou nastává právě na těchto –OH skupinách a dochází k tvorbě *O*-glukuronidů. Podle struktury flavonoidů je možné předjímat, jaká bude substrátová specificita a regiosektivita jednotlivých UGT. Flavonolignan silybin má poměrně složitou strukturu, nicméně stejně jako celá řada flavonoidů obsahuje ve své struktuře hydroxylovou skupinu v pozici C7 A-kruhu (viz obr. 3), a tato pozice je poměrně často preferovaným místem glukuronidace (Wong et al., 2009). Na základě

vyhodnocení našich experimentů jsme potvrdili, že silybin je regioselektivně metabolizován lidskými rekombinantními UGT a preferovaným místem glukuronidace je skutečně C7 uhlík molekuly silybinu.

Naše studie pomocí HPLC analýzy s UV detekcí prokázala, že UGT přítomné jak v primární kultuře lidských hepatocytů, tak v mikrosomální frakci lidského jaterního homogenátu metabolizují silybin za vzniku čtyř hlavních monoglukuronidů silybinu: silybin A-7-*O*- β -D-glukuronidu, silybin B-7-*O*- β -D-glukuronidu, silybin A-20-*O*- β -D-glukuronidu a silybin B-20-*O*- β -D-glukuronidu. Inkubace silybinu s jednotlivými lidskými rekombinantními UGT pomohla identifikovat, které formy UGT jsou zodpovědné za tvorbu těchto 7-*O*- β -D- a 20-*O*- β -D- monoglukuronidů. Rekombinantní UGT vykazují pro jednotlivé diastereomery silybinu různou substrátovou specificitu a často přednostně reagují s jedním ze dvou diastereomerů, a to se silybinem B. Devět testovaných forem UGT reagovalo regioselektivně a stereoselektivně se silybinem za tvorby 7-*O*- β -D- a 20-*O*- β -D- monoglukuronidů. UGT1A9 je jediná forma, která metabolizuje silybin za vzniku pouze 7-*O*- β -D-glukuronidů; žádný 20-*O*- β -D-glukuronid nebyl v reakční směsi obsahující tuto formu identifikován. UGT1A1, 1A7 a 2B7 jsou formy, které netvoří silybin A-20-*O*- β -D-glukuronid. Za metabolismus silybinu jsou tedy zodpovědné nejen enzymy exprimované zejména v játrech (UGT1A1, 1A3, 1A6, 1A9, 2B7 a 2B15), ale také UGT exprimované výhradně ve střevě (UGT1A7, 1A8 a 1A10). UGT1A4, 2B4 a 2B17 jsou formy, které se na metabolismu silybinu vůbec nepodílí. V literatuře několik autorů popisuje právě UGT1A4 a UGT2B4 jako formy, které na metabolismu flavonoidů vůbec neparticipují. Green and Tephly (1996) ve své studii popsali, že flavonoidy nejsou substráty pro enzym UGT1A4. Ke stejnému závěru dospěli také Tang et al. (2009), kteří navíc popsali, že flavonoidy nejsou glukuronidovány ani UGT2B4 enzymem. Silybin je tedy dalším polyfenolem, který není substrátem právě těchto enzymů. UGT2B17 je forma, která se podílí zejména na metabolismu androgenů, nicméně se také zapojuje do metabolismu celé řady xenobiotik např. kumarínů, benzodiazepínů, antrachinonů, nesteroidních protizánětlivých léčiv nebo flavonoidů. Mezi flavonoidy, které jsou touto formou UGT metabolizovány, patří galangin, chrysin nebo 7-hydroxyflavon (Turgeon et al., 2003). I když UGT2B17 enzym sdílí více než 95 % homologie s UGT2B15 formou, tak naše studie ukázala, že se UGT2B17 na metabolismu silybinu (narozdíl od UGT2B15) nepodílí. Příkladem dalšího flavonoidu,

který je metabolizován UGT2B15, ale nikoliv UGT2B17, může být naringenin (látko dávající grepu nahořklou chuť) (Green et al., 1994).

V roce 2008 popsali Chen et al. (2008) konjugaci silybinu s kyselinou glukuronovou za katalýzy rekombinantních UGT1A9 a UGT1A3 bez bližších detailů o pozici glukuronidace jednotlivých diastereomerů. Autoři popsali signifikantní stereoselektivní metabolismus silybinu pouze pro formu UGT1A9. Výsledky naší práce však ukazují na významný a stereoselektivní metabolismus silybinu všemi formami UGT.

Lewinsky et al. (2005) testovali glukuronidaci 42 bioflavonoidů za účasti UGT1A10. Výsledky studie ukázaly, že 34 zkoumaných sloučenin reagovalo s touto formou UGT. Ze závěrů naší studie je patrné, že silybin je dalším polyfenolem, který je metabolizován UGT1A10.

6.5 Biotransformace silybinu *in vivo*

Orální biodostupnost polyfenolů může být redukována díky rychlému metabolismu zejména za účasti konjugačních enzymů II. fáze biotransformace. Ačkoliv jsou játra hlavním orgánem metabolismu, také v buňkách střevního epitelu jsou přítomny biotransformační enzymy, které mohou významně přispět k jejich metabolickým přeměnám. Flavonolignany silymarinu jsou u lidí po perorálním podání rychle eliminovány a jejich konjugáty byly nalezeny v plazmě nebo v moči. Nekonjugované flavonolignany v plazmě ani v moči nebyly identifikovány vůbec, nebo byly přítomny jen ve velmi nízkých koncentracích (Wen et al., 2008).

Také v naší studii byly po podání dvou tablet silymarinu třem dobrovolníkům, v plazmě a v moči nalezeny hlavně glukuronidy a v menší míře sulfáty flavonolignanů. Výjimku tvořil silybin A, který byl ve volné formě identifikován v plazmě dobrovolníků, ale jen ve velmi nízké koncentraci. Na rozdíl od moči, kde byly nalezeny jen 7-*O*- β -D-glukuronidy silybinu, byl ve vzorcích plazmy identifikován především silybin B-20-*O*- β -D-glukuronid. Tento výsledek je ve shodě s publikovanými výsledky Křen et al. (2000), který popsal přítomnost 20-*O*- β -D-glukuronidů silybinu v plazmě dobrovolníků, ale bez bližšího určení jednotlivých diastereomerů. Glukuronid *O*-demetylovaného silybinu jsme identifikovali jak v moči, tak v plazmě dobrovolníků jako minoritní produkt. Toto zjištění je v souladu s daty, která jsme získali při experimentech *in vitro*.

Publikované farmakokinetické údaje potvrzují nízkou biodostupnost a rychlý vznik konjugátů silybinu v lidském organismu. Weyhenmeyer et al. (1992) ve své studii popsali, že nekonjugovaný silybin tvořil v plazmě průměrně 10 % celkové plazmatické koncentrace silybinu a poločas eliminace veškerého silybinu byl přibližně 6 hod. Asi 5 % orální dávky by podle této studie bylo vylučováno močí jako totální (volný a konjugovaný) silybin. Wen et al., (2008) identifikovali jako hlavní metabolity silybinu nalezené v plazmě dobrovolníků glukuronidy silybinu B. Poměr zastoupení glukuronidu silybinu A ku glukuronidu silybinu B v plazmě dobrovolníků byl 1:3. Toto zjištění se shoduje s našimi výsledky a ukazuje, že silybin B je nejen *in vitro*, ale také *in vivo* přednostně glukuronidovaným diastereomerem. Dalším výstupem citované práce bylo zjištění, že intenzita sulfatačních reakcí silybinu je mnohem nižší než glukuronidačních, což je opět ve shodě s výsledky získanými v naší laboratoři.

I když situace *in vivo* neodpovídá ve všech detailech závěrům získaným *in vitro*, naše výsledky jasně dokumentují, že glukuronidace silybinu je hlavní cestou jeho biotransformace a probíhá regiospecificky i stereospecificky. Důležitost studia metabolismu jednotlivých diastereomerů biologicky aktivních látek a léčiv vyplývá z možnosti jejich odlišné farmakokinetiky, ale také rozdílu v jejich účinku.

Vzhledem k tomu, že je silybin metabolizován UGT, mohl by *in vivo* ovlivňovat metabolismus endogenních substrátů UGT např. bilirubinu, steroidních hormonů, hormonů štítné žlázy, žlučových kyselin nebo vitamínů rozpustných v tucích (Kiang et al., 2005; Cashman et al., 1996), ale také může ovlivňovat biotransformaci orálně podávaných léčiv. Příkladem takového léčiva může být warfarin (nejčastěji předepisované antikoagulans), který je metabolizován nejen UGT1A1 a UGT1A3 (jaterními formami), ale také střevní UGT1A8 a UGT1A10 (Jones et al., 2010), tj. stejnými enzymy, které významně participují v metabolismu silybinu. Na druhé straně skutečnost, že se na metabolismu warfarinu spolupodílí více forem UGT, znamená, že by nemělo mít případné ovlivnění některého z enzymů silybinem výrazný dopad na hladinu tohoto léčiva v organismu.

7. ZÁVĚRY

Předkládaná disertační práce se zabývá interakcemi silybinu s hlavními biotransformačními enzymy I. a II. fáze metabolismu cizorodých látek a identifikací vznikajících metabolitů. Ze získaných výsledků lze vyvodit následující závěry:

- * V přítomnosti silybinu byly *in vitro* ovlivněny aktivity forem CYP1A2, 2C8, 2C9 a 3A4. Nejvýraznější inhibiční efekt silybinu se projevil na aktivitách CYP3A4 a CYP2C9 (IC_{50} 49,8 μ mol/l a 34,1 μ mol/l). Inhibice aktivity CYP2C9 silybinem byla popsána jako nekompetitivní. V případě CYP3A4 probíhala inhibice kompetitivním mechanismem.
- * Silybin je *O*-demetylovaný enzymem I. fáze metabolismu cizorodých látek, cytochromem P450 2C8 v přítomnosti mikrosomální frakce lidského jaterního homogenátu i za účasti rekombinantního CYP2C8. *O*-demetylovaný silybin byl identifikován jako hlavní produkt metabolismu silybinu enzymy I. fáze biotransformace.
- * UDP-glukuronosyltransferasy přítomné jak v primární kultuře lidských hepatocytů, tak v mikrosomální frakci lidského jaterního homogenátu metabolizovaly silybin za vzniku čtyř hlavních monoglukuronidů silybinu: silybin A-7-*O*- β -D-glukuronidu, silybin B-7-*O*- β -D-glukuronidu, silybin A-20-*O*- β -D-glukuronidu a silybin B-20-*O*- β -D-glukuronidu.
- * Rekombinantní UGT1A1, 1A3, 1A8, 1A10, ale také UGT1A6, 1A7, 1A9, 2B7 a 2B15 stereoselektivně tvořily 7-*O*- β -D- a 20-*O*- β -D-glukuronidy silybinu. Rekombinantní UGT1A4, 2B4 a 2B17 se na glukuronidaci silybinu nepodílely.
- * Lidské rekombinantní UDP-glukuronosyltransferasy přednostně reagovaly se silybinem B.
- * Preferovaným místem glukuronidace byl C7 uhlík.

- * Silybin ve vzorcích plazmy a moči dobrovolníků bylo možné identifikovat především ve formě konjugátů. Glukuronidace silybinu je hlavní cestou jeho biotransformace. Na rozdíl od lidské moči, kde byly nalezeny jen 7-*O*- β -D-glukuronidy silybinu, byl ve vzorcích lidské plazmy nalezen především silybin B-20-*O*- β -D-glukuronid. *O*-demetylovaný silybin glukuronid byl v moči i v plazmě dobrovolníků nalezen jako minoritní produkt.

8. SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI

Publikace:

1. Jančová P, Anzenbacherová E, Papoušková B, Lemr K, Lužná P, Veinlichová A, Anzenbacher P, Šimánek V. Silybin is metabolized by cytochrome P450 2C8 in vitro. *Drug Metab Dispos* 2007; 35(11):2035-2039. IF₂₀₀₇ = 3,907
2. Matal J, Jančová P, Šiller M, Mašek V, Anzenbacherová E, Anzenbacher P. Interspecies comparison of the glucuronidation processes in the man, monkey, pig, dog and rat. *Neuro Endocrinol Lett* 2008; 29(5):738-743. IF₂₀₀₈ = 1,359
3. Jančová P, Anzenbacherová E, Šiller M, Křen V, Anzenbacher P, Šimánek V. Evidence for differences in regioselective and stereoselective glucuronidation of silybin diastereomers by human UDP-glucuronosyltransferases. Odesláno k recenznímu řízení.
4. Jančová P, Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Phase II drug metabolizing enzymes. Přijato do tisku. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* (2010).

Prezentace na konferencích:

1. Jančová P. Interaction of silybin with human liver microsomal cytochromes P450. *Seminář k vědeckovýzkumnému záměru MŠM 6198959216*. 10.-12.5.2007, Karlov pod Pradědem, Česká republika.
2. Jančová P, Anzenbacherová E, Lemr K, Papoušková B, Lužná P, Anzenbacher P, Šimánek V, Ulrichová J. Metabolism of silybin by human liver microsomal cytochromes P450. *15th International Conference on Cytochromes P450*. 17.-21.6.2007, Bled, Slovinsko.
3. Jančová P, Anzenbacherová E, Dvořák Z, Kosina P, Anzenbacher P, Šimánek V. Metabolism of Silybin by Phase II enzymes in vitro. *Seminář k vědeckovýzkumnému záměru MŠM 6198959216*. 22.-24.5.2008, Karlov pod Pradědem, Česká republika.

4. Jančová P, Matal J, Anzenbacherová E, Dvořák Z, Kosina P, Anzenbacher P, Šimánek V. Contribution of Phase II enzymes to metabolism of silybin. *13th Interdisciplinary Toxicology Conference (TOXCON 2008)*, 27.-30.5.2008, Trenčianské Teplice, Slovenská republika. *Interdisciplinary toxicology* 2008; 1(1):75.
5. Matal J, Jančová P, Anzenbacherová E, Anzenbacher P. Comparison of glucuronidation processes in the man, rat, pig, monkey and dog. *13th Interdisciplinary Toxicology Conference (TOXCON 2008)*, 27.-30.5.2008, Trenčianské Teplice, Slovenská republika. *Interdisciplinary toxicology* 2008; 1(1):96.
6. Jančová P, Anzenbacherová E, Dvořák Z, Kosina P, Šimánek V. Metabolické přeměny silybinu. *60. jubilejní sjezd asociací českých a slovenských chemických společností*. 1.9.-4.9.2008, Olomouc, Česká republika. *Chem. listy* 2008; 102(8):627. IF₂₀₀₈ = 0,593
7. Jančová P, Anzenbacherová E, Šiller M, Křen V, Anzenbacher P, Šimánek V. Identification of phase II silybin metabolites by HPLC with UV detection and by LC-MS. *61. zjazd chemikov*. 7.9.-11.9.2009, Vysoké Tatry, Tatranské Matliare, Slovenská republika. *ChemZi* 2009; 5(9):125.
8. Jančová P, Anzenbacherová E, Šiller M, Křen V, Anzenbacher P, Šimánek V. Glucuronidation of silybin diastereomers by human recombinant UDP-glucuronosyltransferases. *Seminář k vědeckovýzkumnému záměru MŠM 6198959216*. 27.-29.5.2010, Vılanec u Jihlavy, Česká republika.
9. Jančová P, Anzenbacherová E, Šiller M, Křen V, Anzenbacher P, Šimánek V. Contribution of human recombinant UDP-glucuronosyltransferases to stereoselective metabolism of silybin diastereomers. *Young Scientist Forum/FEBS*. 23.6.-1.7.2010, Gotheborg, Švédsko.

9. OSTATNÍ PRÁCE

Publikace:

1. Dvořák Z, Vrzal R, Henklová P, Jančová P, Anzenbacherová E, Maurel P, Švecová L, Pávek P, Ehrmann J, Havlík R, Bednář P, Lemr K, Ulrichová J. JNK inhibitor SP600125 is a partial agonist of human aryl hydrocarbon receptor and induces CYP1A1 and CYP1A2 genes in primary human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 2008; 75(2):580-588. IF₂₀₀₈ = 4,838
2. Henklová P, Vrzal R, Papoušková B, Bednář P, Jančová P, Anzenbacherová E, Ulrichová J, Maurel P, Pávek P, Dvořák Z. SB203580, a pharmacological inhibitor of p38 MAP kinase transduction pathway activates ERK and JNK MAP kinase in primary cultures of human hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 2008; 593(1-3):16-23. IF₂₀₀₈ = 2,787
3. Veinlichová A, Jančová P, Šiller M, Anzenbacher P, Kuča K, Jun D, Fusek J, Anzenbacherová E. Effect of acetylcholinesterase oxime-type reactivators K-48 and HI-6 on human liver microsomal cytochromes P450 in vitro. *Chem Biol Interact* 2009; 180(3):449-453. IF₂₀₀₈ = 3,077

Prezentace na konferencích:

1. Dvořák Z, Vrzal R, Henklová P, Jančová P, Anzenbacherová E, Maurel P, Švecová L, Pávek P, Ehrmann J, Havlík R, Bednář P, Lemr K, Ulrichová J. C-Jun-N-Terminal kinase inhibitor SP600125 activates human aryl hydrocarbon receptor. *Seminář k vědeckovýzkumnému záměru MŠM 6198959216*. 22.-24.5.2008, Karlov pod Pradědem, Česká republika.
2. Vrzal R, Henklová P, Papoušková B, Bednář P, Jančová P, Anzenbacherová E, Ulrichová J, Maurel P, Pávek P, Dvořák Z. An inhibitor of P38 MAP kinase activates ERK and JNK MAP kinases in primary cultures of human hepatocytes. *10th European regional ISSX meeting*. 18.-21.5.2008, Vídeň, Rakousko. *Drug Metabolism Reviews-Biotransformation and disposition of xenobiotic* 2008; 40:102-103.

3. Dvořák Z, Vrzal R, Henklová P, Jančová P, Anzenbacherová E, Maurel P, Pávek P, Bednář P, Ulrichová J. JNK pharmacological inhibitor SP600125 is a partial agonist of human aryl hydrocarbon receptor and induces CYP1A1 and CYP1A2 genes in primary human hepatocytes. *10th European regional ISSX meeting*. 18.-21.5.2008, Vídeň, Rakousko. *Drug Metabolism Reviews-Biotransformation and disposition of xenobiotic* 2008; 40:103-104.
4. Henklová P, Dvořák Z, Vrzal R, Jančová P, Anzenbacherová E, Maurel P, Švecová L, Pávek P, Ehrmann J, Havlík R, Bednář P, Lemr K, Ulrichová J. Human aryl hydrocarbon receptor is activated by c-Jun-N-Terminal kinase inhibitor SP600125. *Konference vědeckých prací studentů DSP 2008*. 3.-4.9.2008, Olomouc, Česká republika.
5. Tunková A, Anzenbacherová E, Šiller M, Jančová P, Kuča K, Jun D, Fusek J, Anzenbacher P. Interaction of two acetylcholinesterase reactivators with human liver microsomal cytochromes P450. *14th Interdisciplinary Toxicology Conference (TOXCON 2009)*. 1.-3.6.2009, Brno, Česká republika. *Interdisciplinary toxicology* 2009; 2(2):155.

10. LITERATURA

Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 2002; 18(1):75-81.

Agúndez JA. Polymorphisms of human N-acetyltransferases and cancer risk. *Curr Drug Metab* 2008; 9(6):520-531.

Anonymous 1, <http://www.promega.com/tbs/tb325/tb325.pdf> [citováno 7.6.2010].

Anonymous 2, <http://www.cypex.co.uk/2c19info.htm> [citováno 7.6.2010].

Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(5-6):737-747.

Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cytochromes P450: Review on their basic principles. *Proc.Indian natn Sci Acad.* 2003; B69(6):889-991.

Alvarez AI, Real R, Pérez M, Mendoza G, Prieto JG, Merino G. Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *J Pharm Sci* 2010; 99(2):598-617.

Arias IM, Gartner LM, Cohen M, Ezzer JB, Levi AJ. Chronic nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with glucuronyl transferase deficiency. Clinical, biochemical, pharmacologic and genetic evidence for heterogeneity. *Am J Med* 1969; 47(3):395-409.

Arslan S, Silig Y, Pinarbasi H. An investigation of the relationship between SULT1A1 Arg(213)His polymorphism and lung cancer susceptibility in a Turkish population. *Cell Biochem Funct* 2009; 27(4):211-215.

Baldwin SJ, Bloomer JC, Smith GJ, Ayrton AD, Clarke SE, Chenery RJ. Ketoconazole and sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P4503A and 2C9. *Xenobiotica* 1995; 25(3):261-270.

Baranová J, Anzenbacher P, Kousalová L. Liekové interakcie na úrovni cytochrómov P450 časť II. interakcie na úrovni CYP2D6. *Klin Farmakol Farm* 2004; 18:102-107.

Bardakci F, Arslan S, Bardakci S, Binatli AO, Budak M. Sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) polymorphism and susceptibility to primary brain tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134(1):109-114.

Barzagli N, Crema F, Gatti G, Pifferi G, Perucca E. Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin- phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1990; 15(4):333-338.

Beckman-Knopp S, Rietbrock S, Weyhenmeyer R, Bocker RH, Beckurts KT, Lang W, Hunz M, Fuhr U. Inhibitory effects of silibinin on cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes. *Pharmacol Toxicol* 2000; 86(6):250-256.

Brantley SJ, Oberlies NH, Kroll DJ, Paine MF. Two flavonolignans from milk thistle (*Silybum marianum*) inhibit CYP2C9-mediated warfarin metabolism at clinically achievable concentrations. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 332(3):1081-1087.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998; 56(11):317-333.

Burchell B, Brierley CH, Rance D. Specificity of human UDP-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation. *Life Sci* 1995; 57(20):1819-1831.

Campos R, Garrido A, Guerra R, Valenzuela A. Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver. *Planta Med* 1989; 55(5):417-419.

Cashman JR, Perotti BYT, Berkman CE, Lin J. Pharmacokinetics and molecular detoxication. *Environ Health Perspect* 1996; 104:23-40.

Chang JC, Wu YT, Lee WC, Lin LC, Tsai TH. Herb-drug interaction of silymarin or silibinin on the pharmacokinetics of trazodone in rats. *Chem Biol Interact* 2009; 182(2-3):227-232.

Chang TK, Waxman DJ. Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 with 7-ethoxyresorufin as substrate. *Methods Mol Biol* 1998;107:103-109.

Chen Y, Xie S, Chen S, Zeng S. Glucuronidation of flavonoids by recombinant UGT1A3 and UGT1A9. *Biochem Pharmacol* 2008; 76(3):416-425.

Cheng Z, Radominska-Pandya A, and Tephly TR. Studies on the substrate specificity of human intestinal UDP-glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10. *Drug Metab Dispos* 1999; 27(10):1165-1170.

Coffman BL, King CD, Rios GR, Tephly TR. The glucuronidation of opioids, other xenobiotics, and androgens by human UGT2B7Y(268) and UGT2B7H(268). *Drug Metab Dispos* 1998; 26(1):73-77.

Collier AC, Ganley NA, Tingle MD, Blumenstein M, Marvin KW, Paxton JW, Mitchell MD, Keelan JA. UDP-glucuronosyltransferase activity, expression and cellular localization in human placenta at term. *Biochem Pharmacol* 2002; 63(3):409-419.

Comoglio A, Tomasi A, Malandrino S, Poli G, Albano E. Scavenging effect of silipide, a new silybin-phospholipid complex, on ethanol-derived free radicals. *Biochem Pharmacol* 1995; 50(8):1313-1316.

Court MH, Hazarika S, Krishnaswamy S, Finel M, Williams JA. Novel polymorphic human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2A3: Cloning, functional characterization of enzyme variants, comparative tissue expression, and gene induction. *Mol Pharmacol* 2008; 74(3):744-754.

Court MH, Greenblatt DJ. Biochemical basis for deficient paracetamol glucuronidation in cats: an interspecies comparison of enzyme constraint in liver microsomes. *J Pharm Pharmacol* 1997a; 49(4):446-449.

Court MH, Greenblatt DJ. Molecular basis for deficient acetaminophen glucuronidation in cats. An interspecies comparison of enzyme kinetics in liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 1997b; 53(7):1041-1047.

Crespi CL, Chang TK, Waxman DJ. Determination of CYP2C9-catalyzed diclofenac 4'-hydroxylation by high-performance liquid chromatography, in *Cytochrome P450 Protocols* (Phillips IR and Shephard EA eds) pp 129-133, 1998a. Humana. Totowa. NJ.

Crespi CL, Chang TK, Waxman DJ. CYP2D6-dependent bufuralol 1'-hydroxylation assayed by reverse-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, in *Cytochrome P450 Protocols* (Phillips IR and Shephard EA eds) pp 141-146, 1998b. Humana. Totowa. NJ.

D'Andrea V, Pérez LM, Sánchez Pozzi EJ. Inhibition of rat liver UDP-glucuronosyltransferase by silymarin and the metabolite silibinin-glucuronide. *Life Sci* 2005; 77(6):683-692.

Dierks EA, Stams KR, Lim HK, Cornelius G, Zhang H, Ball SE. A method for the simultaneous evaluation of the activities of seven major human drug-metabolizing cytochrome P450s using an in vitro cocktail of probe substrates and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 2001; 29(1):23-29.

Donato MT, Jiménez N, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* 2004; 32(7):699-706.

Ehmer U, Lankisch TO, Erichsen TJ, Kalthoff S, Freiberg N, Wehmeier M, Manns MP, Strassburg CP. Rapid allelic discrimination by TaqMan PCR for the detection of the Gilbert's syndrome marker UGT1A1*28. *J Mol Diagn* 2008; 10(6):549-552.

Fisher MB, Paine MF, Strelevitz T, Wrighton SA. The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism. *Drug Metabol Rev* 2001; 33(3-4):273-297.

Fuhr U, Beckmann-Knopp S, Jetter A, Lück H, Mengs U. The effect of silymarin on oral nifedipine pharmacokinetics. *Planta Med* 2007; 73(14):1429-1435.

Gaiser BK, Lockley DJ, Staines AG, Baarnhielm C, Burchell B. Alkylant glucuronidation in human liver and kidney microsomes: evidence for the involvement of UGT1A9 and 2B7. *Xenobiotica* 2003; 33(11):1073-1083.

Garfinkel D. Studies on pig liver microsomes I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* 2003; 409(1):7-15.

Gažák R, Walterová D, Křen V. Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. *Curr Med Chem* 2007; 14(3):315-338.

Ghosal A, Hapangama N, Yuan Y, Achanfuo-Yeboah J, Iannucci R, Chowdhury S, Alton K, Patrick JE, Zbaida S. Identification of human UDP-glucuronosyltransferase enzyme(s) responsible for the glucuronidation of posaconazole (Noxafil). *Drug Metab Dispos* 2004; 32(2):267-271.

Goldstein JA, Faletto MB, Romkes-Sparks M, Sullivan T, Kitareewan S, Raucy JL, Lasker JM, Ghanayem BI. Evidence that CYP2C19 is the major (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase in humans. *Biochemistry* 1994; 33(7):1743-1752.

Green MD, Oturu EM, Tephly TR. Stable expression of a human liver UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B15) with activity toward steroid and xenobiotic substrates. *Drug Metab Dispos* 1994; 22(5):799-805.

Green MD, Tephly TR. Glucuronidation of amines and hydroxylated xenobiotics and endobiotics catalyzed by expressed human UGT1.4 protein. *Drug Metab Dispos* 1996; 24(3):356-363.

Gregory PA, Lewinsky RH, Gardner-Stephen DA, Mackenzie PI. Regulation of UDP glucuronosyltransferases in the gastrointestinal tract. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 199(3):354-363.

Guengerich FP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J* 2006; 8(1):E101-111.

Guengerich FP. Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem Biol Interact* 1997; 106(3):161-182.

Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T, Waxman DJ. Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem* 1986; 261(11):5051-5060.

Guillemette C. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J* 2003; 3(3):136-158.

Gunaratna C, Zhang T. Application of liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry to investigate the metabolism of silibinin in human liver microsomes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 794(2):303-310.

Gurley BJ, Barone GW, Williams DK, Carrier J, Breen P, Yates CR, Song PF, Hubbard MA, Tong Y, Cheboyina S. Effect of milk thistle (*Silybum marianum*) and black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) supplementation on digoxin pharmacokinetics in humans. *Drug Metab Dispos* 2006; 34(1):69-74.

Halim AB, el-Ahmady O, Hassab-Allah S, Abdel-Galil F, Hafez Y, Darwish A. Biochemical effect of antioxidants on lipids and liver function in experimentally-induced liver damage. *Ann Clin Biochem* 1997; 34(Pt 6):656-663.

Han Y, Guo D, Chen Y, Chen Y, Tan ZR, Zhou HH. Effect of silymarin on the pharmacokinetics of losartan and its active metabolite E-3174 in healthy Chinese volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2009; 65(6):585-591.

Han YH, Lou HX, Ren DM, Sun LR, Ma B, Ji M. Stereoselective metabolism of silybin diastereoisomers in the glucuronidation process. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 34(5):1071-1078.

Haková H, Misúrová E. The effect of silymarin and gamma radiation on nucleic acids in rat organs. *J Pharm Pharmacol* 1993; 45(10):910-912.

Hodek P, Trefil P, Stiborová M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem Biol Interact* 2002; 139(1):1-21.

Hong SS, Seo K, Lim SC, Han HK. Interaction characteristics of flavonoids with human organic anion transporter 1 (hOAT1) and 3 (hOAT3). *Pharmacol Res* 2007; 56(6):468-473.

Hu M. Commentary: bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms. *Mol Pharm* 2007; 4(6):803-806.

Huang SK, Chiu AW, Pu YS, Huang YK, Chung CJ, Tsai HJ, Yang MH, Chen CJ, Hsueh YM. Arsenic methylation capability, myeloperoxidase and sulfotransferase genetic polymorphisms, and the stage and grade of urothelial carcinoma. *Urol Int* 2009; 82(2):227-234.

Hutt AJ, Caldwell J. Amino acid conjugation. In: Mulder GJ, ed. *Conjugation Reactions In Drug Metabolism*. New York, NY: Taylor & Francis; 1990:273-305.

Iida A, Saito S, Sekine A, Mishima C, Kitamura Y, Kondo K, Harigae S, Osawa S, Nakamura Y. Catalog of 86 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in three uridine diphosphate glycosyltransferase genes: UGT2A1, UGT2B15, and UGT8. *J Hum Genet* 2002; 47(10):505-510.

Isom HC, Secott T, Georgoff I, Woodworth C, Mummaw J. Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(10):3252-3256.

Jacobs BP, Dennehy C, Ramirez G, Sapp J, Lawrence VA. Milk thistle for the treatment of liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med* 2002; 113(6):506-515.

Jančová P, Anzenbacherová E, Papoušková B, Lemr K, Lužná P, Veinlichová A, Anzenbacher P, and Šimánek V. Silybin is metabolized by cytochrome P450 2C8 in vitro. *Drug Metab Dispos* 2007; 35(11):2035-2039.

Jinno H, Saeki M, Saito Y, Tanaka-Kagawa T, Hanioka N, Sai K, Kaniwa N, Ando M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Ozawa S, Sawada J. Functional characterization of human UDP-glucuronosyltransferase 1A9 variant, D256N, found in Japanese cancer patients. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306(2):688-693.

Jones DR, Moran JH, Miller GP. Warfarin and UDP-glucuronosyltransferases: writing a new chapter of metabolism. *Drug Metab Rev* 2010; 42(1):53-59.

Kadakol A, Ghosh SS, Sappal BS, Sharma G, Roy Chowdhury J, Roy Chowdhury N. Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Hum Mutat* 2000; 16(4):297-306.

Kiang TKL, Ensom MHH, Chang TKH. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther* 2005; 106(1):97-132.

Kidd PM. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts. *Altern Med Rev* 2009; 14(3):226-246.

Kim CS, Choi SJ, Park CY, Li C, Choi JS. Effects of silybinin on the pharmacokinetics of tamoxifen and its active metabolite, 4-hydroxytamoxifen in rats. *Anticancer Res* 2010; 30(1):79-85.

Kim YC, Kim EJ, Lee ED, Kim JH, Jang SW, Kim YG, Kwon JW, Kim WB, Lee MG. Comparative bioavailability of silibinin in healthy male volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2003; 41(12):593-596.

King CD, Rios GR, Assouline JA, Tephly TR. Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Arch Biochem Biophys* 1999; 365(1):156-62.

King CD, Rios GR, Green MD, Tephly TR. UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* 2000; 1(2):143-161.

Krishnaswamy S, Duan SX, Von Moltke LL, Greenblatt DJ, Sudmeier JL, Bachovchin WW, Court MH. Serotonin (5-hydroxytryptamine) glucuronidation in vitro: assay development, human liver microsome activities and species differences. *Xenobiotica* 2003; 33(2):169-180.

Kren V, Ulrichová J, Kosina P, Stevenson D, Sedmera P, Prikrylová V, Halada P, Simánek V. Chemoenzymatic preparation of silybin beta-glucuronides and their biological evaluation. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(12):1513-1517.

Labrune P, Myara A, Hennion C, Gout JP, Trivin F, Odievre M. Crigler-Najjar type II disease inheritance: a family study. *J Inher Metab Dis* 1989; 12(3):302-306.

Lewinsky RH, Smith PA, Mackenzie PI. Glucuronidation of bioflavonoids by human UGT1A10: structure-function relationships. *Xenobiotica* 2005; 35(2):117-129.

Liu Z, Hu M. Natural polyphenol disposition via coupled metabolic pathways. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2007; 3(3):389-406.

Lu C, Li AP. Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chem Biol Interact* 2001; 134(3):271-281.

Lucas D, Menez JF, Berthou F. Chlorzoxazone: an in vitro and in vivo substrate probe for liver CYP2E1. *Methods Enzymol* 1996; 272:115-123.

Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS, Nebert DW. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15(10):677-685.

Mackenzie PI, Rogers A, Treloar J, Jorgensen BR, Miners JO, Meech R. Identification of UDP glycosyltransferase 3A1 as a UDP N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 2008; 283(52):36205-36210.

Matal J, Jancova P, Siller M, Masek V, Anzenbacherova E, Anzenbacher P. Interspecies comparison of the glucuronidation processes in the man, monkey, pig, dog and rat. *Neuro Endocrinol Lett* 2008; 29(5):738-743.

Meinl W, Meerman JH, Glatt H. Differential activation of promutagens by alloenzymes of human sulfotransferase 1A2 expressed in *Salmonella typhimurium*. *Pharmacogenetics* 2002; 12(9):677-689.

Mestres J. Structure conservation in cytochromes P450. *Proteins* 2005; 58(3):596-609.

Miners JO, Knights KM, Houston JB, Mackenzie PI. In vitro-in vivo correlation for drugs and other compounds eliminated by glucuronidation in humans: pitfalls and promises. *Biochem Pharm* 2006; 71(11):1531-1539.

Modrianský M, Valentová K, Přikrylová V, Walterová D. Přírodní látky v prevenci onemocnění trávicího traktu. *Chem. Listy* 2003; 97(7):540-547.

Monshouwer M, van't Klooster GAE, Nijmeijer SM, Witkamp RF, van Miert ASJPAM. Characterization of cytochrome P450 isoenzymes in primary cultures of pig hepatocytes. *Toxicology in Vitro* 1998; 12(6):715-723.

Morazzoni P, Bombardelli E. *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). *Fitoterapia* 1995; 66(1):3-42.

Mori A, Maruo Y, Iwai M, Sato H, Takeuchi Y. UDP-glucuronosyltransferase 1A4 polymorphisms in a Japanese population and kinetics of clozapine glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 2005; 33(5):672-675.

Morris ME, Zhang S. Flavonoid-drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci* 2006; 78(18):2116-2130.

Muriel P, Garciapiña T, Perez-Alvarez V, Mourelle M. Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. *J Appl Toxicol* 1992; 12(6):439-442.

Nannelli A, Chirulli V, Longo V, Gervasi PG. Expression and induction by rifampicin of CAR- and PXR-regulated CYP2B and CYP3A in liver, kidney and airways of pig. *Toxicology* 2008; 252(1-3):105-112.

Newton DJ, Wang RW, Lu AY. Cytochrome P450 inhibitors. Evaluation of specificities in the in vitro metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1995; 23(1):154-158.

Nguyen H, Zhang S, Morris ME. Effect of flavonoids on MRP1-mediated transport in Panc-1 cells. *J Pharm Sci* 2003; 92(2):250-257.

Parkinson A. Chapter 6. Biotransformation of xenobiotics, in Casarett and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons* (Klaassen CD ed), McGraw-Hill, New York, 2001, 133-224.

Patten CJ. New technologies for assessing UDP-glucuronosyltransferase (UGT) metabolism in drug discovery and development. *Drug Discov Today Tech* 2006; 3(1):73-78.

Pichard-Garcia L, Gerbal-Chaloin S, Ferrini JB, Fabre JM, Maurel P. Use of long-term cultures of human hepatocytes to study cytochrome P450 gene expression. *Methods Enzymol* 2002; 357:311-321.

Radjabian T, Rezazadeh SH, Fallah Huseini H. Analysis of silymarin components in the seed extracts of some milk thistle ecotypes from Iran by HPLC. *Iranian Journal of Science & Technology, Transaction A* 2008, 32(2).

Roussel F, Duignan DB, Lawton MP, Obach RS, Strick CA, Tweedie DJ. Expression and characterization of canine cytochrome P450 2D15. *Arch Biochem Biophys* 1998; 357(1):27-36.

Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* 2001; 61(14):2035-2063.

Sharer JE, Shipley LA, Vandenbranden MR, Binkley SN, Wrighton SA. Comparisons of phase I and phase II in vitro hepatic enzyme activities of human, dog, rhesus monkey, and cynomolgus monkey. *Drug Metab Dispos* 1995; 23(11):1231-1241.

Slanina J, Táborská E. Příklad, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chem. Listy* 2004; 98(5):239-245.

Sneitz N, Court MH, Zhang X, Laajanen K, Yee KK, Dalton P, Ding X, Finel M. Human UDP-glucuronosyltransferase UGT2A2: cDNA construction, expression, and functional characterization in comparison with UGT2A1 and UGT2A3. *Pharmacogenet Genomics* 2009; [Epub ahead of print].

Sridar C, Goosen TC, Kent UM, Williams JA, Hollenberg PF. Silybin inactivates cytochromes P450 3A4 and 2C9 and inhibits major hepatic glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos* 2004; 32(6):587-594.

Stevens JC, Hines RN, Gu C, Koukouritaki SB, Manro JR, Tandler PJ, Zaya MJ. Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307(2):573-582.

Stiborová M, Hudeček J, Hodek P, Frei E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy* 1999; 93(4):229-237.

Stickel F, Schuppan D. Herbal medicine in the treatment of liver diseases. *Dig Liver Dis* 2007; 39(4):293-304.

Surh Y-J. Bioactivation of benzylic and allylic alcohols via sulfo-conjugation. *Chem Biol Interact* 1998; 109(1-3):221-235.

Sutherland L, Ebner T, Burchell B. The expression of UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 family in human liver and kidney and in response to drugs. *Biochem Pharmacol* 1993; 45(2):295-301.

Tang L, Singh R, Liu Z, Hu M. Structure and concentration changes affect characterization of UGT isoform-specific metabolism of isoflavones. *Mol Pharm* 2009; 6(5):1466-1482.

Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000; 40:581-616.

Tukey RH, Strassburg CP. Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract. *Mol Pharmacol* 2001; 59:405-414.

Turgeon D, Carrier JS, Chouinard S, Bélanger A. Glucuronidation activity of the UGT2B17 enzyme toward xenobiotics. *Drug Metab Dispos* 2003; 31(5):670-676.

Uchaipichat V, Mackenzie PI, Elliot DJ, Miners JO. Selectivity of substrate (trifluoperazine) and inhibitor (amitriptyline, androsterone, canrenoic acid, hecogenin, phenylbutazone, quinidine, quinine, and sulfapyrazone) "probes" for human udp-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos* 2006a; 34(3):449-456.

Uchaipichat V, Winner LK, Mackenzie PI, Elliot DJ, Williams JA, Miners JO. Quantitative prediction of in vivo inhibitory interactions involving glucuronidated drugs from in vitro data: the effect of fluconazole on zidovudine glucuronidation. *Br J Clin Pharmacol* 2006b; 61(4):427-439.

Valenzuela A, Guerra R. Protective effect of the flavonoid silybin dihemisuccinate on the toxicity of phenylhydrazine on rat liver. *FEBS Lett* 1985; 181(2):291-294.

- Venkataramanan R, Ramachandran V, Komoroski BJ, Zhang S, Schiff PL, Strom SC. Milk thistle, a herbal supplement, decreases the activity of CYP3A4 and uridine diphosphoglucuronosyl transferase in human hepatocyte cultures. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(11):1270-1273.
- Vogel G, Tuchweber B, Trost W, Mengers U. Protection by silibinin against *Amanita phalloides* intoxication in beagles. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 73(3):355-362.
- Walsky RL, Gaman EA, Obach RS. Examination of 209 drugs for inhibition of cytochrome P450 2C8. *J Clin Pharmacol* 2005; 45(1):68-78.
- Wang X, Chowdhury JR, Chowdhury NR. Bilirubin metabolism: Applied physiology. *Curr Paediatr* 2006; 16(1):70-74.
- Waxman DJ, Chang TK. Spectrofluorometric analysis of CYP2A6-catalyzed coumarin 7-hydroxylation. *Methods Mol Biol* 1998;107:111-116.
- Wells PG, Mackenzie PI, Chowdhury JR, Guillemette C, Gregory PA, Ishii Y, Hansen AJ, Kessler FK, Kim PM, Chowdhury NR, Ritter JK. Glucuronidation and the UDP-glucuronosyltransferases in health and disease. *Drug Metab Dispos* 2004; 32(3):281-290.
- Wen Z, Dumas TE, Schrieber SJ, Hawke RL, Fried MW, Smith PC. Pharmacokinetics and metabolic profile of free, conjugated, and total silymarin flavonolignans in human plasma after oral administration of milk thistle extract. *Drug Metab Dispos* 2008; 36(1):65-72.
- Wen Z, Martin DE, Bullock P, Lee KH, Smith PC. Glucuronidation of anti-HIV drug candidate bevirimat: identification of human UDP-glucuronosyltransferases and species differences. *Drug Metab Dispos* 2007; 35(3):440-448.
- Weyhenmeyer R, Mascher H, Birkmayer J. Study on dose-linearity of the pharmacokinetics of silibinin diastereomers using a new stereospecific assay. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 1992; 30(4):134-138.
- Wong YC, Zhang L, Lin G, Zuo Z. Structure-activity relationships of the glucuronidation of flavonoids by human glucuronosyltransferases. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009; 5(11):1399-1419.
- Yamamoto Y, Ishizuka M, Takada A, Fujita S. Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel rabbit cytochrome P450 isozymes, CYP2D23 and CYP2D24. *J Biochem* 1998; 124(3):503-508.

Yasumori T, Chen L, Nagata K, Yamazoe Y, Kato R. Species differences in stereoselective metabolism of mephenytoin by cytochrome P450 (CYP2C and CYP3A). *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 264(1):89-94.

Zhang L, Zuo Z, Lin G. Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids. *Mol Pharm* 2007; 4(6):833-845.

Zhang S, Morris ME. Effects of the flavonoids biochanin A, morin, phloretin, and silymarin on P-glycoprotein-mediated transport. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304(3):1258-1267.

Zuber R, Anzenbacherová E, Anzenbacher P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med* 2002a; 6(2):189-198.

Zuber R, Modriansky M, Dvorak Z, Rohovsky P, Ulrichova J, Simanek V, Anzenbacher P. Effect of silybin and its congeners on human liver microsomal cytochrome P450 activities. *Phytotherapy Res* 2002b; 16(7):632-638.