

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Lucie Vejvodová

Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 exprimovanými v prokaryotním a eukaryotním systému

Oxidation of ellipticine by human cytochromes P450 expressed in prokaryotic and eukaryotic systems

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: *Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.*

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 06. 05. 2013

Podpis.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání tématu diplomové práce, odborné vedení a laskavý a trpělivý přístup při jejím vypracování.

Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu naší laboratoře za všestrannou pomoc odborné rady a příjemnou pracovní atmosféru.

Práce byla vypracována jako součást řešení grantových vědeckých projektů podporovaných GAČR (P301/10/0356) a UK v Praze (UNCE 204025/2012).

Obsah

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	7
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1. ÚVOD	10
1.1. Nádorová onemocnění	12
1.2. Karcinogenese	12
1.2.1. Mechanismus karcinogenese	13
1.2.2. Faktory ovlivňující karcinogenesy	14
1.3. Léčba nádorových onemocnění	16
1.3.1. Onkologická léčba	16
1.3.2. Vedlejší účinky léčby cytostatiky	17
1.3.3. Mechanismus účinku cytostatik	18
1.3.4. Rezistence na cytostatika	20
1.3.4.1. Mechanismus vzniku rezistence vůči cytostatikům	20
1.3.4.2. Možnosti omezení rezistence vůči cytostatikům	21
1.4. Farmakokinetika cytostatik	22
1.5. Biotransformace xenobiotik	24
1.5.1. Enzymy I. fáze biotransformace	25
1.5.2. Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO systém)	25
1.5.2.1. NADPH:CYP reduktasa	26
1.5.2.1.1. Struktura a funkce NADPH:CYP reduktasy	27
1.5.2.2. Cytochromy P450	29
1.5.2.2.1. Názvosloví cytochromů P450	30
1.5.2.2.2. Struktura, výskyt a funkce cytochromů P450	30
1.5.2.2.3. Monooxygenasová reakce cytochromu P450	32
1.5.2.3. Cytochrom b ₅	35
1.5.2.3.1. Struktura cytochromu b ₅	35
1.5.2.3.2. Funkce cytochromu b ₅	36
1.6. Protinádorové léčivo ellipticin	38
1.6.1. Původ ellipticinu	38
1.6.2. Vedlejší účinky ellipticinu a jeho derivátů	39
1.6.3. Biotransformace ellipticinu	39
1.6.4. Mechanismus účinku protinádorového léčiva ellipticinu	40
1.6.5. Tvorba aduktů ellipticinu s DNA	42
1.6.6. Mechanismus oxidace ellipticinu	43
2. CÍL PRÁCE	46
3. MATERIÁL A METODY	47
3.1. Chemikálie a přístroje	47
3.1.1. Použité chemikálie	47
3.1.2. Použité pufrý a další roztoky	49

3.1.3. Použité přístroje	51
3.2. Analytické metody	51
3.2.1. Stanovení koncentrace proteinu metodou BCA (bicinchoninové kyseliny)	51
3.2.2. Stanovení aktivity NADPH:CYP reductasy	52
3.2.3. Diskontinuální elektroforéza SDS-PAGE	53
3.3. Metody použité při izolaci NADPH:CYP reductasy	53
3.3.1. Isolace mikrosomální frakce	53
3.3.2. Solubilizace membránových proteinů	54
3.3.3. Chromatografické metody	54
3.3.3.1. Kapalinová ionexová chromatografie	54
3.3.3.2. Afinitní chromatografie	56
3.3.4. Odstranění detergentu silikagelem	57
3.4. Studium metabolismu ellipticinu cytochromy P450	58
3.4.1. Oxidace ellipticinu cytochromy P450	58
3.4.2. Oxidace ellipticinu cytochromy P450 v rekonstituovaném systému	58
3.4.3. Separace metabolitů ellipticinu vysokotlakou kapalinovou chromatografií (HPLC)	60
4. VÝSLEDKY	61
4.1. Porovnání enzymové aktivity lidských cytochromů P450 2C9, 2C19 a 2D6 exprimovaných v prokaryotním a eukaryotním systému	61
4.1.1. Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 2C9	61
4.1.2. Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 2C19	62
4.1.3. Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 2D6	63
4.2. Isolace NADPH:CYP reductasy	65
4.2.1. Isolace mikrosomální frakce	66
4.2.2. Solubilizace membránových proteinů	66
4.2.3. Chromatografie NADPH:CYP reductasy na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (pH 7,5)	66
4.2.4. Chromatografie NADPH:CYP reductasy na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (pH 7,0)	68
4.3. Vliv NADPH:CYP reductasy a cytochromu b₅ na oxidaci ellipticinu lidskými cytochromy P450 2C9, 2D6 a 3A4 exprimovanými v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy	71
4.3.1. Vliv NADPH:CYP reductasy a cytochromu b ₅ na oxidaci ellipticinu lidským cytochromem P450 2C9 exprimovaném s nižší hladinou reductasy	71
4.3.2. Vliv NADPH:CYP reductasy a cytochromu b ₅ na oxidaci ellipticinu lidským cytochromem P450 2D6 exprimovaném s nižší hladinou reductasy	73
4.3.3. Vliv NADPH:CYP reductasy a cytochromu b ₅ na oxidaci ellipticinu lidským cytochromem P450 3A4 exprimovaném s nižší hladinou reductasy	75
5. DISKUZE	79
6. SOUHRN A ZÁVĚR	86
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	88

Abstrakt

Ellipticin, protinádorový alkaloid, představuje léčivo, jehož mechanismus účinku je založen na interkalaci do DNA, inhibici topoisomerasy II a na tvorbě kovalentních aduktů s DNA prostřednictvím enzymové aktivace cytochromy P450 a/nebo peroxidasami. Ellipticin je oxidován cytochromy P450 až na pět metabolitů (7-hydroxy-, 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu). Z těchto metabolitů jsou 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticin považovány za detoxikační metabolity, zatímco 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu za aktivační metabolity, které jsou zodpovědné za tvorbu kovalentních aduktů s DNA.

V diplomové práci byla testována efektivita lidských rekombinantních cytochromů P450 exprimovaných v eukaryotním (SupersomesTM) a dvou prokaryotních expresních systémech (Bactosomes) v oxidaci ellipticinu. Cytochromy P450 exprimované v prokaryotních systémech se lišily v množství „koexprimované“ NADPH:CYP reduktasy. Vzniklé metabolity ellipticinu byly analyzovány metodou HPLC.

Výsledky získané v diplomové práci demonstrují, že lidské cytochromy P450 CYP2C9/2D6/2C19 exprimované v prokaryotním nebo eukaryotním systému oxidují ellipticin za vzniku až čtyř metabolitů: 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticinu a N^2 -oxid ellipticinu. Jejich účinnost se ale mezi jednotlivými systémy liší. CYP2C9/2C19/2D6 exprimované v prokaryotním systému s vyšší hladinou NADPH:CYP reduktasy oxidují ellipticin nejefektivněji, a to především na metabolity 9-hydroxy-, 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin, a to v pořadí CYP2C19>2D6>>2C9, v přítomnosti i bez cytochromu b_5 . Naopak jako nejméně efektivní se v oxidaci ellipticinu jeví CYP2C9/2C19/2D6 exprimované v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy. Cytochrom b_5 nejvíce ovlivňuje oxidaci ellipticinu CYP2C9, 2C19 a 2D6 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy, a to ve prospěch aktivačních metabolitů. Dále byl zkoumán vliv přidané NADPH:CYP reduktasy na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 exprimovanými v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy.

Klíčová slova: cytochromy P450, ellipticin, NADPH:CYP reduktasa, cytochrom b_5 , prokaryotní expresní systém, eukaryotní expresní systém.

Abstract

Ellipticine is an alkaloid with antitumor activity, whose mechanism of action is based on intercalation into DNA, inhibition of topoisomerase II and formation of covalent adducts with DNA, after its enzymatic activation by cytochromes P450 and/or peroxidases. Ellipticine is oxidized by cytochromes P450 to form up to five metabolites (7-hydroxy-, 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticine and N^2 -oxide ellipticine). 9-Hydroxy- and 7-hydroxyellipticine are considered to be detoxification metabolites, whereas 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticine and N^2 -oxide of ellipticine are considered as activation metabolites, which are responsible for formation of covalent DNA adducts. The aim of this thesis was to examine the efficiency of human recombinant cytochromes P450 expressed in eukaryotic (SupersomesTM) and two prokaryotic expression systems (Bactosomes) in oxidation of ellipticine. Cytochromes P450 expressed in prokaryotic systems differed in the amounts of “coexpressed” NADPH:CYP reductase. The resulting ellipticine metabolites were analyzed by HPLC. The results obtained in this thesis demonstrate that human cytochromes P450 2C9/2D6/2C19 expressed in prokaryotic or eukaryotic systems oxidize ellipticine to form up to four metabolites: 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticine and N^2 -oxide of ellipticine. However, the efficiencies of individual systems differ. CYP2C9/2C19/2D6 expressed in a prokaryotic system with higher levels of NADPH:CYP reductase oxidized ellipticine most effectively, forming preferentially 9-hydroxy-, 12-hydroxy- and 13-hydroxyellipticine. The efficiencies of cytochromes P450 to oxidize ellipticine is as follows: CYP2C19 > 2D6 >> 2C9, both in the presence and the absence of cytochrome b₅. On the contrary, the CYP2C9/2C19/2D6 enzymes expressed in a prokaryotic system with lower levels of NADPH:CYP reductase appear to be less effective in ellipticine oxidation. Cytochrome b₅ affects oxidation of ellipticine by CYP2C9, 2C19 and 2D6 expressed in a prokaryotic system with lower levels of NADPH:CYP reductase. The oxidation of ellipticine in this case favored formation of activation metabolites. Furthermore, the effects of added NADPH:CYP reductase on ellipticine oxidation by cytochromes P450 expressed in a prokaryotic system with lower levels of NADPH:CYP reductase were examined.

Keywords: cytochromes P450, ellipticine, NADPH:CYP reductase, cytochrome b₅, prokaryotic expression system, eukaryotic expression system.

Seznam použitých zkratek

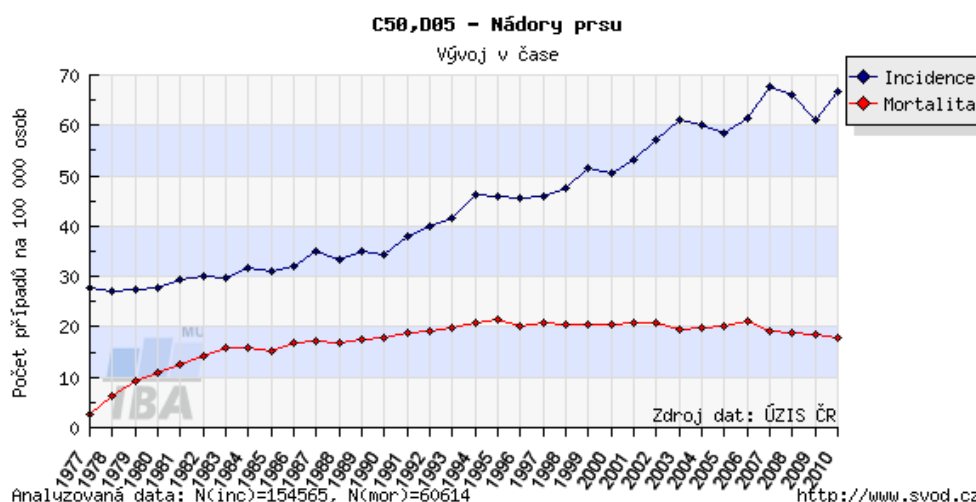
a_{CPR}	aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy
ATP/ADP	adenosintrifosfát/adenosindifosfát
A_x	absorbance při vlnové délce x nm
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
CBB	brilantová modř (z angl. Coomassie Brilliant Blue)
cDNA	complementary DNA
CPR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
CYP	cytochrom P450
cyt b₅	cytochrom b ₅
cyt c	cytochrom c
DEAE	diethylaminoethyl
DLPC	dilauroylfosfatidylchlorid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ε	molární absorpční koeficient
EDTA Na₂	ethylen diamintetraoctová kyselina ve formě dvojsodné soli
FAD/FADH•/FADH₂	flavinadenindinukleotid (chinoidní forma)/semichinoidní radikál/hydrochinon
FMN / FMNH•/FMNH₂	flavinadeninmononukleotid (chinoidní forma)/semichinoidní radikál/hydrochinon
GIT	gastrointestinální trakt
HIV	human imunodeficiency virus
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát
IARC	mezinárodní institut pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
M	mol/l
M1-M5	metabolity ellipticinu

MFO	system monooxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxygenases)
NAD⁺/NADH	nikotinamidadenindinukleotid oxidovaný/redukovaný
NADP⁺/NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidovaný/redukovaný
NADPH:CYP reductasa	NADPH:cytochrom P450 reductasa
P450	pigment a maximem absorbance při 450 nm (cytochrom P450)
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů
pI	izoelektrický bod
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
RH	substrát
ROH	hydroxylovaný produkt
RPM	počet otáček za minutu (revolution per minute)
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialové spektrum (vlnění o vlnové délce kratší než 380 nm)
VIS	viditelné spektrum (vlnění o vlnové délce 380 – 750 nm)
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem
λ	vlnová délka

1. ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou stále velkým problémem moderní medicíny. V dnešní době jsou po kardiovaskulárních onemocněních druhou nejčastější příčinou úmrtí v technicky vyspělých oblastech světa [Slíva, J.&Votava, M. 2010]. Každý rok zemře na nádorové onemocnění více než 7 milionů lidí a téměř 11 milionů nových případů je ročně diagnostikováno. Většinu nádorových onemocnění ovlivňuje prostředí a životní styl. Nevhodná strava a karcinogeny přítomné ve vodě, v potravě a ovzduší způsobují vzrůstající počet jednotlivých nádorových buněk, než je pro organismus přirozené. Imunitní systém, který může být oslaben stresem či polutanty, pak není schopen efektivně tuto situaci řešit [Stiborová, 2005]. Nádorová onemocnění také postihují stále mladší věkové ročníky. Statistiky navíc ukazují, že 43 % případů nádorových onemocnění se dá předejít zdravým životním stylem osvojeným již v dětství [Zdravě.cz].

V České republice ročně umírá na onkologická onemocnění více než 27 tisíc osob, což představuje 23 % z celkové úmrtnosti. V roce 2009 bylo v Národním onkologickém registru pro ČR (NOR) registrováno přes 78 000 případů nádorových onemocnění a z toho téměř 28 000 pacientů s nádorovým onemocněním zemřelo. Nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním v roce 2009 byl karcinom kůže a dále: karcinom tlustého střeva, karcinom průdušnice, průdušek a plic, karcinom prsu u žen a karcinom prostaty u mužů. Nejvyšší úmrtností u žen se vyznačoval zhoubný karcinom prsu (Obr. 1) a u mužů zhoubný karcinom plic [Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2012].



Obr. 1: Časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100 000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100 000 osob) pro nádor prsu v celé populaci. Převzato z <http://www.svod.cz>

Léčba nádorových onemocnění v minulosti byla velice drastická s minimálním účinkem. Dnes existuje řada kvalitních léčebných metod, které postiženým dokážou nejen život prodloužit, ale též je zachránit. Základními a nejužívanějšími metodami léčby nádorových onemocnění jsou chemoterapie, radioterapie, chirurgická léčba [Zdravě.cz].

Protinádorová chemoterapie, které se v této diplomové práci věnovala pozornost, je nejnovější z těchto metod, jelikož se v širším měřítku začala uplatňovat až v průběhu šedesátých let. V následujících desetiletích prodělala bouřlivý vývoj, kdy se z původně doplňkové metody stala metodou základní. Užití chemoterapie jako jediné hlavní metody je však omezeno mnoha faktory jako je rozměr nádoru, načasování chemoterapie, dávkování cytostatika, a rezistence na cytostatika. V každém případě je pro léčbu nádorových onemocnění protinádorová chemoterapie nepostradatelnou metodou [Klener, 1994].

1.1. Nádorová onemocnění

Nádory (novotvary) vznikají nadměrným a nekontrolovatelným bujením tkáně, což bývá doprovázeno inaktivací genů zodpovědných za potlačení novotvaru a aktivací onkogenů. Ačkoli nádory vznikají z buněk těla vlastních, rostou trvale a bez ohledu na nároky organismu a vyznačují se funkčními i tvarovými odlišnostmi od normální tkáně [Hampl et al, 2007]. Nádory se dělí na dvě skupiny, a to na:

- **maligní** (zhoubné) nádory, které rostou rychle, metastazují a prorůstají do okolní tkáně, což způsobuje její destrukci,
- **benigní** (nezhoubné) nádory, které rostou pomalu, netvoří metastáze (sekundární nádory) a bývají přesně ohraničené od normální tkáně.

Označení zhoubné bujení (neoplastická onemocnění, rakovina) zahrnuje širokou škálu onemocnění od leukémie až po celistvé novotvary různých tkání a orgánů. Ve své podstatě je zhoubné bujení onemocněním buněk, které spočívá ve ztrátě kontroly nad jejich růstem, diferenciací, proliferací a jejich apoptózou [Stiborová&Mikšanová, 1999; Hampl et al, 2007].

1.2. Karcinogenese

Kompletní proces vývoje nádorů se nazývá karcinogenese (případně kancerogenese). Karcinogenese je složitý, mnohastupňový proces, při kterém dochází ke kumulaci poruch (mutací) určitých genů, vedoucích k narušení funkce jimi kódovaných proteinů. Tyto proteiny se zejména účastní regulace dělení a diferenciace buňky. Určité mutace vzniklé v několika kritických genech pak mohou vést k transformaci zdravé buňky v buňku maligní a následně ke vzniku nádoru (tumoru). Pro kancerogenesi jsou důležité poruchy poměrně malého počtu genů, jejichž počet se odhaduje na několik set, což odpovídá méně než 0,1% z celého genomu [Stratil et al., 2004].

Geny, jejichž mutace mohou vést k vzniku nádorového procesu, dělíme na:

Protoonkogeny – kódující proteiny, které se zapojují do regulace buněčného cyklu a diferenciace (proteinkinasy, transkripční faktory, růstové faktory, receptory pro růstové faktory, cyklin dependentní kinasy),

Tumor supresorové geny (antionkogeny) – jejichž produkty potlačují buněčnou proliferaci normálních somatických buněk a udržují je v klidovém stádiu [Stiborová&Mikšanová, 1999].

1.2.1. Mechanismus karcinogenese

Mnohastupňový proces karcinogenese (Obr. 2, str. 14) je možné rozdělit do tří fází: iniciační, promoční a progresní.

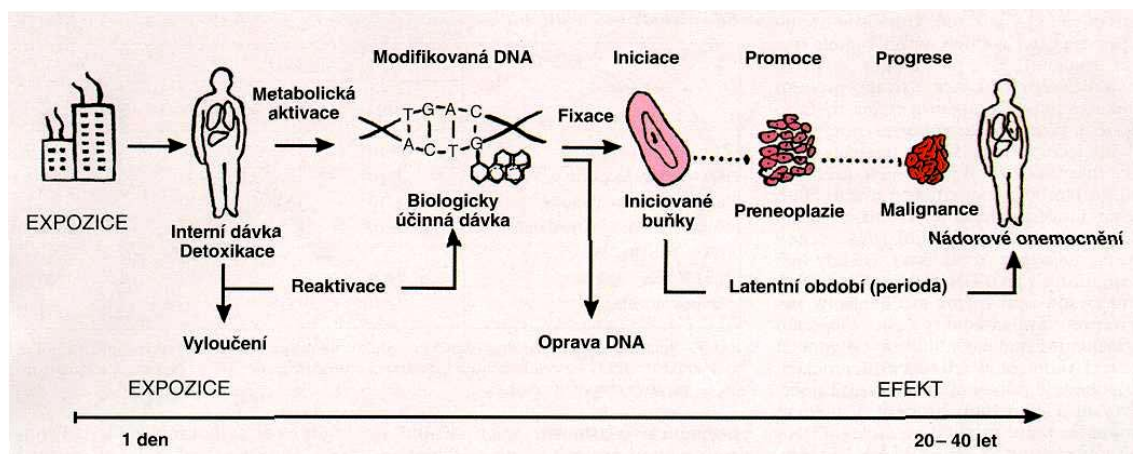
V **iniciační fázi** karcinogenese dochází k pozměnění genetické informace zdravé buňky vedoucí k aktivaci onkogenů a k deaktivaci tumor supresorových genů a vzniká tzv. iniciovaná buňka (prekarcinogenní léze). Prekarcinogenní léze se v organismu tvoří i spontánně, ale jejich poškozená DNA je většinou opravena reparačními mechanismy, nebo jsou zlikvidovány imunitním systémem [Stiborová&Mikšanová, 1999; Stiborová, 2005].

Tyto iniciované buňky vznikají především jako následek různých modifikací. Mezi nejdůležitější modifikaci DNA patří vznik kovalentních aduktů s chemickými karcinogeny, který spočívá v kovalentní vazbě karcinogenu na báze, ev. těchto látek na deoxyribosu DNA. Pro 90% lidských karcinogenů je k vytvoření kovalentních aduktů s DNA nezbytná metabolická aktivace. Z pro-karcinogenních forem se stávají metabolickou aktivací formy reaktivní („ultimativní“). Reaktivní formy jsou silnými elektrofilu schopné se vázat na DNA [Stiborová&Mikšanová, 1999; Stiborová, 2005].

Další modifikace DNA resultují také z radiace, dochází ke tvorbě pyrimidinových dimerů, apurinaci a apyrimidinaci DNA. Karcinogeny také tvoří interkaláty, cyklické adukty tvořené z bifunkčních genotoxických činidel a působením radikálových forem kyslíku vznikají též hydroxyderiváty bází DNA [Stiborová&Mikšanová, 1999; Stiborová, 2005].

V **promoční fázi**, která může trvat léta i desetiletí, dochází ještě ke zvýšení proliferace iniciovaných buněk pod vlivem látek – promotorů, což vede ke vzniku preneoplasie - benigního nádoru. Promotory mají většinou epigenetické vlastnosti (nepoškozuji sekvenci DNA) a většinou bývají tkáňově specifické (sacharin – močový měchýř, fenobarbital – játra, forbolester - kůže) [Stiborová&Mikšanová, 1999]. Při metabolismu promotorů často vznikají aktivní formy kyslíku, které mohou vyvolat oxidační změny v DNA a tak aktivovat protoonkogen. Častým mechanismem účinku promotorů je též aktivace protein kinasy c [Stiborová&Mikšanová, 1999].

Poslední fáze karcinogenese je **progrese**, která je velmi podobná fázi iniciační, avšak k modifikaci DNA dochází ještě účinněji. Důsledkem této fáze je nekontrolovatelný růst maligně pozměněných buněk do okolní tkáně. Maligní buňky se odštěpením mohou dostat krevními nebo lymfatickými cestami do jiných tkání a orgánů [Stiborová&Mikšanová, 1999].

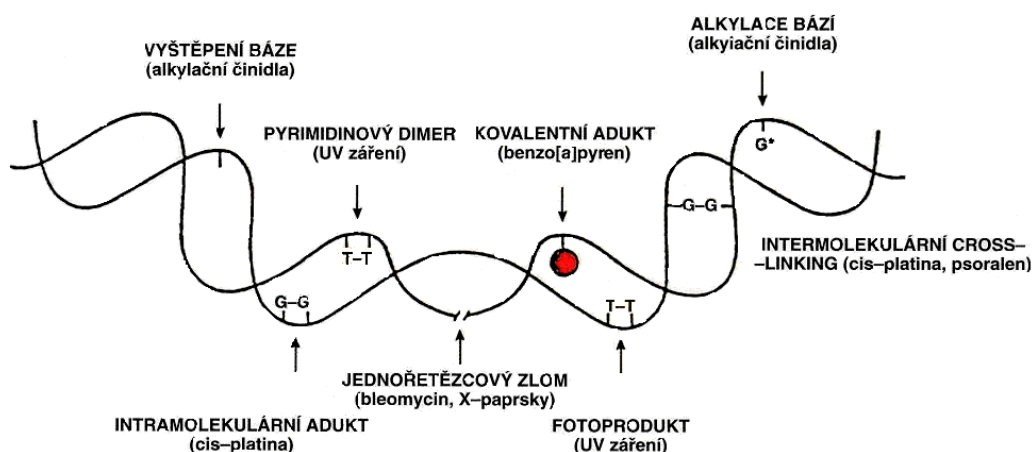


Obr. 2: Schéma vícestupňové karcinogenese. [Stiborová&Mikšanová, 1999]

1.2.2. Faktory ovlivňující karcinogenesy

Faktory mající vliv na vznik nádorového onemocnění lze rozdělit do dvou skupin, a to na vnější a vnitřní faktory. Vnitřními faktory jsou myšleny dědičnost, oslabení a poškození obranyschopnosti organismu [Stiborová, 2005]. Mezi vnější faktory (Obr. 3, str. 15) zvyšující pravděpodobnost vzniku nádoru patří:

- ❖ **fyzikální faktory** - různé druhy záření (ultrafialové, radioaktivní, kosmické, Rentgenové záření) a některé druhy jemných pevných částic (azbest, sloučeniny beryllia),
- ❖ **biologické faktory** - genetické předpoklady a některé viry (odhaduje se, že až 20 % nádorů je způsobeno onkoviry) [Stiborová&Mikšanová, 1999],
- ❖ **chemické faktory** - chemické karcinogeny [Stiborová, 2005].



Obr. 3: Mechanismy poškození DNA různými vnějšími faktory. [Stiborová, Mikšanová., 1999]

V dnešní době je zvláště chemickým karcinogenům věnována velká pozornost. Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny (*International Agency for Research on Cancer*, IARC, <http://www.iarc.fr/>) ohodnotila již 109 různých chemických látek jako prokazatelně karcinogenních pro člověka. Chemické karcinogeny lze rozdělit podle mechanismu působení na:

- **genotoxické karcinogeny** - tvořící kovalentní adukty s DNA,
- **epigenetické karcinogeny** - modifikující DNA nekovalentními interakcemi,
- **karcinogeny způsobující změnu struktury molekuly DNA** – jedno- a dvouřetězové zlomy, případně „cross-link“ [Stiborová&Mikšanová, 1999].

1.3. Léčba nádorových onemocnění

Diagnostikované nádorové onemocnění je stále vnímáno jako rozsudek smrti. A to i přes významné pokroky, které byly dosažené v oblasti léčby nádorových onemocnění. V současné době lze zcela vyléčit mnoho nádorových onemocnění a u značné populace nemocných dávají moderní léčebné metody naději na dlouhodobou klidovou fázi nemoci s dobrou kvalitou života. Avšak některé typy nádorových onemocnění nelze vyléčit, zvláště jsou-li diagnostikovány v pokročilém stádiu. K léčbě nádorových onemocnění existuje řada různých léčebných metod. Ve většině případů nádorových onemocnění nestačí jediný terapeutický léčebný postup, který by stačil k jejich vyléčení. Pro dosažení optimálního výsledku léčby se kombinují tři základní terapeutické metody: chirurgické odstranění, radioterapie a onkologická léčba (včetně hormonální terapie) [<http://www.onkoforum.cz>; Klener, 1996; Hynie, 2003].

Samotná chirurgická léčba je vhodná pouze u lokalizovaných nádorů menšího rozsahu. U jiných nádorů se dále kombinuje s jinými terapeutickými metodami [Klener 1996]. Radioterapie je léčba ionizujícím zářením, která do jisté míry eliminuje residuální nádor. Diseminované nádorové onemocnění lze účinně léčit pouze chemoterapií. Ve speciálních případech u některých typů nádorů se uplatňuje imunoterapie, jejímž cílem je obnovit porušenou funkci protinádorové imunity a zapojit ji do léčby nádorového onemocnění. Léčbou nádorového onemocnění pro 21. století by se mohla stát genová terapie, která je založena na opravě genetického defektu nádorových buněk, což znamená přenos nové genetické informace do genomu buňky. Žádané geny mohou být přenášeny přímo (klonovanou molekulou DNA), nebo se pro jejich transdukcii využívají různé vektory (retroviry, adenoviry) [Klener, 1996; Klener, 2011].

1.3.1. Onkologická léčba

Onkologická léčba (chemoterapie) je metoda, která využívá chemické látky (cytostatika) k léčbě nádorových onemocnění. Cytostatika (z řeckého kytos=buňka a statikos=stavící) jsou látky, které různými mechanismy zastavují růst a dělení nádorových buněk [Hynie, 2001]. Cílem léčby cytostatiky je zabezpečit optimální farmakologický účinek při minimální toxicitě za současné prevence vývoje rezistence. Tato léčba je vždy komplexní a musí být řízena specializovaným lékařem-onkologem [Slíva&Votava, 2010]. Nádorová onemocnění jsou značně heterogenní a citlivost nádorů k léčbě cytostatiky se značně liší pro různá nádorová onemocnění, nelze proto nalézt žádné univerzální léčivo, které by fungovalo proti všem typům nádorů [Klener, 2011]. Pro dosažení optimálního

výsledku léčby se onkologická léčba kombinuje s dalšími základními terapeutickými postupy.

Chemoterapii lze dělit na několik kategorií:

- **kurativní chemoterapie** – cytostatická léčba podávaná s cílem úplného vyléčení nádorového onemocnění,
- **paliativní chemoterapie** – cytostatická léčba podávaná pacientům s malou nadějí na vyléčení s cílem prodloužit dobu přežití a zlepšit kvalitu života,
- **adjuvantní chemoterapie** – cytostatická léčba doplňující a zvyšující účinnost základní terapie (ozáření nádoru, chirurgické odstranění). Cílem této chemoterapie je zničení tzv. zbytkové populace nádorových buněk,
- **neadjuvantní chemoterapie** - cytostatická léčba podávaná před chirurgickým zákrokem nebo před ozářením nádoru radioterapií [Klener, 1996; Klener 2011].

1.3.2. Vedlejší účinky léčby cytostatiky

Nežádoucí účinky cytostatik jsou závažné a poměrně časté. Tyto nežádoucí účinky vyplývají z antiproliferační povahy cytostatik, což má za následek, že léčiva ničí rychle se množící buňky [Slíva&Votava, 2010]. Cytostatika působí neselektivně, jejich účinek se projeví jak v nádorově proliferujících buňkách, tak i v proliferujících buňkách zdravých tkáních [Klener, 2011]. Tím působí negativně zejména na buňky kostní dřeně, sliznici gastrointestinálního traktu, vlasové folikuly, vyvíjející se plod apod. Často jsou cytostatika hepatotoxická a nefrotoxická [Slíva&Votava, 2010]. Přehled nejčastějších nežádoucích účinků chemoterapie je uveden v Tab. 1.

Tab. 1: Nejčastější účinky protinádorových léčiv (upraveno podle [Klener, 2011]):

Toxicita	Účinky společné různým cytostatikům
Bezprostřední (hodiny až dny)	nevolnost, záněty žil, zvracení, lokální nekrózy, hyperurikémie, anafylaxe
Častá (dny až týdny)	leukopenie, trombocytopenie, průjem
Oddálená (týdny až měsíce)	anémie, hepatocelulární léze,
Pozdní (měsíce až roky)	sterilita, hypogonadismus

Ke zmírnění některých z těchto nežádoucích vedlejších účinků chemoterapie se spolu s cytostatiky podávají pomocné látky. Velmi často se indikují látky stimulující

krvetvorbu, vitamíny a antiemetika na utlumení nevolnosti, která tak umožňují podání vyšších dávek cytostatika [Slíva&Votava, 2010].

1.3.3. Mechanismus účinku cytostatik

Cytotoxický účinek cytostatik používaných v současné době k léčbě nádorových onemocnění lze vysvětlit několika mechanismy. Základními mechanismy účinku cytostatik jsou:

- *Inhibice klíčových enzymů metabolismu, což vede k poruše biosynthesy nukleových kyselin s následnou inhibicí buněčného dělení.*

Látky, které působí tímto mechanismem, se strukturně podobají přirozeným metabolitům a označují se **analoga** metabolitů nebo podle způsobu účinku **antimetabolity** [Klener, 1996].

Cytostatika uplatňují svůj účinek téměř výhradně na buňky, které se nacházejí v aktivní fázi buněčného cyklu. Inhibice syntesy DNA a RNA působí na všechny proliferující buňky, jak na nádorové buňky, tak i na buňky zdravé a v závislosti na množství dávky a trvání účinku cytostatika je příčinou smrti buňky. [Klener, 1996].

Antimetabolity jsou tříděny podle cílového enzymu, který je antimetabolitem blokován, nebo podle substrátů, na jejichž úrovni dochází k inhibici (purinová a pyrimidinová analoga). Třídění antimetabolit je ale většinou problematické, neboť je jejich zásah mnohostranný [Klener, 1996]. V chemoterapii se uplatňují antimetabolity několika typů:

Analoga kyseliny listové (antifolika) blokující působení kyseliny listové. Tato analoga mají funkci tetrahydrofolátu (koenzym F) při přenosu jedno-uhlíkových fragmentů při syntese buněčných komponent. Do této skupiny patří např. metotrexát [Klener, 1996; Hynie, 2003].

Analoga purinů stávající se účinná až po metabolické přeměně na nukleotidy. Mezi analoga purinů patří např. 6-thioguanin a 6-merkaptopurin, které se inkorporují do DNA, a tím se stává DNA nefunkční.

Analoga pyrimidinů blokující tvorbu DNA, což má za následek inhibici syntesy deoxytymidintrifosfátu (kyseliny thymidylové), a tím narušují syntesu DNA. Do této skupiny patří např. 5-fluouracil a cytarabin [Klener, 1996].

Inhibitory ribonukleotidreduktasy jsou cytostatika, která se nepadobají přirozeným prekurzorům, ale inhibicí klíčových enzymů blokují biosynthetické reakce (př. hydroxymočovina) [Klener, 1996; Hynie, 2003].

- *Přímé poškození struktury nukleových kyselin, které vede k poruše jejich funkce, a tím dochází k inhibici proliferace buněk*

Poškození struktury a funkce nukleových kyselin vede k poruše jejich biologických funkcí. Nejvýznamnější z hlediska chemoterapie je inhibice replikace a inhibice transkripce, méně inhibice translace [Klener, 1996].

Ke strukturnímu poškození nukleových kyselin přispívá:

Alkylace (arylace) – Alkylační látky se vážou kovalentně na DNA a způsobují tak její poškození (př. karmustin, cisplatina, cyklofosfamid).

Interkalace (vmezeření) – Cytostatikum se váže na DNA nekovalentně. Molekula cytostatika se vmezeří mezi dvoušroubovicovou molekulu DNA, kde se váže např. hydrofobními, iontovými vazbami či vodíkovými můstky, čímž inhibují replikaci a transkripci (př. aktinomycin D, ellipticin).

Inhibice topoisomeras – Tyto enzymy jsou důležité pro replikaci DNA. Topoisomerasy zajišťují správnou „topologii“ DNA (zabraňují „překroucení“ šroubovice DNA, zlomu řetězce DNA a ztrátě funkce DNA), (př. etopozid).

Rozštěpení molekuly DNA – Některá antibiotika polypeptidové povahy podobně jako ionizující záření rozštěpují molekulu DNA [Klener, 1996; Hynie, 2003].

- *Alterace mikrotubulárního proteinu, která vede k abnormálnímu průběhu mitosy a její blokádou v metafázi*

Látky poškozující strukturu a funkci mikrotubulů jsou někdy označovány jako „mitotické jedy“, jelikož jsou cytotoxické převážně v průběhu mitosy. Alterace mikrotubulů poškodí funkci dělicího vřeténka, které je nezbytné pro správnou migraci chromosomů k pólům dělicí se buňky. Porušení procesu mitosy je důležitý mechanismus inhibice nádorového růstu (kolchicin, vinkristin, taxany) [Klener, 1996; Hynie, 2003].

- *Porucha proteosynthesy*

Proteosynthesa je jedním z metabolických dějů podmiňujících růst zdravých a nádorových buněk. Enzym L-aspariginasa způsobuje deficit L-asparaginu a tím omezuje růst buněk, které jsou závislé na přítomnosti této aminokyseliny [Klener, 1996].

➤ *Poškození buněčné membrány*

Změny permeability a fluidity buněčné membrány, poškození membránových receptorů a porušení integrity membrány může vést až ke smrti buňky (př. antracyklyny) [Klener, 1996].

1.3.4. Rezistence na cytostatika

Jak již bylo zmíněno výše, cytostatika představují nebezpečí pro všechny živé buňky. Z tohoto důvodu si buňky vytvořily obranný mechanismus schopný odolávat cytostatikům, což má za následek selhání léčby nádorů [Hynie, 2003]. Rezistence na cytostatika je tak jednou z nejzávažnějších komplikací chemoterapie. Nádorové buněčné populace mohou být rezistentní vůči léčbě již při první chemoterapii (**přirozená rezistence**). V průběhu léčby může vznikat získaná (**sekundární**) rezistence, kdy se původně citlivé buňky stávají rezistentní, a účinnost léčby cytostatikem se snižuje. Zkřížená rezistence (**cross-rezistence**) je zvláštní případ rezistence, kdy při ztrátě citlivosti k jednomu cytostatiku vzniká souběžně rezistence na jiné, strukturně podobné léčivo. Lokální rezistence vzniká z místních příčin [Klener, 1996].

1.3.4.1. Mechanismus vzniku rezistence vůči cytostatikům

Mechanismus vzniku rezistence (Obr. 4, str. 21), bývá nejčastěji vázán na:

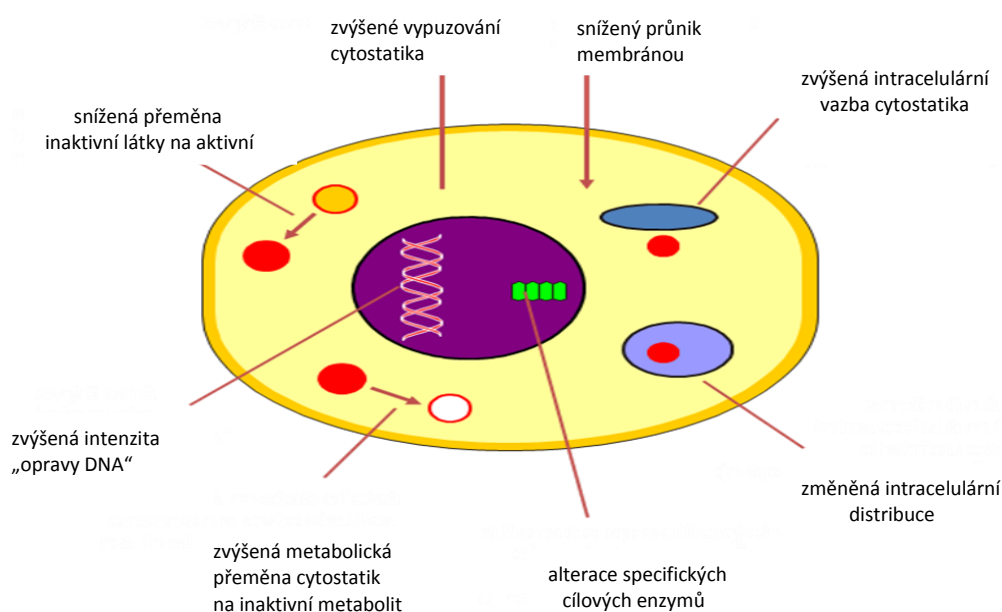
- **Změny farmakokinetiky** – např. snížená resorpce cytostatika, rychlejší inaktivace cytostatika, urychlený rozklad cytostatika, urychlené vylučování cytostatika.
- **Změny cytokinetiky léčiva** – z heterogenní populace nádorových buněk mohou vznikat rezistentní linie buněk.
- **Strukturální nebo funkční změny buňky**
 - zvýšená koncentrace enzymů (např. zvýšená hladina glutathionu v buňce, který reaguje s cytostatiky, má často za následek inaktivaci cytostatika),
 - snížená koncentrace či aktivita enzymů nutných pro aktivaci cytostatika na účinnou látku,
 - omezení průchodu cytostatika buněčnou membránou,

- změna intracelulární distribuce cytostatika,
- zvýšené opravy DNA [Klener, 1996].

1.3.4.2. Možnosti omezení rezistence vůči cytostatikům

K úspěšnému překonání rezistence je zejména nutné:

- Zahájit léčbu co nejdříve.
- Zajistit účinnou koncentraci cytostatika v cílové tkáni (podáváním vysokých dávek cytostatika).
- Podávat současně odlišná cytostatika s rozdílným mechanismem účinku.
- Dodržovat intervaly podávání cytostatik tak, aby léčba neposkytovala prostor pro vznik mutací.
- Změnit při sníženém účinku chemoterapie co nejdříve kombinaci cytostatik, či změnit kombinace cytostatik [Klener, 1996; Hynie, 2003].



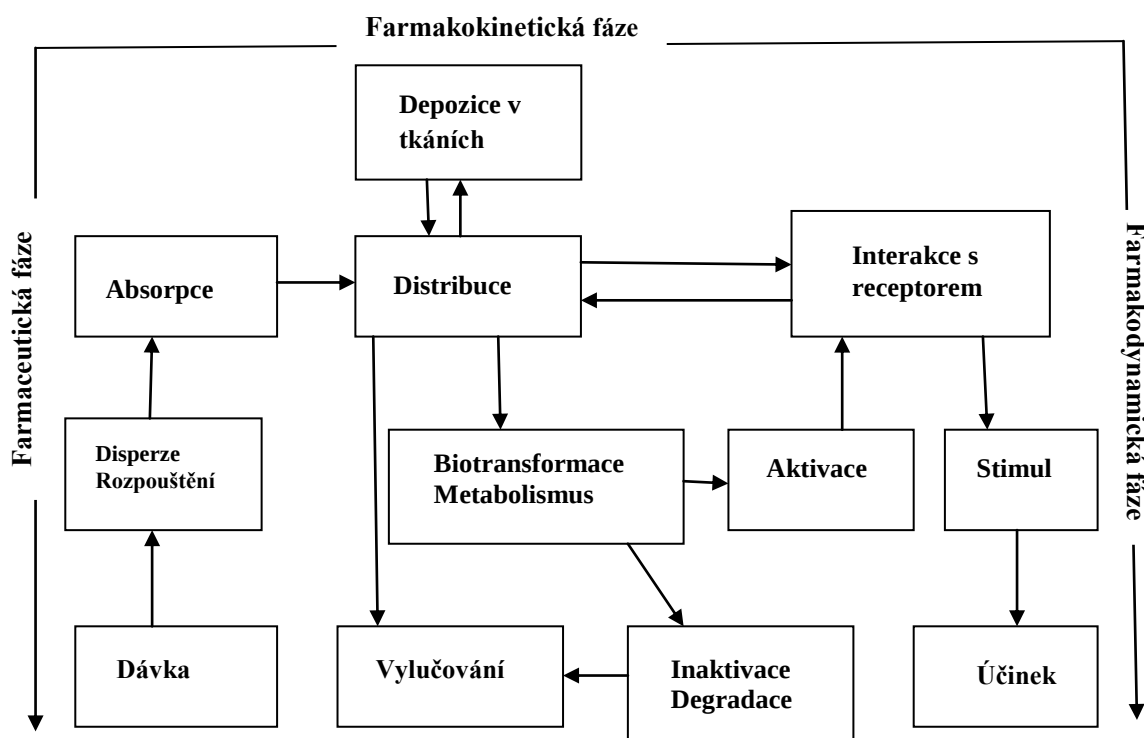
Obr. 4: Mechanismy vzniku rezistence nádorových buněk vůči cytostatikům (upraveno podle [Klener, 1996]).

1.4. Farmakokinetika cytostatik

Farmakokinetika je odvětví farmakologie, které se zabývá osudem cytostatika v organismu (tj. působení organismu na podané léčivo), osud cytostatika v organismu je znázorněn na Obr. 5 (str. 23). Předmětem studia farmakokinetiky jsou především procesy, které ovlivňují koncentraci cytostatika v místě jeho zásahu a závislost této koncentrace na čase [Hampl et al., 2007]. Farmakokinetika cytostatik se skládá z řady dílčích dějů, které spolu velmi úzce souvisejí a vzájemně na sebe navazují [Klener, 1996]. Tyto dílčí děje jsou:

- **Resorpce (absorpce) cytostatika** – je proces pohybu cytostatika z místa podání do krevního a lymfatického oběhu [Hampl et al., 2007]. Rychlost a stupeň resorpce závisí na řadě faktorů, z kterých jsou nejdůležitější aplikační cesty, aplikační formy a průnik cytostatik biologickými membránami [Klener, 1996]. Do krve se léčiva dostávají třemi hlavními cestami, a to trávicím traktem (žaludek, střeva), dýchacím systémem (plíce, průdušky, nosní sliznice) a pokožkou. Resorpce se uplatňuje u všech cest podání s výjimkou intravenózního a intraarteriálního (zde se podává cytostatikum přímo do krevního oběhu) [Knejzlík et al., 2000].
- **Distribuce cytostatika v organismu** – je proces přenosu cytostatika mezi krevním řečištěm a orgány. Distribuce cytostatika je podmíněna velikostí molekuly a rychlostí průniku do jednotlivých kompartmentů. V intravaskulárním prostoru jsou cytostatika rozpuštěná ve vodném prostředí, nebo dochází k vazbě cytostatika na krevní buňky či na bílkoviny krevní plasmy (např. albumin). Koncentrace cytostatika v jednotlivých cílových tkáních a orgánech také dále závisí na jejich prokrvení [Klener, 1996]. Absorbované cytostatikum se většinou v organismu rozděluje nerovnoměrně do různých kompartmentů (plasma, extracelulární a intracelulární prostor). Jednotlivé kompartmenty jsou od sebe odděleny bariérami, které rozdílně propustí různé látky [Hynie, 2003].
- **Biotransformace cytostatika (metabolismus) v organismu** – metabolické přeměny léčiva v metabolicky aktivních orgánech (ledviny, játra, plíce). Cílem těchto přeměn je vznik hydrofilnějších látek, které jsou tak snadněji vyloučeny z organismu [Hynie, 2003]. Detailněji je tento proces popsán v kapitole 1.5.

- **Eliminace cytostatika či jeho metabolitů z organismu-** je souhrn procesů vedoucích k vyloučení aktivní látky z organismu [Hynie, 2003]. Na tomto procesu se převážně podílí ledviny, zažívací trakt a plíce. Vzácně se cytostatikum vyloučit i jinými cestami (potem, slinami, mlékem). [Klener 1996; Slíva & Votava, 2010].



Obr. 5: Osud cytostatika v organismu (upraveno podle [Hampl et al., 2010]).

Cytostatika patří mezi skupinu látek, které jsou pro organismus cizorodými látkami. Takové látky označujeme za xenobiotika. V dalších kapitolách je probrán jejich metabolismus (biotransformace).

1.5. Biotransformace xenobiotik

Xenobiotika (řec. *xenos* – cizí, *bios* – živý) jsou nízkomolekulární i vysokomolekulární látky, které se v organismu normálně nevyskytují. Tyto cizorodé látky jsou v organismu buď předmětem biochemických přeměn katalyzovaných enzymy (metabolická přeměna), nebo podléhají samovolným změnám za podmínek panujících v organismu (např. pH), případně reagují s některými exogenními a endogenními sloučeninami. Některá xenobiotika se však v organismu nemění a jsou buď v nezměněné formě vyloučena z organismu (např. éter), nebo procházejí membránami a jsou v organismu kumulována [Rusek, 2001].

Většina xenobiotik se biotransformuje pomocí membránově vázaných nespecifických enzymů lokalizovaných membránách v endoplasmatického retikula buněk. Při biotransformaci dochází ke změně struktury a vlastností xenobiotik, což má za následek změnu biologické účinnosti. U většiny případů xenobiotik se jedná o inaktivaci tj. snížení toxicity xenobiotika (**inaktivace, detoxikace**). Ale v některých případech mohou vznikat biotransformačním procesem látky toxičtější, než je látka původní (**aktivace**). Touto cestou vzniká většina genotoxických látek (karcinogenních, mutagenních, teratogenních), ale i látek farmakologicky účinnějších, než byla látka původní (tzv. aktivace proléčiva). V průběhu biotransformace dochází k přeměně xenobiotika (zpravidla lipofilního charakteru) na látku polárnější, jejíž molekulová hmotnost se obvykle výrazně zvyšuje (důsledek konjugací fáze). Hydrofilnější látka je tak snadněji vylučována z organismu [Rusek, 2001]. Jen výjimečně nedochází v organismu k biotransformaci látek (např. syntetické sladidlo sacharin prochází organismem, aniž by byl metabolizován) [Hampl et al., 2007]. Biotransformace je v živočišných organismech dvoustupňový proces sestávající z:

- I. fáze biotransformace a
- II. fáze biotransformace.

Aktivita enzymů metabolizujících xenobiotika je závislá na mnoha faktorech jako je např. rozdílnost pohlaví, věk, životní styl, příjem léků, genetické vybavení, zdravotní stav. Tyto faktory mohou být příčinou nepředvídatelné abnormální reakce na některé škodliviny, ale hlavně na léky, kde jsou dosud největší poznatky [Rusek, 2001].

1.5.1. Enzymy I. fáze biotransformace

V první fázi biotransformace xenobiotik, nazývané **derivatizační**, je do molekuly substrátu zavedena polární skupina, nebo se demaskuje „skrytá“ funkční skupina v molekule již přítomná (-OH, -NH₂, -SH, =CO, -COOH). Vzniklý biotransformační metabolit, pokud je dostatečně polární, je vylučován přímo z organismu nebo dále reaguje v II. fázi biotransformace s konjugáčním agens za vzniku konjugátu [Kvasničková et al., 1995; Rusek, 2001]. Produkty těchto reakcí jsou látky polárnější a hydrofilnější [Rusek, 2001]. Mezi nejčastější biotransformační reakce xenobiotik patří:

- **oxidační reakce** – C-hydroxylace, O-dealkylace, N-dealkylace, alifatická hydroxylace, S-oxidace, N-oxidace, alkylace, oxidace alkoholů a aldehydů, deaminace,
- **redukční reakce** – redukce nitrosloúčenin, redukce sulfoxidů, redukce azosloúčenin, redukční dehalogenace,
- **hydrolytické reakce** – hydrolýza esterů a amidů [Kvasničková et al., 1995].

Mezi nejdůležitější enzymy I. fáze metabolizující xenobiotika se řadí systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO systém), jehož součástí je cytochrom P450. Dalšími enzymy, které se v menší míře podílejí na I. fázi biotransformace, jsou hemové peroxidasy, flavinové mikrosomální monooxygenasy (Zieglerův enzym), dehydrogenasy, reduktasy a hydrolytické enzymy [Stiborová et al., 1999; Stiborová, 2005].

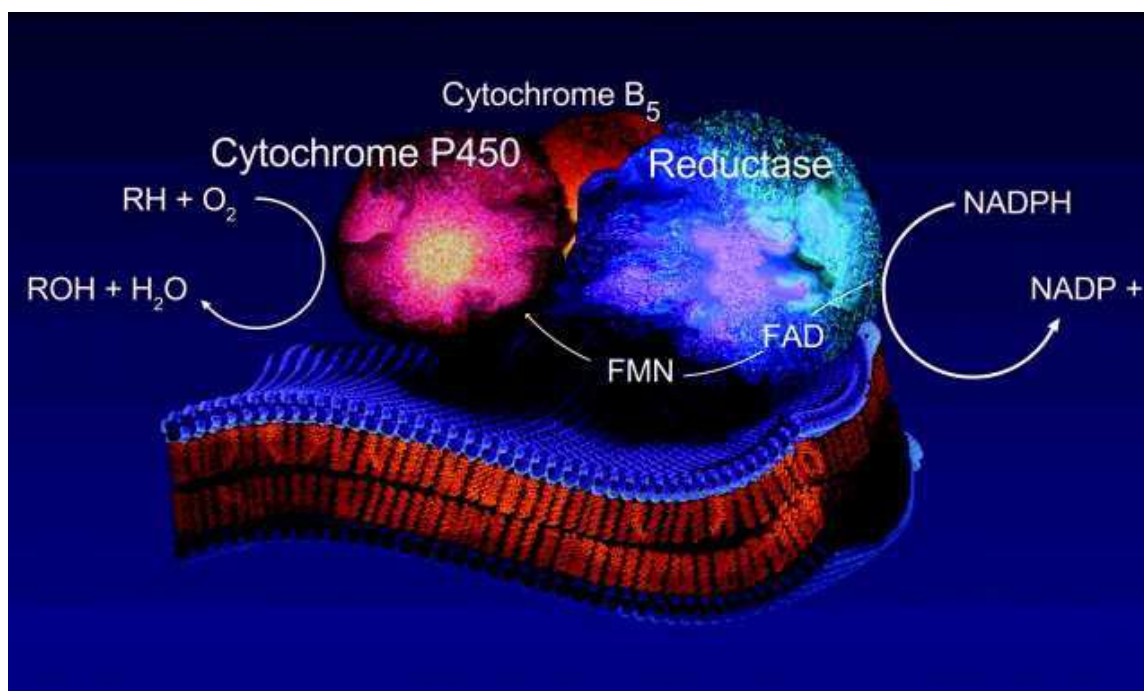
1.5.2. Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO systém)

Mikrosomální monooxygenasový systém je soubor enzymů nacházející se na vnější straně membrány hrubého i hladkého endoplasmatického retikula ev. na mitochondriální membráně (Obr. 6, str. 26). Tento systém katalyzuje celou řadu oxygenačních, oxidačních, peroxidačních ev. redukčních reakcí, přičemž využívá především molekulární kyslík [Coon, 1978; Stiborová, 2005].

MFO systém má tři základní složky:

- flavoproteinový enzym **NADPH:CYP reduktasa** – která dělí elektronové pár
- hemthiolátový enzym **cytochrom P450** – který zastává roli terminální oxidasy
- **biologická membrána** [Stiborová, 2005]

Fakultativně může MFO systém obsahovat také **cytochrom b_5** a **NADH:cytochrom b_5 reduktasu**.



Obr. 6.: Uspořádání MFO systému v membráně endoplasmatického retikula. Převzato z <http://www.safcglobal.com/>

1.5.2.1. NADPH:CYP reduktasa

Enzym NADPH:CYP reduktasa (CPR) je integrální membránový flavoprotein, který je umístěn na povrchu endoplasmatického retikula [Laursen et al., 2011]. Jak naznačuje její název, NADPH:CYP reduktasa je hlavní redoxní partner pro cytochromy P450, ale je také schopná přenášet elektrony na jiné redoxní proteiny jako je cytochrom b_5 , cytochrom c, hemové oxygenasy či na elongační systém mastných kyselin [Gut et al., 1992]. Spolu se synthasou oxidu dusnatého (NOS) se jedná o enzymy vyskytující se u savců obsahující oba FAD i FMN kofaktory [Iyanagi, 2005]. NADPH:CYP reduktasa může být za určitých okolností nahrazena NADH: cytochrom b_5 reduktasou, které slouží NADH jako donor vodíku [Gut et al., 1992].

1.5.2.1.1. Struktura a funkce NADPH:CYP reductasy

Molekula NADPH:CYP reductasy se skládá z 2 funkčních domén: z hydrofobní N-terminální (6 kDa) domény, kterou je zakotvena v membráně, a z hydrofilní C-terminální katalytické domény (72 kDa). C-terminální funkční doména je složena z FMN- a FAD-vazebné strukturní domény [Laursen et al., 2011]. Mezi těmito dvěma vazebnými strukturními doménami se nachází „spojovací struktura“, která zodpovídá za správnou prostorovou orientaci obou domén. FAD a FMN jsou v kontaktu prostřednictvím 7- a 8-methylových skupin isoalloxazinových kruhů, které leží těsně u sebe a svírají úhel zhruba 150°, strukturní domény se vzájemně nepřekrývají. Přenos elektronů mezi flaviny je díky tomuto kontaktu rychlý, jelikož není zprostředkován zbytkem aminokyselin [Wang et al., 1997]. Struktura potkaní NADPH:CYP reductasy je zobrazena na Obr. 7.



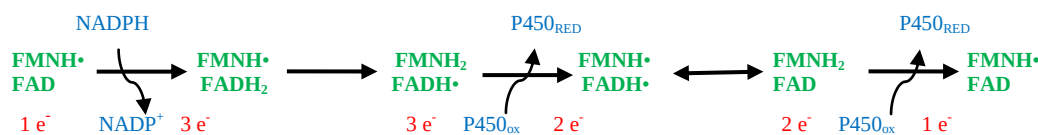
Obr. 7: 3D struktura potkaní NADPH:CYP reductasy. Převzato z <http://ars.els-cdn.com/>.

FAD-vazebná doména je zodpovědná za nekovalentní vazbu NADPH; pozitivně nabitě aminokyseliny arginin a lysin interagují v místě vazby NADPH s negativně nabitou fosfátovou skupinou v poloze 2' ribosy a způsobují tak neobvykle vysokou selektivitu NADPH:CYP reductasy vůči NADPH.

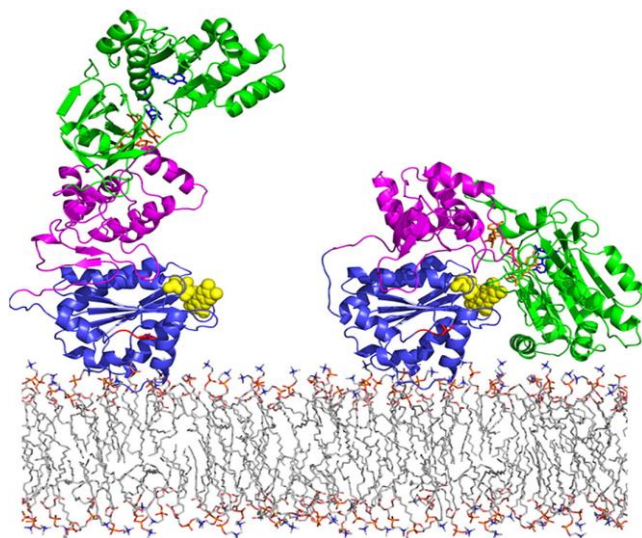
FMN-vazebná doména je zodpovědná za přenos elektronů na akceptorovou molekulu cytochromu P450 či cytochromu c [Stiborová et al., 2004].

NADPH:CYP reductasa s cytochromem P450 interaguje především prostřednictvím elektrostatických sil. Pozitivně nabitý povrch cytochromu P450 (lysin, arginin) interaguje s negativně nabitým povrchem NADPH:CYP reductasy (aspartát, glutamát). Mezi nepolárními aminokyselinami (leucin, tryptofan, valin) v oblasti membránových domén NADPH:CYP reductasy a cytochromu P450 se také uplatňují hydrofobní interakce [Wang et al., 1997].

Mikrosomální elektronový transportní systém je založen na dvou složkách, a to NADPH:CYP reductase a cytochromech P450. Flavin s nízkým potenciálem (FAD) přijímá elektrony z NADPH, zatímco flavin s vysokým potenciálem (FMN) působí jako jednoelektronový přenašeč z NADPH na ion železa v prosthetické hemové skupině cytochromu P450, ve kterém $\text{FMNH}\cdot/\text{FMNH}_2$ pár předá elektrony cytochromu P450 za stálého oxidoredukčního potenciálu [Iyanagi, 2005] (Obr. 8). V průběhu těchto přenosů elektronů NADPH:CYP reductasa podstoupí rozsáhlé změny konformace. Nedávné studie poskytly přímý experimentální důkaz, že NADPH:CYP reductasa existuje v rovnováze mezi dvěma konformačními stavy označovanými jako „otevřená“ a „uzavřená“ (Obr. 9). Otevřená struktura je optimální pro „FMN-hemovým“ elektronový transport, zatímco uzavřená struktura je kompatibilní s „FAD-FMN“ elektronovým přenosem [Laursen et al., 2011].



Obr. 8: Schéma přenosu elektronů mezi flaviny NADPH:CYP reductasy (upraveno podle www.uky.edu).



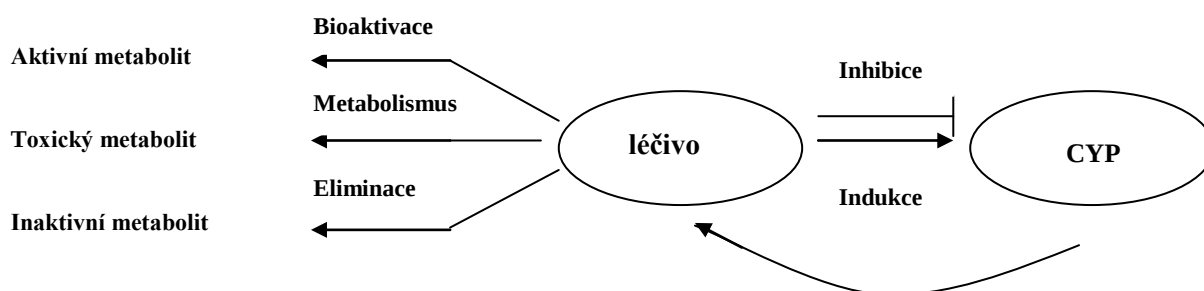
Obr. 9: Model NADPH:CYP reductasy v otevřené (vlevo) a uzavřené (vpravo) konformaci v lipidové dvojvrstvě. Doména vázající FMN je značena modře, spojující doména fialově, doména vázající FAD a NADPH zeleně, FMN koenzym žlutě, FAD koenzym oranžově a NADPH koenzym modře. Převzato z <http://ars.els-cdn.com/>.

1.5.2.2. Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) tvoří superrodinu hemthiolátových enzymů, které hrají klíčovou roli v metabolismu xenobiotik (Obr. 10). Cytochromy P450 jsou součástí **mikrosomálního monooxygenasového systému**, kde fungují jako terminální oxidasy. V organismu cytochromy P450 katalyzují řadu oxidační, peroxidační a redukční reakcí při biotransformaci léčiv, environmentálních chemikálií či látek přírodních i endogenních [Stiborová et al., 1999].

Z evolučního hlediska lze cytochromy P450 považovat za velice staré hemoproteiny, které se objevily dříve než hemoglobin [Stiborová et al, 1999]. Cytochromy P450 se objevují jak u eukaryot, tak i u prokaryot. U bakterií bylo dodnes identifikováno 20 isoformů cytochromu P450 a u rostlin se na základě studií genomu druhu *Arabidopsis thaliana* odhaduje tento počet na více než 300 isoformů cytochromu P450. Tento vysoký počet je dán dvěma faktory, a to potřebou rostlin syntetizovat pigmenty a růstové hormony a syntézou rostlinných toxinů, které jsou důležité pro obranu rostliny [Anzenbacher&Anzenbacherová, 2001]. V lidském organismu se vyskytuje 57 isoformů cytochromů P450 (a 58 pseudogenů cytochromů P450, což jsou nefunkční kopie). Geny pro cytochromy P450 se nacházejí ve všech lidských chromosomech (mimo chromosomu Y) [Stiborová, 2005].

Lidské cytochromy P450 jsou klasifikovány do 17 rodin, z kterých jsou především tři zapojeny do metabolismu xenobiotik: CYP1, CYP2 a CYP3 (v menší míře také rodina CYP4). Ostatní rodiny se účastní biosynthesy steroidů, cholesterolu či žlučových kyselin, na metabolismu mastných kyselin, kyseliny arachidonové apod. [Stiborová, 2005].

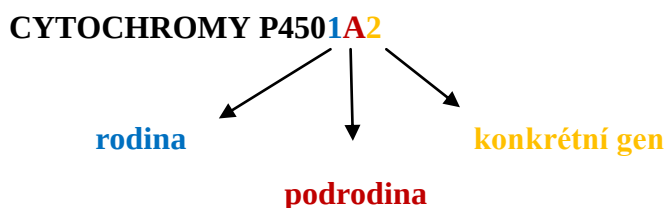


Obr. 10: Cytochromy P450 mohou léčivo metabolizovat na biologicky účinnější metabolit (bioaktivace), nebo na hydrofilnější metabolit, který je tak snadněji vyloučen z organismu (eliminace) či na toxický metabolit. Léčivo může inhibovat či indukovat cytochromy P450 během léčby (upraveno podle [Purnapatre et al., 2008]).

1.5.2.2.1. Názvosloví cytochromů P450

Písmeno P v názvu cytochromu P450 označuje pigment a číslice 450 označuje absorpční maximum při 450 nm, které vykazuje cytochrom P450 po redukci a vazbě s CO [Coon et al., 1992; Anzenbacher&Anzenbacherová, 2001]. Dnes je známo přes 1000 isoformů cytochromu P450, které jsou na základě podobnosti aminokyselinové sekvence rozděleny do rodin (cytochromy P450, které mají sekvenční identičnost větší než 40%) a podrodin (cytochromy P450, které jsou identické více než z 60%) [Coon et al., 1992; Stiborová et al., 1999; Anzenbacher&Anzenbacherová, 2001; Chromá et al., 2001].

Pro cytochromy P450 podle Neberta a spolupracovníků byla zavedena zkratka **CYP** (CYtochrome P450). První číslo, které pak následuje za zkratkou CYP, označuje rodinu, následuje velké písmeno pro podrodinu a poslední číslo označuje konkrétní cytochrom P450 (gen), (Obr. 11). Pro geny cytochromů P450 se používá stejné značení jako u enzymů, ale píše se kurzívou, např. *CYP1A1*. [Nebert et al., 1989].



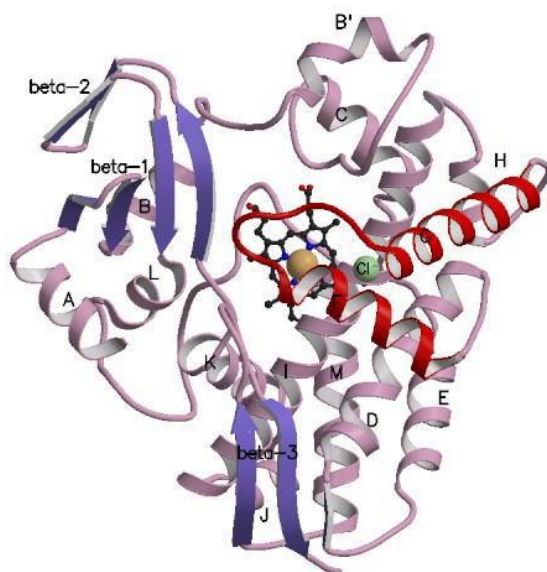
Obr. 11: Současná nomenklatura cytochromů P450 zavedená v roce 1996 Nebertem a spolupracovníky. [Nebert et al., 1989]

1.5.2.2.2. Struktura, výskyt a funkce cytochromů P450

Jak bylo výše uvedeno, cytochromy P450 (3D struktura cytochromu P450 119 zobrazena na Obr. 12, str. 31) tvoří superrodinu hemových enzymů. Tyto enzymy mají ve své molekule nekovalentně navázán protoporfyrin IX. V porfyrinovém kruhu je ion železa vázán čtyřmi ligandy. Pátým ligandem železa je thiolátová síra sulfhydrylové skupiny cysteinu, který je součástí molekuly enzymu. V klidovém stavu může být šestým ligandem cytochromu P450 také kyslík molekuly vody [Gut et al., 1992; Stiborová et al., 1999]. Díky tomuto uspořádání získává cytochrom P450 výjimečné vlastnosti, a tím se odlišuje klasických cytochromů (protoporfyrin IX vázán prostřednictvím imidazolového zbytku histidinu) [Voet et al., 1995].

Cytochromy P450 jsou v eukaryotických buňkách vázány v membráně endoplasmatického retikula, ev. mitochondrií, prostřednictvím transmembránového N-

terminálního α -helixu [Edwards et al., 1991], zatímco cytochromy P450 v prokaryotických buňkách jsou enzymy rozpustné.



Obr. 12: 3D struktura cytochrom P450 119. Převzato z <http://www.med.kagawa-u.ac.jp>

V lidském těle se cytochromy P450 se nacházejí ve všech tkáních (mimo svalů a erytrocytů), nejvíce se však vyskytují především v játrech, kde probíhá většina biotransformačních reakcí. V menší míře jsou také zastoupeny v plicích, ledvinách, kůži, tenkém střevě, mozku a v nadledvinkách. [Stiborová et al., 1999]. U člověka byly dosud nalezené cytochromy P450 klasifikovány do 18 rodin, z kterých jsou zejména tři zapojeny do metabolismu léčiv, resp. xenobiotik: **CYP1, CYP2 a CYP3** (v menší míře také rodina CYP4). Ostatní rodiny se účastní biosynthesy steroidů, cholesterolu či žlučových kyselin, na metabolismu mastných kyselin, kyseliny arachidonové apod. [Stiborová, 2005].

Většina xenobiotik je v lidském organismu metabolizována jaterními cytochromy P450 1A2, 2A6, 2D6, 2C (8, 9, 18, 19), 2E1 a 3A4. [Stiborová et al., 1999]. V jiných tkáních (plíce, ledviny, GIT, kůže aj.) se z hlediska metabolismu cizorodých látek především uplatňují cytochromy P450 1A1, 2B6, 2E1 a 3A4. [Stiborová et al., 1999]

Množství těchto cytochromů P450 v jednotlivých tkáních nelze brát absolutně, jelikož jejich hladina je závislá na řadě faktorech jako je např. genetický polymorfismus, životní styl, věk, výživa, léčiva, vnější podmínky. Cytochromy P450 jsou enzymy jak konstitutivní, tak indukibilní. Procentuální zastoupení jednotlivých jaterních cytochromů P450 je uvedeno v následující tabulce (Tab. 2, str. 32) [Stiborová et al., 1999; Anzenbacher&Anzenbacherová, 2001].

Tab. 2: Zastoupení jednotlivých jaterních cytochromů P450 podílejících se na metabolismu cizorodých látek v lidském organismu. [Anzenbacher&Anzenbacherová, 2001; Stiborová et al., 1999]

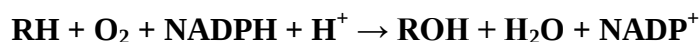
Cytochrom P450	% zastoupení jednotlivých cytochromů P 450
1A1	0,1 - 1
1A2	13
1B1	1
2A6	4
2B6	0,2
2C	18
2D6	2,5
2E1	7
3A4	30

1.5.2.2.3. Monooxygenasová reakce cytochromu P450

Cytochromy P450 působí v endoplasmatickém retikulu společně s **NADPH:CYP reduktasou**, a ev. s **cytochromem b₅** a s **NADH:cytochrom b₅ reduktasou**. Dohromady tak vytváří systém monooxygenas se smíšenou funkcí. Cytochromy P450 také působí v mitochondriích společně s jinými enzymy. Většina reakcí začíná přenosem elektronů z NADPH:

- a) na NADPH:CYP reduktasu v endoplasmatickém retikulu nebo
 - b) na ferredoxin reduktasu a nehemový Fe-S protein v mitochondriích
- a dále na vlastní cytochromy P450 [Gut et al., 1992, Stiborová et al., 1999].

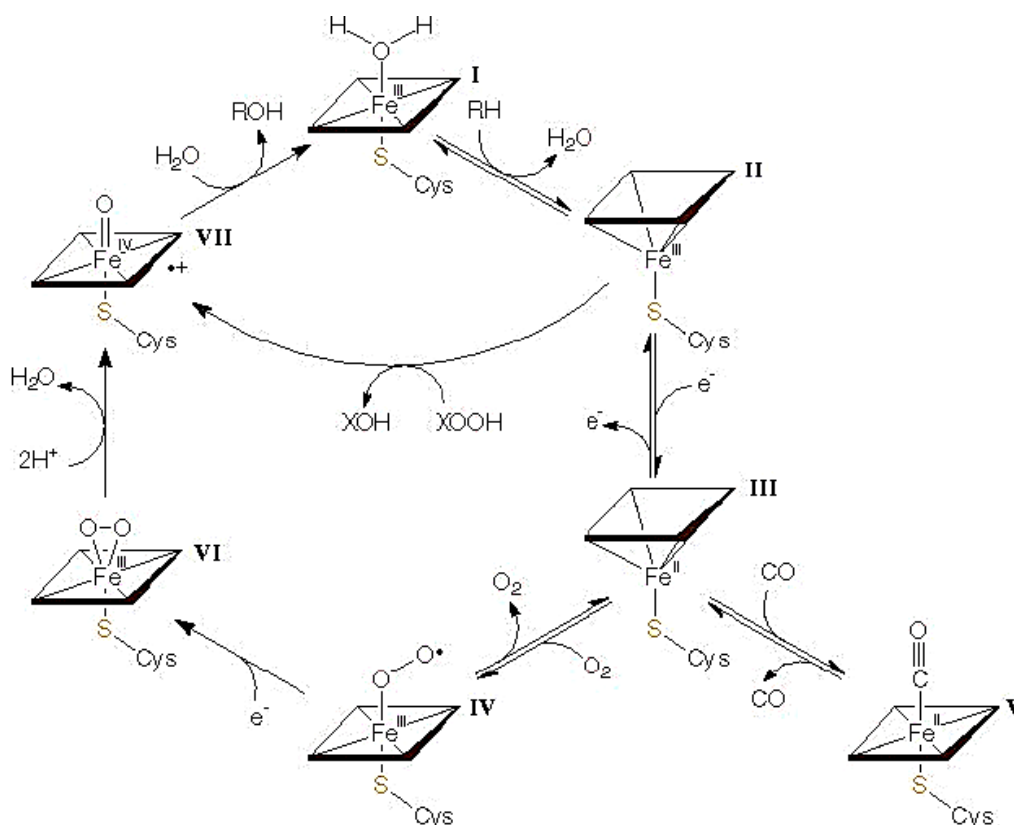
Většinu reakcí katalyzovaných MFO systémem lze vyjádřit rovnicí:



Redukovaný cytochrom P450 dále aktivuje molekulu kyslíku (tzv. oxidasová aktivita), z které je jeden atom zabudován do molekuly substrátu (tzv. oxygenasová aktivita) a druhý je redukován na vodu. Aktivace kyslíku je zprostředkována dvěma elektrony, které pocházejí z NADPH přenesené NADPH:CYP reduktasou, ale donorem druhého elektronu se může stát i NADH přenesený NADH:cytochrom b₅ reduktasou. Pro oxidační reakce může cytochrom P450 využívat vedle molekuly kyslíku i peroxidy a peroxykyseliny, které se tak stávají donorem atomu kyslíku [Coon et al., 1992; Stiborová et al., 1999; Anzenbacher et al., 2001; Chromá et al., 2001].

Reakční cyklus cytochromů P450 (Obr. 13, str. 34) probíhá uspořádaným mechanismem a skládá se z více kroků:

- I. **Klidový stav CYP.** V klidovém stavu je hemové železo ve ferri formě (oxidační číslo III) a je hexakoordinované (nizkospinový stav). Šestá valence je obsazena molekulou vody.
- II. **Vazba substrátu.** Po vstupu substrátu (RH) do aktivní části proteinu dochází k vytěsnění molekuly vody a železo se stává pentakoordinované (vysokospinový stav). Zároveň dochází ke konformační změně v molekule proteinu.
- III. **První redukce CYP.** Vazbou substrátu je umožněna jedoelektronová redukce cytochromu P450 prostřednictvím NADPH:CYP reduktasy, čímž dochází k redukci železa ferro formu (oxidační číslo II). Železo je stále pentakoordinované (vysokospinový stav). V této formě je pak enzym schopný vázat molekulární kyslík či jiné ligandy.
- IV. **Vazba molekuly kyslíku.** Navázáním molekulárního kyslíku se dále tvoří ternární ferrisuperoxidový komplex. Železo se stává opět hexakoordinované a v nizkospinové formě.
- V. **Vazba oxidu uhelnatého.** Vazba kyslíku na ferri formu může být inhibována v přítomnosti oxidu uhelnatého, který tvoří ternární ferrokomplex cytochrom P450-CO-RH.
- VI. **Druhá redukce CYP.** Vzniká nepříliš stabilní komplex, který je dále redukován NADPH:CYP, ev. NADH:cytochrom b_5 reduktasou, čímž dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion. Pokud není druhý elektron dodán dostatečně rychle, tak se komplex rozpadá na superoxidový anion-radikál.
- VII. **Štěpení vazby O-O v molekule kyslíku.** Komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku je po druhé redukci již zcela aktivní a dochází k heterolytickému štěpení vazby O-O. Jeden atom kyslíku je redukován a dochází k uvolnění vody. Druhý atom kyslíku zůstává vázán na železe hemu a dochází ke vzniku ferrioxenového komplexu, který je stabilizován posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Takto vzniklý kyslíkový radikál je schopný vytrhnout vodík z molekuly vhodného substrátu za současného vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na železe hemu. Vzniklé radikály rekombinují a dochází k uvolnění hydroxyderivátu substrátu (ROH) z cytochromu P450 za vzniku nativní formy enzymu [Stiborová et al., 2004a].



Obr. 13: Reakční cyklus cytochromu P450. Převzato z metallo.scripps.edu/promise

VII. Reakce ferro formy CYP s organickými peroxidy. V přítomnosti organických peroxidů může z komplexu III vznikat přímo stav VII. Takto aktivovaný cytochrom P450 je rovněž schopen katalyzovat hydroxylaci substrátů. Tato reakce bývá označována jako **peroxidasová aktivita CYP**. Reakce s organickými peroxidy probíhá neuspořádaným mechanismem, vazba peroxidu tedy není závislá na vazbě substrátu [Stiborová et al., 2004a].

1.5.2.3. Cytochrom b_5

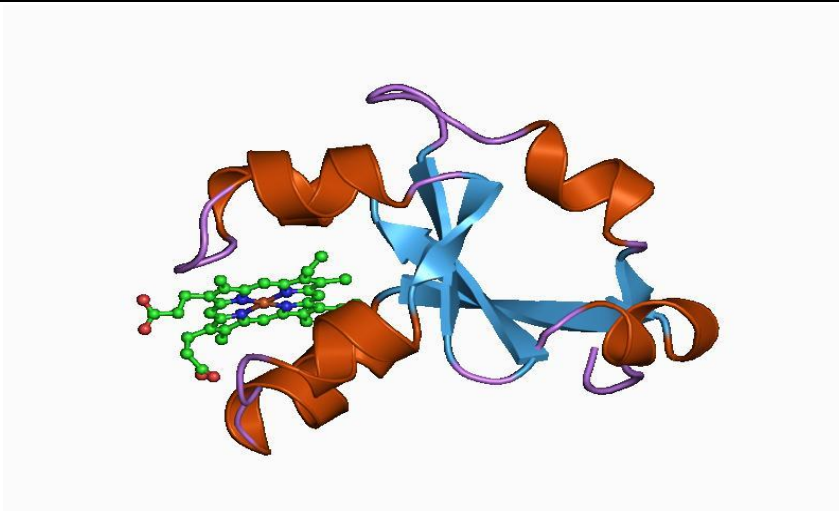
Cytochrom b_5 (cyt b_5) je hemový protein s molekulovou hmotností 17 000 Da [Porter et al, 2002], který je schopný přijímat a přenášet jeden elektron [Velick, 1956]. S evolučního hlediska se jedná o velmi starý hemoprotein, který se nalézá jak v živočišné a rostlinné říši, tak i v houbách [Vergeres, 1995]. Jeho primární struktura je velmi konzervovaná. Rozdílné savčí druhy vykazují přes 80% homologie v sekvenci cytosolické domény zodpovědné za vazbu hemu, zatímco C-terminální konec vykazuje mnohem větší heterogenitu [Schenkman&Jansson, 2003; Kotrbová et al. 2009].

Cytochrom b_5 se u savců vyskytuje ve třech isoformách, dvě isoformy jsou membránově vázané a třetí isoforma je rozpustná. Membránově vázané isoformy jsou lokalizované na vnější straně endoplasmatického retikula (mikrosomální cyt b_5) a mitochondrií. Volně rozpustná isoforma se nalézá v cytoplazmě zralých erytrocytů [Vergeres, 1995; Kotrbová et al. 2009].

1.5.2.3.1. Struktura cytochromu b_5

Cytochrom b_5 je malý, cylindrický membránový protein skládající se z šesti α -helixů a pěti β -skládaných listů [Schenkman&Jansson, 2003]. Protein tvoří dvě domény, větší hydrofilní N-terminální hemově vázané jádro a menší hydrofobní C-terminální konec, který ukotvuje protein k membráně. Hemové železo je umístěno mezi dva histidylové zbytky, které chrání železo před přímou interakcí s molekulárním kyslíkem. Domény jsou vzájemně spojeny flexibilními 15 aminokyselinami (zvláště prolin), které poskytují hemové doméně dostatečnou pohyblivost k vazbě s redoxními partnery, zatímco protein je dále pevně ukotven k membráně. Bylo prokázáno, že spojovací úsek musí být dlouhý alespoň 7 aminokyselin [Schenkman&Jansson, 2003; Kotrbová et al. 2009].

Struktura celého proteinu není dodnes rozluštěna, jelikož hydrofobní část proteinu se stala překážkou pro krystalizaci a rentgenovou difrakci [Kotrbová et al. 2009]. Struktura rozpustné domény cytochromu b_5 je znázorněna na Obr. 14, str. 36.



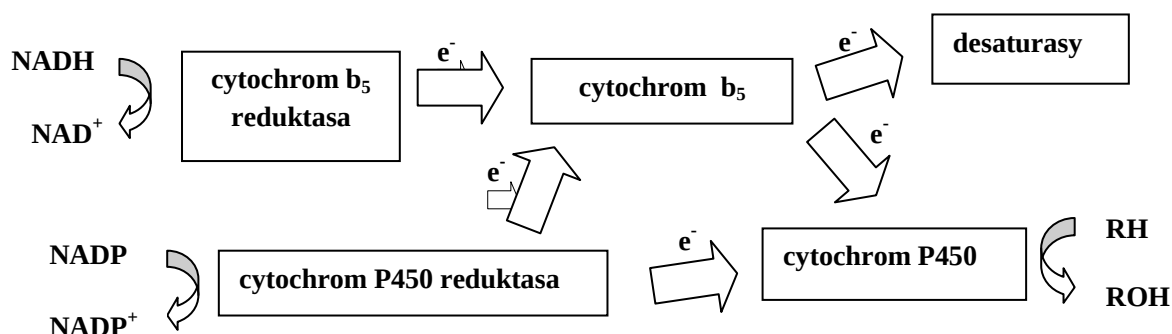
Obr. 14: 3D struktura rozpustné domény mikrosomálního cytochromu b_5 . Převzato z <http://en.wikipedia.org/>.

Interakce cytochromu b_5 s cytochromy P450 a jejich reduktasou je řízena elektrostatickou interakcí mezi skupinami z nabitých aminokyselinových zbytků, které se vyskytují v okolí hemu na povrchu proteinu.

1.5.2.3.2. Funkce cytochromu b_5

Rozpustný cytochrom b_5 vyskytující se v erytrocytech spolu s NADH:cytochrom b_5 reduktasou redukuje methemoglobin (Fe^{3+}) na funkční hemoglobin (Fe^{2+}), který je schopný vázat a přenášet kyslík.

Mikrosomální cytochrom b_5 se zapojuje jako elektronový přenašeč elektronů v řadě oxidačních reakcí v biologických tkáních [Schenkman&Jansson, 2003]. Účastní se desaturace mastných kyselin, biosynthesy cholesterolu a také se podílí na metabolismu xenobiotik za účasti MFO systému (Obr. 15). V MFO systému cytochrom b_5 může přijímat elektron buď z NADH:cytochrom b_5 reduktasy či z NADPH:CYP reduktasy, který dále přenáší k cytochromům P450 a k dalším enzymům [Kotrbová et al. 2009].



Obr. 15: Schematické zobrazení elektronového přenosu mezi cytochromy P450, cytochromem b_5 a jejich reduktasami. (upraveno podle [Kotrbová et al. 2009]).

Vliv cytochromu b_5 na reakce zprostředkované MFO systémem je stále předmětem studií. Bylo prokázáno, že cytochrom b_5 je schopen stimulovat, ale i inhibovat či vůbec neovlivňovat reakce zprostředkované cytochromy P450. Jeho efekt působení je závislý na řadě podmínek jako je použitý cytochrom P450, substráty reakce či experimentální podmínky [Kotrbová et al. 2009].

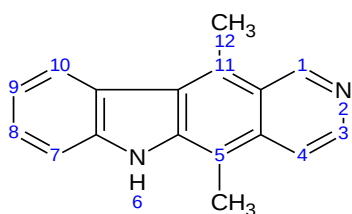
Mechanismus působení cytochromu b_5 se snaží vysvětlit několik hypotéz:

- Jedna z hypotéz vysvětluje roli cytochromu b_5 jako poskytovatele elektronu pro MFO systém. V monooxygenasové reakci cytochromu P450 se považuje přijetí druhého elektronu za rychlost limitující krok [Schenkman&Jansson, 2003]. Tento druhý elektron je potřebný k aktivaci molekulárního kyslíku navázaného na cytochrom P450. Pokud není druhý elektron přijat dostatečně rychle, dochází k rozpadu komplexu a místo oxidovaného substrátu se uvolňuje superoxidový anionradikál.
- Další hypotéza je založena na tvorbě komplexu mezi cytochromem P450 a cytochromem b_5 , který může přijmout v jediném kroku dva elektrony z NADPH:CYP reduktasy. Cytochrom P450 přijme první elektron a předá ho na cytochrom b_5 , čímž může cytochrom P450 okamžitě přijmout druhý elektron od NADPH:CYP reduktasy [Schenkman&Jansson, 2003].
- Další hypotéza předpokládá, že cytochrom b_5 snižuje četnost rozpojení komplexu se superoxidovým anionradikálem, funguje tedy jako pozitivní modifikátor monooxygenas. Cytochrom b_5 poskytuje druhý elektron s vyšší rychlostí, než s jakou dochází k uvolnění superoxidového anionradikálu [Schenkman&Jansson, 2003].
- Čtvrtá nejnovější hypotéza předpokládá, že cytochrom b_5 slouží jako efektor bez redoxní role v monooxygenasové reakci. Pro tuto hypotézu svědčí nové studie s apo-cytochromem b_5 (cytochrom b_5 neobsahující hem), který stimuluje některé cytochromy P450 stejně efektivně jako cytochrom b_5 . Cytochrom b_5 v takovém případě pravděpodobně usnadní tok elektronů přes systém nebo posiluje rozklad oxygenovaného hemoproteinu na produkty [Schenkman&Jansson, 2003].

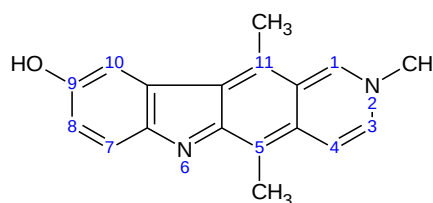
1.6. Protinádorové léčivo ellipticin

Ellipticin (5,11-dimethyl-6H-pyridol[4,3-b]karbazol, Obr. 16) a některé jeho polárnější deriváty (9-hydroxyellipticin, 9-chloro-*N*²-methylellipticinium, 9-hydroxy-*N*²-methylellipticinium, 9-methoxy-*N*²-methylellipticinium a 9-dimethyl-amino-ethoxy-ellipticin) jsou sloučeniny vyznačující se výraznou protinádorovou aktivitu a aktivitou proti HIV [Rouësse et al., 1985; Mathé et al., 1998, Stiborová et al., 2011].

Ellipticin a jeho deriváty 9-hydroxyellipticin a 2-methyl-9-hydroxyellipticin (Obr. 17) jsou ve formě acetátu využívány zejména k terapii pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázemi, sarkomů ledvin, karcinomu štítné žlázy a akutní myeloblastické leukémie [Klener, 1996; Stiborová et al., 2011].



Obr. 16: Struktura ellipticinu



Obr. 17: Struktura 2-methyl-9 hydroxyellipticinu

1.6.1. Původ ellipticinu

Ellipticin, alkaloid z rostlin čeledi *Apocynaceae* (tj. *Ochrosia borbonica*, *Excavatia coccinea*), byl poprvé izolován v r. 1959 z listů stále zeleného, malého, tropického stromu *Ochrosia borbonica* (Obr. 18), který se vyskytuje na mnoha ostrovech v Tichém oceánu [Goodwin et al., 1959, Stiborová et al., 2011]. Byl jedním z prvních objevených přírodních alkaloidů mající planární strukturu [Goodwin et al., 1959].



Obr. 18 : *Ochrosia borbonica* (květ). Převzato z <http://wikimedia.org/>.

1.6.2. Vedlejší účinky ellipticinu a jeho derivátů

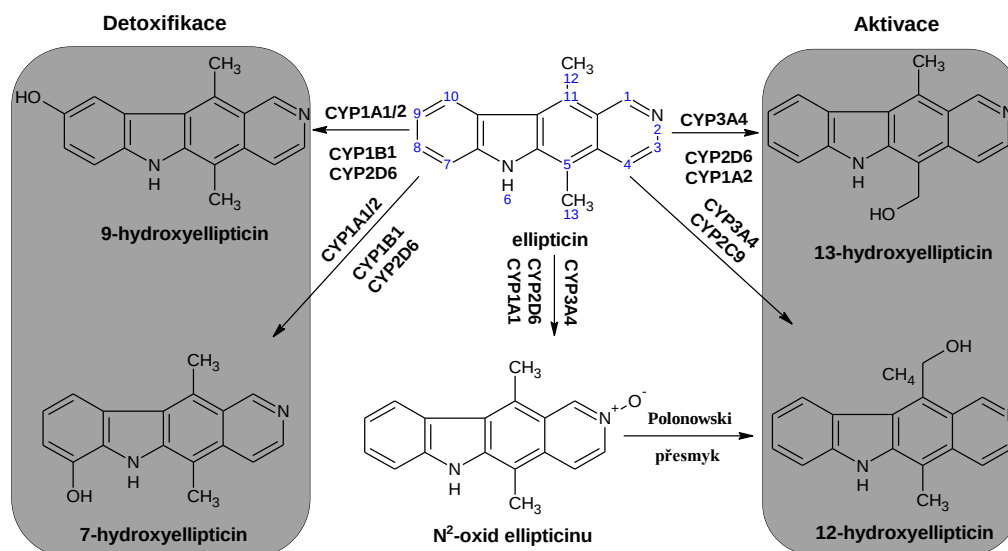
Hlavními důvody zájmu o klinické využití ellipticinu a jeho derivátů jsou jejich vysoká protinádorová účinnost, relativně nízké vedlejší účinky a prakticky nulová hematologická a hepatologická toxicita [Auclair, 1987]. Poměrně vzácně se vyskytuje nefrotoxicita, která je svým mechanismem vzniku podobná nefrotoxicitě cis-platiny [Juret et al., 1979; Klener, 1996; Stiborová et al., 2011].

Nejčastějšími zaznamenanými vedlejšími účinky při léčbě ellipticiny byly zažívací potíže (nevolnost a zvracení se objevilo u 1/3 pacientů), hypertenze (u méně než 10% pacientů), svalové křeče (1/3 pacientů), únava (u většiny pacientů po 3 měsících léčby), sucho v ústech a mykózy jazyka a jícnu (u méně než 20% pacientů) [Juret et al., 1979; Paoletti et al., 1980; Stiborová et al., 2011].

Nutné je i zmínit skutečnost, že ellipticin je i mutagen. Nejvíce je ellipticin mutagenní ke kmenům *Salmonella typhimurium*, *Neurospora crassa*, dále k bakteriofágům T4 a k savčím buňkám. Ellipticin také indukuje profága lambda v *Escherchia coli* [Stiborová et al., 2001, Stiborová et al., 2011].

1.6.3. Biotransformace ellipticinu

Ellipticin je v organismu biotransformován cytochromy P450 až pět metabolitů: **7-hydroxyellipticin, 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu** (Obr. 19, str. 40). Z těchto metabolitů jsou 7-hydroxyellipticin a 9-hydroxyellipticin považovány za detoxikační produkty oxidace ellipticinu, neboť jsou vylučovány z organismu, zatímco 12-hydroxyellipticin a 13-hydroxyellipticin jsou aktivační produkty oxidace ellipticinu [Stiborová et al., 2004b; Stiborová et al., 2006a; Stiborová et al., 2011]. Jak je patrné z Obr. 19 (str. 40), další metabolit ellipticinu 12-hydroxyellipticin vzniká jak za přítomnosti biotransformujících enzymů tak i neenzymově, Polonowského přesmykem N^2 -oxidu ellipticinu [Stiborová et al., 2011].



Obr. 19: Metabolismus ellipticinu lidskými cytochromy P450 [Stiborová et al., 2011].

Mezi lidské cytochromy P450 oxidující ellipticin na aktivační metabolity patří CYP3A4, 1A2, 2C9 a 2D6 [Stiborová et al., 2004b; Stiborová et al., 2011], zatímco na detoxikaci participují enzymy CYP1A1, 1A2 a 1B1 [Stiborová et al., 2011].

Ellipticin je také velmi efektivně oxidován peroxidasami, které ho aktivují za tvorby aduktů s DNA totožnými s adukty nalezenými při oxidaci ellipticinu cytochromy P450. Peroxidasy metabolizují ellipticin jedoelektronovou oxidací, při které vznikají volné radikály, které v závislosti na prostředí tvoří buď ellipticinové dimery nebo adukty s DNA [Stiborová et al., 2007b; Stiborová et al., 2011].

1.6.4. Mechanismus účinku protinádorového léčiva ellipticinu

Ellipticiny působí jako silné protinádorové látky, které prostřednictvím kombinovaného mechanismu zástavy buněčného cyklu navozují buněčnou smrt. Přesný mechanismus účinku ellipticinu není však stále zcela přesně znám. Předpokládá se, že převládající mechanismy účinku jsou založeny na:

- **interkalaci ellipticinu do dvoušroubovicové struktury DNA** – Planární aromatická molekula ellipticinu se díky podobné velikosti a tvaru „vmezeří“ slabými reverzibilními interakcemi mezi purinové-pyrimidinové komplementární báze molekuly DNA, přičemž dochází k její stabilizaci, prodloužení, zpevnění konformace a částečnému rozvinutí [Auclair, 1987]. Interakce mezi methylovou skupinou ellipticinu a thyminem v interkalačním místě se jeví jako rozhodující pro

orientaci interkalace této sloučeniny do DNA [Chu&Hsu, 1992]. Ellipticin slouží jako modelová sloučenina v řadě studií řešících obecné principy interkalace, a to díky svým fluorescenčním vlastnostem [Stibor, 2009].

- **působení ellipticinu jako inhibitoru topoisomerasy II** – Ellipticin interaguje buď s proteinem topoisomerasy II nebo s molekulou DNA za vzniku ternárního komplexu. Vytvořený katalyticky inaktivní ternární komplex pak dále vede k tvorbě řetězových zlomů v DNA. Topoisomerasa II je považována za primární buněčný cíl ellipticinu, ale mechanismus účinku ellipticinu jako jejího inhibitoru je však stále předmětem výzkumu [Auclair, 1987; Fossé et al., 1992].
- **selektivní inhibici fosforylace proteinu p53** – Ellipticin a 9-hydroxyellipticin způsobují selektivní inhibici fosforylace proteinu p53, tak že inhibují specifické cyklin-dependentní kinasy. Nahromadění defosforylovaného mutantního proteinu p53 pak může mít za následek indukci apoptosy [Ohashi et al., 1995].
- **inhibici oxidační fosforylace** – Ellipticin inhibuje mitochondriální oxidační fosforylaci, což vede k narušení energetické rovnováhy v buňkách (snížení obsahu ATP v buňkách), které vede k jejich zániku [Schwaller et al., 1995]. Studie mechanismu cytotoxické a protinádorové aktivity naznačují, že tyto aktivity by mohly být založeny na indukci stresu endoplasmatického retikula [Hägg et al., 2004].
- **inhibici telomeras** – Ellipticin působí také jako inhibitor telomeras [Auclair, 1987].

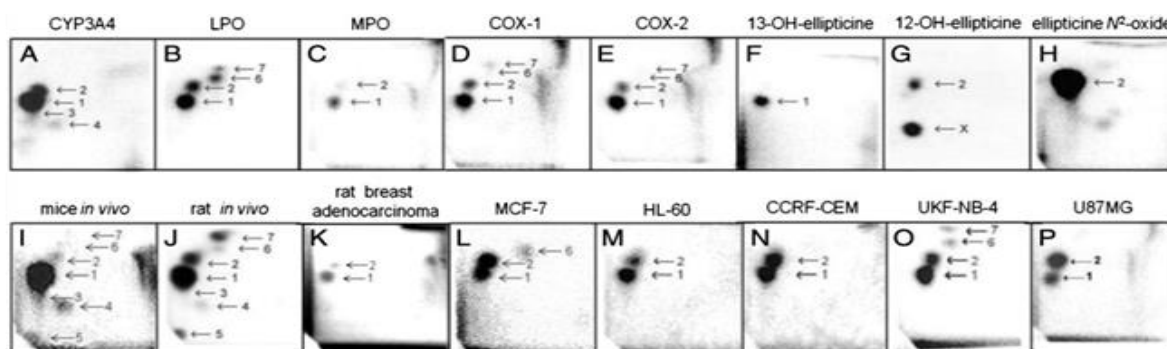
Všechny uvedené mechanismy účinku ellipticinu jsou založeny zejména na nespecifickém působení, což je však v rozporu s poměrně úzkou specifitou vůči nádorovým buňkám. Je tudíž vysoce pravděpodobné, že specifické působení musí vycházet ještě z jiných dosud nediskutovaných principů. Jedním z vysvětlení dané skutečnosti může být rozličná enzymová výbava lidského organismu, který se může lišit v enzymech nutných pro biotransformaci ellipticinu.

- **tvorba kovalentních aduktů metabolitů ellipticinu s DNA** – Ellipticin se po enzymové aktivaci cytochromy P450 a/nebo peroxidasami kovalentně váže na DNA *in vitro* a *in vivo* a vytváří tak adukty s DNA [Stiborová et al., 2001; Stiborová et al., 2006a; Stiborová et al. 2011].

1.6.5. Tvorba aduktů ellipticinu s DNA

Ellipticin se v průběhu biotransformace oxiduje na aktivní metabolity, které se kovalentně váží na DNA a vytvářejí tak adukty s DNA. Tato skutečnost byla potvrzena pomocí dvou nezávislých metod: metodou „ ^{32}P -postlabeling” a použitím $[^3\text{H}]$ ellipticinu. Tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA byla detekovaná *in vitro*, ale i *in vivo* v DNA izolované v různých tkáních potkana a myši [Stiborová et al., 2001; Stiborová et al., 2003; Stiborová et al., 2007a; Stiborová et al., 2007b, Stiborová et al., 2008; Stiborová et al., 2011].

Tyto adukty byly dále nalezeny v řadě nádorových buněk, a to v leukemických buňkách (HL-60, Obr. 20 M), v buněčných liniích lidského prsního adenokarcinomu (MCF-7, Obr. 20L) [Bořek-Dohalská et al., 2004], v neuroblastomech (IMR-32, UKF-NB-3 a UKF-NB-4, Obr. 20 O) [Poljaková et al., 2009], v buňkách glioblastomu (U87MG, Obr. 20 P) [Martínková et al., 2009].



Obr. 20: Autoradiografie aduktů tvořených aktivovaným ellipticinem s DNA detekovaných metodou „ ^{32}P -postlabeling“. DNA inkubována s ellipticinem a s CYP3A4 (A), s hovězí LPO (B), s lidskou MPO (C), s ovčí COX-1 (D), s lidskou COX-2 (E). Dále jsou na obrázku ukázány adukty vzniklé z 13-hydroxyellipticinu (F), z 12-hydroxyellipticinu (G), z N^2 -oxidu ellipticinu (H), adukty v DNA jater myši (I), v DNA jater Wistar potkanů (J), v DNA buněk prsního adenokarcinomu potkanů Wistar (K), v DNA MCF-7 buněk prsního adenokarcinomu (L), v DNA leukemických buněk HL-60 (M), v DNA CCRF-CEM buněk (N), v DNA UKF-NB-4 buněk neuroblastomu (O) a v DNA U87MG buněk glioblastomu (P) [Stiborová et al., 2011].

Ve všech testovaných systémech byly zjištěny minimálně dva adukty ellipticinu s DNA, a to majoritní adukt a minoritní adukt. Vznik majoritního aduktu (**adukt 1**, skvrna 1 na Obr. 20) je závislý na přítomnosti aktivačních enzymů, zatímco minoritní adukt (**adukt 2**, skvrna 2 na Obr. 20) vzniká i bez jejich přítomnosti, pravděpodobně aktivací ellipticinu autooxidací. Metabolity ellipticinu zodpovědné za tvorbu těchto aduktů s DNA jsou 13-hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin, respektive N^2 -oxid ellipticinu,

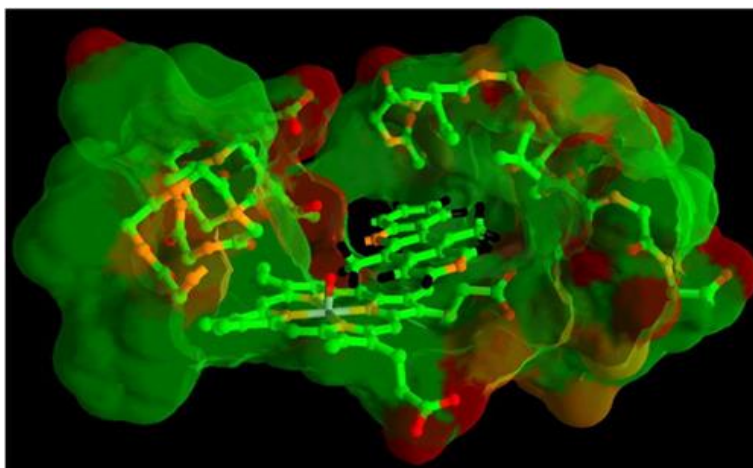
který přechází Polonowského přesmykem na 12-hydroxyellipticin. Majoritní adukt 1 vzniká vazbou 13-hydroxyellipticinu na DNA (Obr. 20 F, str. 42), zatímco minoritní adukt 2 vzniká vazbou 12-hydroxyellipticinu na DNA (Obr. 20 G, str. 42) [Stiborová et al., 2004b; Stiborová et al., 2007b; Stiborová et al., 2011].

O struktuře aduktů 1 a 2 je zatím známo pouze to, že jsou tvořeny výše zmíněnými metabolity ellipticinu, respektive dvěma jejich reaktivními karbeniovými ionty, **ellipticin-13-ylia** a **ellipticin-12-ylia** (Obr. 22, str. 42), které vznikají spontánním štěpením 13-hydroxyellipticinu a 12-hydroxyellipticinu [Stiborová et al., 2004b; Stiborová et al., 2007b; Stiborová 2011]. Cílovým deoxynukleotidem pro vazbu reaktivních metabolitů na DNA je deoxyguanosin. Jelikož tyto reaktivní metabolity jsou generovány cytochromy P450, lze předpokládat, že se také mohou vázat na aktivní místo cytochromů P450, a tím inaktivovat cytochromy P450 [Stiborová et al., 2001; Stiborová et al., 2004b; Stiborová et al., 2006b; Stiborová et al., 2011]. Tato skutečnost však není prokázána experimentálně.

1.6.6. Mechanismus oxidace ellipticinu

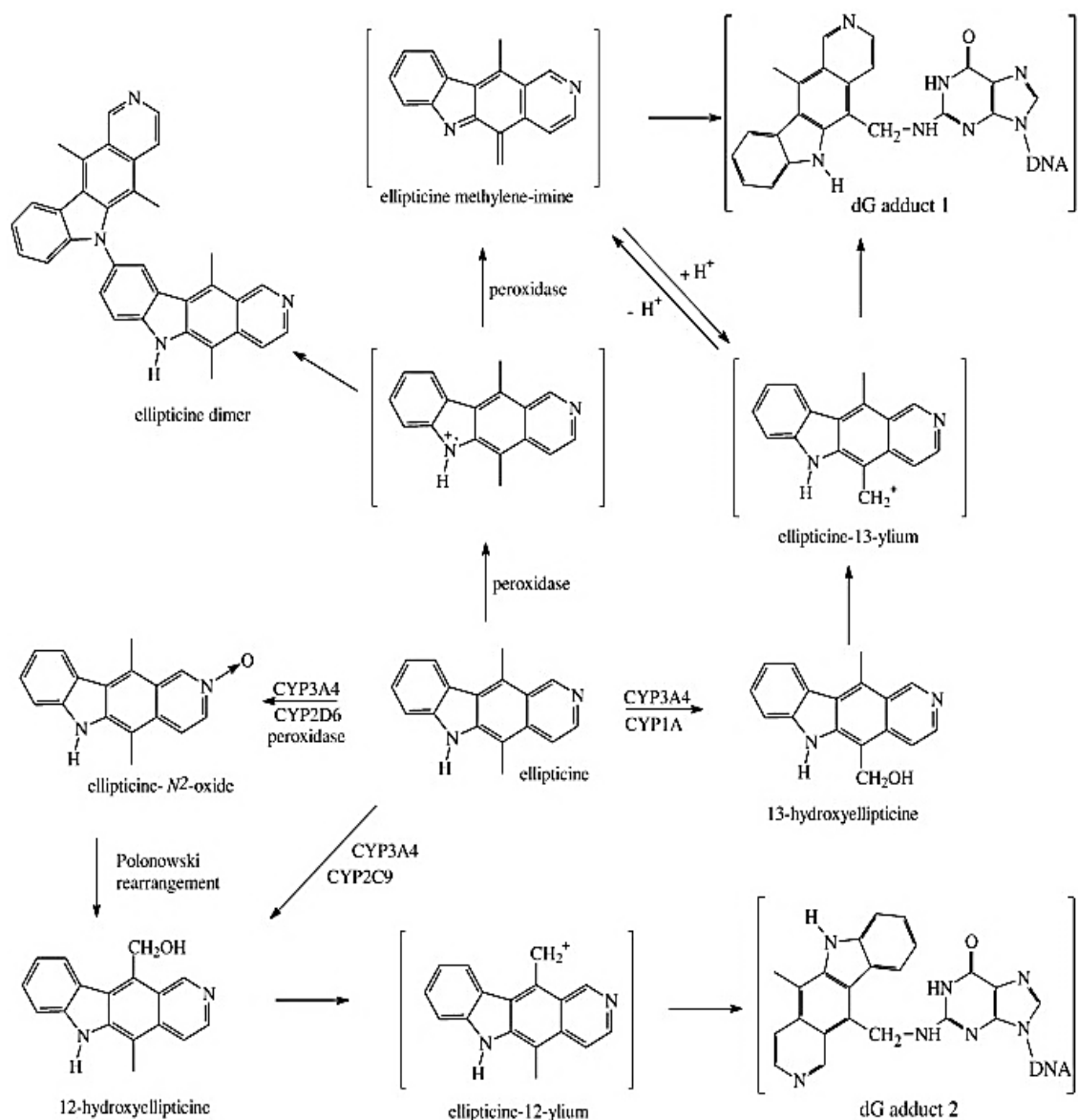
Tvorba jednotlivých metabolitů ellipticinu je katalyzována různými isoformami cytochromů P450 a peroxidas. Cytochromy P450 i peroxidasy jsou exprimovány v cílové nádorové tkáni, na kterou ellipticin působí. Ellipticin lze tedy považovat za „proléčivo“, jehož farmakologický účinek je závislý na jeho enzymové aktivaci v cílových tkáních [Stiborová et al., 2001; Stiborová et al., 2011].

Z lidských cytochromů P450 se na detoxikaci ellipticinu podílejí zejména isoformy CYP1A1, 1A2 a 1B1 a na aktivaci CYP3A4, 2C9, 2D6 a 1A2 [Chadwick et al., 1978; Stiborová et al., 2011]. Nejefektivnějšími enzymy oxidujícími ellipticin na aktivní metabolity vytvářející adukty s DNA se v podmínkách *in vivo* ukázaly být zejména CYP3A4 a CYP1A1. CYP3A4 se převážně vyskytuje v lidských jaterních mikrosomech (~30%) a proto je v játrech ellipticin oxidován převážně na 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu. Důležitost CYP3A4 pro tvorbu 13-hydroxyellipticinu byla potvrzena počítačovým modelováním (Obr. 21, str. 44) [Stiborová et al., 2010]. U potkana dochází k analogické aktivaci orthologními formami cytochromu P450 (CYP3A4, CYP1A1, CYP1A2), což prokazuje, že potkan může být vhodným modelem pro sledování osudu ellipticinu v lidském organismu *in vivo* [Stiborová et al., 2001; Stiborová et al., 2003; Stiborová et al., 2004b; Stiborová et al., 2006b; Stiborová et al., 2007b; Stiborová et al., 2011]. V organismu králíka se do aktivace zapojuje zejména CYP2C3 [Stiborová et al., 2003; Stiborová et al., 2011].



Obr. 21: Lidský CYP3A4 se zakotvenou molekulou ellipticinu v aktivním centru enzymu. [Stiborová 2011].

Ellipticin kromě cytochromů P450 oxidují také peroxidasy. Zatímco cytochromy P450 jsou exprimovány především v prsních a ledvinných nádorových, v jiných tkáních citlivých vůči ellipticinu je jejich množství mnohem nižší. Například ellipticin je cytotoxický vůči leukemickým buňkám HL-60 (adukty ellipticinu s DNA jsou znázorněny na Obr. 20M, str. 42) a pro leukemické T-buňky CCRF-CEM (adukty ellipticinu s DNA jsou znázorněny na Obr. 20N, str. 42), ačkoliv množství cytochromů P450 exprimovaných v těchto buňkách je nízké [Poljaková et al., 2007]. Citlivost vůči ellipticinu se dá vysvětlit přítomností peroxidas, které jsou exprimovány v těchto maligních tkáních. Mezi peroxidasy, které oxidují ellipticin patří lidská myeloperoxidasa (MPO), hovězí laktoperoxidasa (LPO), ovčí cyklooxygenasa (COX-1), lidská cyklooxygenasa (COX-2) a křenová peroxidasa (HPR) [Stiborová et al., 2007a; Stiborová et al. 2010]. Tyto peroxidasy oxidují ellipticin na reaktivní metabolity, které se kovalentně váží na DNA. Aduky s DNA, které jsou generované tímto způsobem, jsou totožné s těmi, které vznikají z aktivních metabolitů tvořených cytochromy P450 (Obr. 22, str. 45) [Stiborová et al., 2007a; Stiborová et al. 2010].



Obr. 22: Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 a peroxidasami na metabolity, které tvoří adukty s DNA. Sloučeniny v závorkách nebyly doposud experimentálně dokázány [Stiborová et al., 2011].

2. Cíl práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo srovnání aktivity lidských cytochromů P450 2C9, 2C19 a 2D6 exprimovaných v eukaryotním a dvou prokaryotních systémech (lišící se hladinou „koexprimované“ NADPH:CYP reductasy) oxidovat xenobiotika. Eukaryotní systém představoval mikrosomy hmyzích buněk transfekovaných *baculovirem* s cDNA lidských cytochromů P450 2C9, 2C19 a 2D6 a NADPH:CYP reductasy (SupersomesTM). Jako prokaryotní systém byla použita membránová frakce buněk *E. coli* transfekovaných cDNA stejných lidských enzymů a NADPH:CYP reductasy (Bactosomes). Cílem práce bylo rovněž porovnat účinnost těchto systémů v závislosti na přítomnosti cytochromu b₅, fakultativní složky monooxygenasového systému. Jako modelové xenobiotikum byl pro tuto práci vybrán protinádorový alkaloid ellipticin. V rámci práce byl také sledován vliv přídavku izolované NADPH:CYP reductasy na oxidaci ellipticinu lidskými cytochromy P450 2D6 a 3A4 exprimovanými v prokaryotním systému s nižší hladinou reductasy.

3. Materiál a metody

3.1. Chemikálie a přístroje

3.1.1. Použité chemikálie

Materiál a chemikálie, které byly použity při vypracování této diplomové práce, pocházejí z následujících zdrojů:

Fluka, Švýcarsko: akrylamid, Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB), dilauroylfosfatidylcholin (DLPC), dodecylsulfát sodný (SDS), methanol, ethylacetát, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), α -tokoferol (vitamín E), protaminsulfát, fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), triethylamin (TEA), persíran amonný (APS)

Lachema Brno, Česká republika: pentahydrát síranu měďnatého, bromfenolová modř, disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA Na₂), dithioničitan sodný, kyselina octová, vinan sodný, glycerol, chlorid draselný, hydroxid sodný, hydroxid draselný, sacharóza, (di)hydrogenfosforečnan draselný, hydrogenuhličitan sodný, ethanol, dekahydrát uhličitanu sodného, dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, chlorid hořečnatý, tartarát sodný

Lach NER, Česká republika: methanol

Linde, Česká republika: kapalný dusík, dusík (g)

LobaFeinchemie, Rakousko: glutathion, tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)

KaoChemicals, Japonsko: Emulgen E-911

Merck, Německo: acetonitril, silikagel

Pharmacia, Švédsko: DEAE-Sepharosa CL-6B, 2'5'-ADP-Sepharosa

Pentachemicals, Česká republika: ethylacetát

Reanal Budapešť, Maďarsko: glukosa-6-fosfát, glycin

RocheDiagnostics, SRN: Complete Protease Inhibitor

Serva Heidelberg, Německo: glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin (TEMED), triton-X-100

Sevapharma, a.s., Česká republika: hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma, USA: glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, glukosa-6-fosfát Na₂, dimethylsulfoxid (DMSO), NP-10 (tergitol), 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukovaný (NADPH), sodná sůl 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonové kyseliny (HEPES), 1-heptansulfonová kyselina, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonium]-1-propansulfonát (CHAPS), ellipticin, cytochrom c, standardy pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu v prostředí SDS „Widerange“, ethylacetát, dithiothreitol (DTT), fenacetin

BD Biosciences Company, GENTEST, USA:

CYP2C9 + NADPH:CYP reductasa SupersomesTM

CYP2C19 + NADPH:CYP reductasa SupersomesTM

CYP2D6 + NADPH:CYP reductasa SupersomesTM

CYP2C9 + NADPH:CYP reductasa + cytochrom b₅ SupersomesTM

CYP2C19 + NADPH:CYP reductasa + cytochrom b₅ SupersomesTM

CYP2D6 + NADPH:CYP reductasa + cytochrom b₅ SupersomesTM

CYPEX, UK:

CYP2C9HR + NADPH:CYP reductasa Bactosomes (high reductase)

CYP2C9HR + NADPH:CYP reductasa + cytochrom b₅ Bactosomes (high reductase with cyt b₅)

CYP2D6R + NADPH:CYP reductasa Bactosomes (high reductase)

CYP2D6R + NADPH:CYP reductasa + cytochrom b₅ Bactosomes (high reductase with cyt b₅)

CYP3A4R + NADPH:CYP reductasa Bactosomes (high reductase)

CYP3A4R + NADPH:CYP reductasa + cytochrom b₅ Bactosomes (high reductase with cyt b₅)

CYP2C9R + NADPH:CYP reductasa Bactosomes (low reductase)

CYP2C9R + NADPH:CYP reductasa + cytochrom b₅ Bactosomes (low reductase with cyt b₅)

CYP2D6LR + NADPH:CYP reductasa Bactosomes (low reductase)

CYP2D6LR + NADPH:CYP reductasa + cytochrom b₅ Bactosomes (low reductase with cyt b₅)

CYP3A4LR + NADPH:CYP reductasa Bactosomes (low reductase)

CYP3A4LR + NADPH:CYP reduktasa + cytochrom b₅ Bactosomes (low reductase with cyt b₅)

Pro lepší přehlednost byly ve výsledcích lidské cytochromy 2C9 exprimované v prokaryotním systému značeny:

CYP2C9R (high reductase)

CYP2C9LR (low reductase)

3.1.2. Použité pufrы a další roztoky

Roztoky pro stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny

Roztok A – 0,4 % NaOH (w/v), 0,95 % NaHCO₃ (w/v), 2 % Na₂CO₃·H₂O (w/v), 0,16 % vinan sodný (w/v), pH 11,25

Roztok B – 4 % CuSO₄·5 H₂O (w/v)

Pufr pro stanovení koncentrace CPR – 300 mM KH₂PO₄/KOH, 1 mM EDTA Na₂, pH 7,4

Roztoky pro SDS-PAGE

Vzorkový pufr (5 × koncentrovaný) – 0,25 M Tris/HCl, 0,5 M DTT, 10 % SDS (w/v), 0,5 % bromfenolová modř (w/v), 50 % glycerol (v/v)

Elektrodový pufr (5 × koncentrovaný) – 0,1 M Tris/HCl, 1 M glycín, 0,5 % SDS (w/v), pH 8,5

Separační gel (8 %) – 2,3 ml vody, 1,3 ml 1,5 M Tris/HCl (pH = 8,8), 1,4 ml 29,5 % akrylamidu (w/v) s 0,8 % BIS (w/v), 50 µl 10 % SDS (w/v), 3 µl TEMED, 50 µl 10 % APS (w/v)

Separační gel (10 %) – 1,9 ml vody, 1,3 ml 1,5 M Tris/HCl (pH = 8,8), 1,7 ml 29,5 % akrylamidu (w/v) s 0,8 % BIS (w/v), 50 µl 10 % SDS (w/v), 2 µl TEMED, 50 µl 10 % APS (w/v)

„Zaostřovací“ gel (4 %) – 1,4 ml vody, 0,25 ml 1,0 M Tris/HCl (pH = 6,8), 0,33 ml 29,5 % akrylamidu (w/v) s 0,8 % BIS (w/v), 20 µl 10 % SDS (w/v), 2 µl TEMED, 20 µl 10 % APS (w/v)

Barvicí lázeň Coomassie BBR-250 – 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v), 45 % methanol (v/v), 10 % kyselina octová (v/v)

Odbarvovací roztok – 35 % ethanol (v/v), 10 % kyselina octová (v/v)

Pufry pro izolaci

Pufr PR1 (pufr pro izolaci mikrosomální frakce) – 153 mM KCl/KOH, 10 mM EDTA Na₂, 0,5 mM PMSF, 50 μM vitamin E, pH 7,5

Pufr PR2 (pufr pro izolaci mikrosomální frakce) – 100 mM KCl/HCl, 100 mM Na₄P₂O₇, 10 H₂O, 1 mM EDTA Na₂, pH 7,5

Pufr PR3 (pufr pro izolaci mikrosomální frakce) – 0,25 mM sacharosa/NaOH, 10 mM EDTA Na₂, 1 mM DTT, 250 μM vitamin E, 1 tableta proteasového Complete Inhibitoru/50 ml pufru, pH 7,5

Pufr PR4 (pufr pro solubilizaci) – 100 mM Tris/acetát, 100 mM KCl, 20 % glycerol (v/v), 1 mM DTT, pH 7,5

Pufr PR5 (ekvilibrační pufr pro DEAE-Sepharosu CL-6B) – 5 mM Tris/acetát, 1 mM EDTA Na₂, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % Emulgen-911 (w/v), pH 7,5

Pufr PR6 (dialyzační pufr) – 5 mM KH₂PO₄/KOH, 1 mM EDTA Na₂, 0,1 mM DTT, 10 % glycerol (v/v), 0,1 % Emulgen E-911 (w/v), pH 7,0

Pufr PR8 (triethylaminový dialyzační pufr) – 25 mM TEA/HCl, 1 mM DTT, 20 % glycerol, pH 7,4

Pufr AP1 (cyklizační pufr pro DEAE-Sepharosu CL-6B) – 1 M Tris/HCl, pH 7,5

Pufr AP2 („nalévací“ pufr pro DEAE-Sepharosu CL-6B) – 5 mM Tris/acetát, 20 % glycerol (v/v), pH 7,5

Pufr CP1 (ekvilibrační pufr pro 2',5'-ADP-Sepharosu 4B) – 50 mM KH₂PO₄/KOH, 1 mM EDTA Na₂, 0,1 mM DTT, 20 % glycerol (v/v), 0,2 % Emulgen E-911 (w/v), pH 7,0

Pufr CP2 (eluční pufr CPR pro 2',5'-ADP-Sepharosu 4B) – 50 mM KH₂PO₄/KOH, 0,2 M KCl, 1 mM EDTA Na₂, 0,1 mM DTT, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % Emulgen E-911 (w/v), těsně před použitím 0,5 mM NADPH, pH 7,5

3.1.3. Použité přístroje

Centrifugy:	ultracentrifuga Beckman Optima LE 80K, Janetzki K-23, Centrifuge 5418 (Eppendorf)
Spektrofotometry:	Specord M-40 (Carl Zeiss)
Systém HPLC:	Dionex: P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S, kolona Ultrasphere, ODS, C18, 250 x 4,6 mM, 5 μ m, Beckman (USA), program: CHROMELEON TM 6.01
Váhy:	analytické váhy 40SM-200A (PESA), předvážky EW600-2M (KERN)
Ostatní:	Aparatura pro SDS-PAGE (Hoeffer SE 260), homogenizátor podle Pottera a Elvehjema, kolona MicroTrap C18 (Michrom Bioresources), sběrače frakcí (Fraction Collector FCC-60, BioLogic BioFrac Fraction Collector), pH-metr (ATI Orion370), sonikační lázeň (P-Lab, Ultrasonic compact cleaner), termostat (Eppendorf), Thermomixer Comfort (Eppendorf), ultrafiltrační cela (Amicon), vakuová odparka CentriVap Concentrator (Labconco).

3.2. Analytické metody

3.2.1. Stanovení koncentrace proteinu metodou BCA (bicinchoninové kyseliny)

Koncentrace proteinů byla určována metodou podle Wiechelmana a spol. [Wiechelman et al. 1988], ve které se využívá schopnosti postranních skupin některých aminokyselin redukovat měďnaté ionty přidané do roztoku ve formě vinanu měďnatého na ionty měďné. Kyselina bicinchoninová (BCA) tvoří v alkalickém prostředí s měďnými ionty modro-fialové komplexy, které se dají stanovit spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci bílkoviny v roztoku.

Činidlo potřebné pro stanovení koncentrace proteinu bylo těsně před použitím připraveno rozpuštěním BCA ve 49 dílech roztoku A (0,4 % NaOH, 0,95 % NaHCO₃, 2 % Na₂CO₃, 0,16 %, tartarát sodný; pH 11,25) tak, aby výsledná koncentrace byla 1 % BCA v 50 dílech. Po rozpuštění BCA byl přidán 1 díl roztoku B (4 % CuSO₄·5H₂O v destilované vodě) Do mikrozku mávek dle Eppendorfa bylo pipetováno 20 μ l destilované vody (slepý vzorek)/ roztoku standardu/ stanovovaného vzorku a bylo přidáno 980 μ l činidla. Pro sestavení kalibrační křivky byl použit standard hovězí sérový albumín (BSA) o

koncentracích: 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0. Vzorky byly inkubovány 30 minut při 60°C. Po zchlazení byly vzorky centrifugovány a byla v nich měřena absorbance při 562 nm proti „slepému“ vzorku. Od naměřených hodnot absorbancí dvou paralelních měření byla odečtena absorbance slepého roztoku a ze získaných hodnot byla sestrojena kalibrační křivka, která dále sloužila k určení koncentrace proteinu ve stanovovaných vzorcích. Měření bylo provedeno na přístroji Spektrofotometr Specord M-40 v 1 ml skleněné kyvetě o optické dráze 1cm.

3.2.2. Stanovení aktivity NADPH:CYP reductasy

Aktivitu a specifickou aktivitu NADPH:CYP reductasy je možné stanovit měřením rychlosti redukce cytochromu c. Koncentraci cytochromu c lze vypočítat na základě známého absorpčního koeficientu při vlnové délce 550 nm.

Do křemenné kyvety bylo pipetováno 960 µl pufru a 10 µl cytochromu c o koncentraci 25 mg. ml⁻¹ a byla měřena absorbance při 550 nm. Poté bylo přidáno 10 µl vzorku (ředěného tak, aby směrnice byla lineární) a 20 µl 10 mM NADPH. Kyveta byla rychle zamíchána a po dobu 1 minuty byla měřena změna absorbance při 550 nm (spektrofotometr Specord M-40). Aktivita (a_{CPR}) a specifická aktivita (a_{sp,CPR}) NADPH:CYP reductasy byla vypočtena ze vzorce:

$$a_{CPR} = \Delta A_{550 \text{ nm}} \cdot l^{-1} \cdot \epsilon_{550 \text{ nm}}^{-1} \cdot t^{-1} \quad [\mu\text{mol cyt c. min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}],$$

$$a_{sp,CPR} = \Delta A_{550 \text{ nm}} \cdot l^{-1} \cdot \epsilon_{550 \text{ nm}}^{-1} \cdot t^{-1} \cdot C_b^{-1} \quad [\mu\text{mol cyt c. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}],$$

$\Delta A_{550 \text{ nm}}$ změna absorbance při 550 nm za dobu t,

l optická dráha kyvety (1cm),

$\epsilon_{550 \text{ nm}}$ molární absorpční koeficient při 550 nm (21 mmol⁻¹. dm³.cm⁻¹),

t doba měření (1 minuta),

C_b koncentrace proteinu (mg. ml⁻¹).

3.2.3. Diskontinuální elektroforéza SDS-PAGE

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) je metoda užívaná k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti a elektroforetické pohyblivosti. Metoda byla prováděna podle postupu popsaného v práci Laemmliho [Laemmli, 1970] za použití 4 % (w/v) „zaostřovacího“ gelu a 8 % (w/v) a 10 % (w/v) separačního gelu.

K 20 μ l vhodně zředěných vzorkům bylo přidáno 5 μ l 5 $\times$ koncentrovaného vzorkového pufru, výsledný roztok byl povařen ve vodní lázni po dobu 5 minut a nanesen Hamiltonovou stříkačkou do jamek gelu. Elektromigrace probíhala za konstantního napětí 80 V při průchodu zaostřovacím gelem a 120 V při průchodu separačním gelem.

Gely byly barveny v barvicí lázni roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250 po dobu 45 minut a následně byly odbarveny v odbarvovacím roztoku. Odbarvené gely byly uchovány v 1 % roztoku kyseliny octové (v/v) při 4°C.

3.3. Metody použité při izolaci NADPH:CYP reductasy

Purifikace enzymu probíhala postupně izolací mikrosomální frakce diferenční centrifugací a následným přečištěním pomocí chromatografických metod postupem popsaným v práci Doc. RNDr. Miroslava Šulce, Ph.D. [Šulc, 2002].

3.3.1. Isolace mikrosomální frakce

Dva samci králíka domácího byli narkotizováni oxidem uhličitým a usmrceni zlomením vazů. Vyjmutá játra o hmotnosti 100g a 80 g byla promyta 100 ml pufru PR1 a homogenizována ve 400 ml pufru PR1 homogenizátorem podle Pottera a Elvehjema.

Homogenáty byly centrifugovány 10 minut při 600 $\times$ g na centrifuze Janetzki K-23 (výkyvný rotor 4 $\times$ 70 ml, 2 000 rpm) chlazené na 4 °C. Pro zvýšení výtěžku byly sedimenty rehomogenizovány v pufru PR1 a znovu centrifugovány za předchozích podmínek. Supernatanty po obou centrifugacích byly spojeny, a dále centrifugovány 20 minut při 15 000 $\times$ g na centrifuze Janetzki K-24 (úhlový rotor 6 $\times$ 35 ml, 13 000 rpm) chlazené na 4 °C.

Získané supernatanty byly dále 65 minut centrifugovány při 105 000 $\times$ g na ultracentrifuze Beckman Optima LE 80K (úhlový rotor Ti45 6 $\times$ 60 ml, 45 000 rpm) chlazené na 4 °C. Sedimenty po centrifugaci byly rehomogenizovány ve 200 ml pufru PR2 a znovu centrifugovány za předchozích podmínek. Sedimenty byly resuspendovány v 50 ml

pufru PR3. Získané mikrosomální frakce byly před provedením solubilizace spojeny, zchlazeny v kapalném dusíku a uskladněny v hlubokomrazícím boxu při -80°C.

3.3.2. Solubilizace membránových proteinů

Mikrosomální frakce byla rozmrazena, ředěna puftrem PR4 na výslednou koncentraci 6 mg/ml a znovu homogenizována.

Získaná suspenze ředěná na celkový objem 360 ml byla míchána na ledu a po kapkách (rychlost 1 kapka/1 s) k ní bylo přidáváno 10 ml roztoku protaminsulfátu (15 mg/ml) a 7 tablet proteasového Complete inhibitoru (1 tbl/50 ml). Poté bylo hrdlo baňky překryto parafilmem a pod dusíkovou atmosférou bylo přikapáváno 21,5 ml 10 % cholátu sodného (w/v) a 10 % Emulgenu E-911 (w/v) rychlostí 1 kapka/3 s. Výsledná koncentrace každého detergentu byla 1 mg detergentu/mg proteinu. Směs byla ještě dalších 20 minut míchána. Nerozpustné podíly byly odděleny ultracentrifugací Beckman LE 80K ($105\,000 \times g$, 60 minut, 4°C).

Supernatant o celkovém objemu 415 ml byl aplikován na ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy CL-6B .

3.3.3. Chromatografické metody

3.3.3.1. Kapalinová ionexová chromatografie

Metoda je založena na coulombickém přitahování opačných nábojů. Stacionární fáze (ionex) má na svém povrchu chemické skupiny nesoucí kladný či záporný náboj. Ionexy dělíme podle náboje na **katexy** se skupinami nabitými záporně a přitahující kationty z roztoku a **anexy** nesoucí na povrchu kladný náboj a přitahující tak anionty. Pokud jsou v protékající mobilní fázi přítomné ionty opačného náboje nebo molekuly silně dipólové, jsou elektrostatickými silami vázány na povrchu stacionární fáze. K tomu, aby došlo k uvolnění zachycených látek z kolony, musí se změnit charakter elučního činidla. Používají se proto gradienty iontové síly nebo gradienty pH.

Obecně při ionexovém dělení směsi proteinů platí pravidlo, že protein se naváže na anex, je-li pH pufru vyšší než pI proteinu a na katex pokud pH pufru je nižší než pI proteinu.

Chromatografie na DEAE-Sepharosa CL-6B (pH 7,5)

Princip: Anexová kolona slouží k zachycení záporně nabitých molekul, tedy látek s pI nižším než je pH kolony. Nabitou skupinou je v tomto případě DEAE (diethylaminoethyl) nesoucí kladný náboj.

Příprava nosiče: DEAE-Sepharosa CL-6B (V=120 ml) byla před použitím promyta 3 × 350 ml destilované vody a rozmíchána v 200 ml cyklizačního pufru AP1, ve kterém byla při 4 °C ponechána přes noc. Druhý den byl nosič opět promyt 3 × 350 ml destilované vody a 350 ml pufru pro nalévání kolony AP2. Gel byl rozmíchán ve 150 ml pufru pro nalévání kolony AP2 a nalit do kolony. Po „usazení“ nosiče byla kolona ekvilibrována 600 ml pufru PR5 rychlostí 1,5 ml/min.

Postup: Supernatant byl po solubilizaci nanesen na kolonu DEAE-Sepharosy (2,5 x 40 cm, 120 ml, pH 7,5) puftrem PR5 rychlostí 0,5 ml/min. Zároveň byly postupně sbírány frakce o objemu 18 ml a byla v nich měřena absorbance při 417 nm a při 280 nm (spektrofotometr Specord M-40, Carl Zeiss). Po aplikaci vzorku byla kolona promývána puftrem PR5 s přídavkem Emulgenu E-911 o výsledné koncentraci 0,4 % (w/v) až do poklesu absorbancí na nulovou hodnotu.

Zachycené proteiny byly z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B eluovány lineárním gradientem 2 × 400 ml 0,0 – 0,4 M KCl v pufru PR5. Během této eluce byly sbírány frakce o objemu 10 ml. V těchto frakcích byla stanovována enzymová aktivita a SDS-PAGE. Na základě získaných výsledků byly vybírány a spojeny frakce obsahující NADPH:CYP reduktasu. Získaný roztok byl koncentrován ultrafiltrací (Amicon, membrána PM-30, Millipore) na 35 ml a dialyzován přes noc proti 2 × 1 000 ml pufru PR6. V dialyzovaných frakcích bylo pH upraveno na hodnotu 7,0 roztokem 1 M KH₂PO₄. Takto upravené frakce byly nanесeny na ekvilibrovanou kolonu 2', 5' ADP-Sepharosy 4B.

Regenerace nosiče: Po použití byl nosič čištěn postupným promýváním 1 x 250 ml 1 M KCl, 1 x 250 ml 1 M octanu sodného (pH 3,0), 1 x 250 ml destilované vody, 1 x 250 ml 0,5 M NaOH, 1 x 250 ml destilované vody, 1 x 250 ml 1 M octanu sodného (pH 3,0), 2 x 250 ml 20 % ethanolu (v/v). Poté byl nosič rozmíchán ve 200 ml 20 % ethanolu, převeden do polyethylenové lahvičky a skladován při 5°C.

3.3.3.2. Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je jedna z forem adsorpční chromatografie. Tato metoda je založena na specifických, reverzibilních interakcích. Jeden z partnerů se pevně chemicky naváže jako **ligand** na vhodný nosič a tvoří tak spolu s ním stacionární fázi. Druhý z partnerů je obsažen ve vzorku a za vhodných podmínek je na koloně specificky navázán na tento ligand. K disociaci tohoto komplexu je nutné změnit složení eluentu. Elučními činidly bývají nejčastěji pufrы o nízkém nebo naopak vysokém pH, které mění konformaci a případně i náboj izolované složky/ligandu, čímž dojde ke zrušení původních nevazebných interakcí a izolovaná složka je tak eluována mobilní fází ven z kolony.

Chromatografie na 2',5'-ADP-Sepharosa 4B (pH 7,0)

Princip: Afinitní kolona silně interaguje s NADP⁺-dependentními dehydrogenasami. Zachycenou NADPH:CYP reduktasu lze z kolony uvolnit pufrem o nízké koncentraci NADP⁺.

Příprava nosiče: Pro přípravu afinitní kolony 2',5'-ADP-Sepharosy pro chromatografii bylo „naváženo“ 2,5 g suchého nosiče (1 g/4 ml). Nosič byl promyt 2 × destilovanou vodou. Nakonec byl nosič rozmíchán v 10 ml destilované vody a nalit do chromatografické kolony (1,5 × 20 cm). Po sedimentaci byl nosič promyt nejprve 25 ml destilované vody a poté 50 ml ekvilibračního pufru CP1.

Postup: Na ekvilibrovanou kolonu 2',5'-ADP-Sepharosy byl nanesen vzorek získaný částečnou purifikací na DEAE-Sepharose, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 7,0. NADPH:CYP reduktasa se na kolonu 2',5'-ADP-Sepharosy selektivně navázala, zatímco kontaminanty byly odmyty 100 ml pufru CP1. NADPH:CYP reduktasa byla poté z kolony eluována 60 ml pufru CP2, který obsahoval 0,5 mM NADP⁺ (rychlost eluce 30 ml/hod). Pomocí automatického sběrače frakcí byly jímány eluované frakce o objemu 2 ml. V těchto frakcích byla měřena enzymová aktivita a SDS-PAGE. Frakce vykazující aktivitu byly spojeny a byl k nim přidán koenzym FMN v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,5 μM. Takto upravený preparát byl dialyzován přes noc při 6°C proti 2 × 1000 ml pufru PR8. Z finálního preparátu NADPH:CYP reduktasy byly analyticky charakterizovány a poté v malých 500 μl alikvotech uskladněny v hlubokomrazícím boxu při -80°C.

Regenerace nosiče: Po použití byl nosič čištěn postupně 25 ml roztoku o pH 8,5 (0,5 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl), 25 ml destilované vody, 25 ml roztoku o pH 4,5 (0,5 M octan sodný, 0,5 M NaCl) a nakonec opět 25 ml destilované vody. Celý tento postup byl opakován ještě jednou, pak byl nosič promyt 2 x 25 ml 20 % ethanolu, v němž byl také převeden do polyethylenové lahvičky a skladován při 4°C.

3.3.4. Odstranění detergentu silikagelem

Z purifikovaného preparátu NADPH:CYP reduktasy byl pomocí silikagelu odstraněn detergent.

Bylo odebráno 500 µl finálního preparátu NADPH:CYP reduktasy, ke kterému byl přidán silikagel o koncentraci 4 mg. ml⁻¹ roztoku, tj. 4 mg. (mg Emulgenu E-911)⁻¹. Vzorek byl 2 hodiny promícháván při 6 °C, odstředěn a v supernatantu byla stanovena aktivita NADPH:CYP reduktasy. Pokud ve vzorku NADPH:CYP reduktasy nepoklesla reduktasová aktivita pod 80 % počáteční koncentrace, byl postup se stejným množstvím silikagelu opakován se zbytkem preparátu a zároveň se supernatantem vzorku, ke kterému byl přidán další silikagel. Jakmile poklesla ve vzorku NADPH:CYP reduktasy koncentrace pod 80 % počáteční koncentrace, pokus již nebyl opakován se zbytkem preparátu a supernatant vzorku byl přidán k preparátu. Poté byl finální preparát NADPH:CYP reduktasy uskladněn v malých alikvotech v hlubokomrazícím boxu při -80°C.

3.4. Studium metabolismu ellipticinu cytochromy P450

3.4.1. Oxidace ellipticinu cytochromy P450

Inkubační směsi o objemu 0,25 ml byly vždy připraveny ve dvou či třech paralelních vzorcích a obsahovaly:

- 50 nM cytochrom P450 2C9/2C19/2D6 exprimovaný jednak v SupersomechTM a jednak v Bactosomech
- 10 μ M ellipticin (2,5 mM zásobní roztok v DMSO)
- 50 nM cytochrom P450
- Polovina vzorků obsahovala 250 nM cytochrom b_5
- fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4)
- 10 mM MgCl_2 ; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP^+ . 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa („NADPH-generující“ systém)

Reakce byla „startována“ 25 μ l „NADPH-generujícího“ systému, roztoky byly inkubovány za stálého míchání (450 rpm) v Eppendorfových zkumavkách za přístupu kyslíku po dobu 20 minut při teplotě 37 °C. Následně bylo do každé zkumavky přidáno 5 μ l fenacetinu (1 mM roztok v methanolu) jako vnitřního standardu pro HPLC a reakce byla terminována extrakcí 2 x 1 ml ethylacetátu. Po intenzivním třepání byly obě fáze odděleny centrifugací při 13 000 rpm po dobu 3 minut. Extrakce provedena dvakrát. Organická fáze byla odebrána a ethylacetát byl odpařen do sucha na vakuové odparce (CentriVap Concentrator). Vzorky byly před další analýzou uchovávány při teplotě -20°C.

3.4.2. Oxidace ellipticinu cytochromy P450 v rekonstituovaném systému

Rekonstituovaný systém cytochromů P450 byl připraven za přítomnosti izolované NADPH:CYP reductasy. Tento systém obsahuje arteficiální membránu tvořenou liposomy (dilauroylfosfatidylcholin, DLPC), která simuluje prostředí přirozené membrány endoplasmatického retikula. Společně jednotlivé složky vytváří funkční MFO systém obsahující jedinou isoformu cytochromu P450.

Inkubační směsi o objemu 0,25 ml byly vždy připraveny v pěti paralelních vzorcích a obsahovaly:

- 50 nM cytochrom P450 2C9/2D6/3A4 exprimovaný v prokaryotním systému s nižší hladinou reduktasy
- 10 μ M ellipticin (2,5 mM zásobní roztok v DMSO)
- 50 nM cytochrom P450
- Polovina vzorků obsahovala 250 nM cytochrom b_5
- 12; 25; 40; 50 a 100 nM NADPH:CYP reduktasa
- fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4)
- 10 mM MgCl_2 ; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP^+ . 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa („NADPH-generující“ systém)

Rekonstituovaný systém použitý pro přípravu inkubačních směsí měl kromě výše zmíněného množství cytochromu P450, NADPH:CYP reduktasy a cytochromu b_5 následujícím složení:

- 0,05 mg/ml CHAPS (0,5 mg/ml v pufru HEPES)
- 1 mg/ml DLPC (5 mg/ml v chloroformu)
- 3 mM glutathion (30 mM zásobní roztok v H_2O)
- 50 mM HEPES (500 mM zásobní roztok v H_2O ; pH 7.4)

Nejdříve byl ve skleněných zkumavkách odpařen pod dusíkovou atmosférou roztok DLPC v chloroformu o koncentraci 5 mg/ml tak, aby se na dně a stěnách zkumavky vytvořila vrstvička lipidu. Dále byly do zkumavek přidány roztoky detergentu CHAPS, glutathionu a pufru HEPES. Směsi byly „sonikovány“ 2 x 3 minuty, což přispívá k snadnější tvorbě liposomů, a poté k nim byly přidány enzymy (cytochrom P450, NADPH:CYP reduktasa, cytochrom b_5). Směsi byly inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě na třepačce. Tím byly rekonstituované systémy připraveny a dále použity pro inkubace s ellipticinem.

Postup inkubace vzorků je shodný jako v kapitole 3.4.1 .

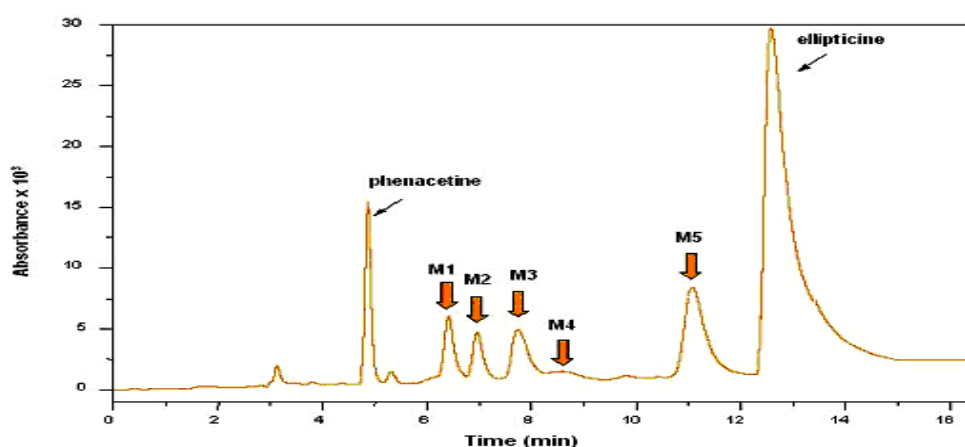
3.4.3. Separace metabolitů ellipticinu vysokotlakou kapalinovou chromatografií (HPLC)

Vzorky, obsahující jednotlivé metabolity ellipticinu, byly těsně před analýzou rozpuštěny ve 25 μ l methanolu. Ellipticin a jeho metabolity byly separovány pomocí HPLC za použití mobilní fáze s kyselinou 1-heptansulfonovou (Tab. 3). Před použitím byly vždy z mobilní fáze „sonikací“ odstraněny vzduchové bubliny. Metabolity byly detekovány při vlnové délce 296 nm a 37 °C. Pro kvantifikaci byla jejich plocha vztažena k ploše píku vnitřního standardu fenacetinu. Podmínky pro HPLC jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Podmínky HPLC pro separování ellipticinu a jeho metabolitů

Mobilní fáze	64 % metanol, 5 mM heptansulfonát sodný, 32 mM kyselina octová
Kolona	Ultrasphere, ODS, C18, 250 x 4,6 mM, 5 μ M (Beckman)
Teplota kolony	37 °C
Průtok	0,7 ml/min
Nástřik	20 μ l
Detekční délka	296 nm

Příklad separace ellipticinu a jeho metabolitů tvořených cytochromem P450 3A4 pomocí HPLC je uveden na Obr. 23.



Obr. 23: HPLC ellipticinu a jeho metabolitů tvořených oxidací cytochromy P450 3A4. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N²-oxid ellipticinu (M5) [Stiborová et al, 2006].

4. Výsledky

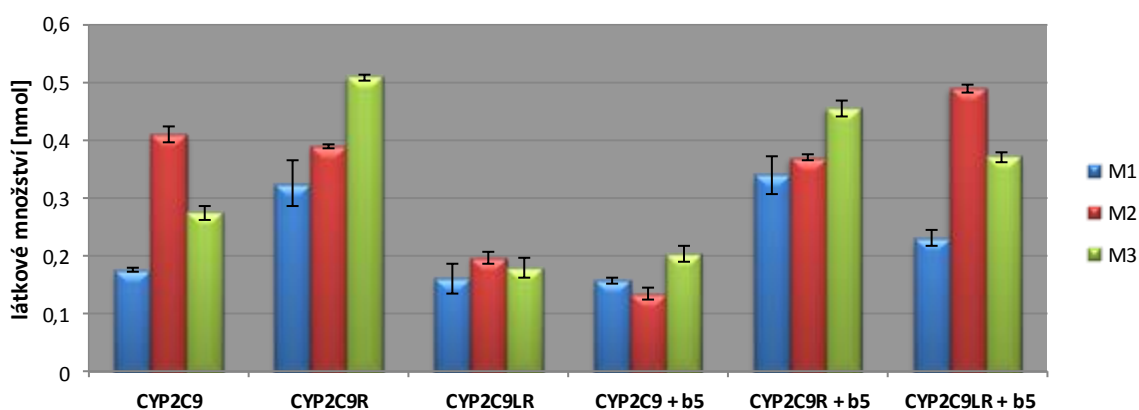
4.1. Porovnání enzymové aktivity lidských cytochromů P450 2C9, 2C19 a 2D6 exprimovanými v prokaryotním a eukaryotním systému

V první části diplomové práce byla sledována aktivita několika lidských cytochromů P450 exprimovaných v eukaryotním a prokaryotním systému, a to v oxidaci ellipticinu. Tato aktivita byla měřena při stejných koncentracích cytochromů P450. Dále byl sledován vliv cytochromu b_5 na tuto oxidaci. Cytochrom b_5 byl k cytochromu P50 přidán v poměru CYP:cyt b_5 = 1:5 (1 = 50 nM CYP). Vždy byla porovnávána aktivita enzymu exprimovaného v eukaryotním systému a ve dvou prokaryotních systémech (*kapitola 3.4.1.*). Enzymy v prokaryotních systémech se navzájem lišily množstvím exprimované NADPH:CYP reductasy.

4.1.1. Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 2C9

V této části práce byla měřena efektivita cytochromu P450 2C9 oxidovat ellipticin, a to enzymu exprimovaného jednak v eukaryotním (CYP2C9) a jednak v prokaryotních systémech (CYP2C9R, CYP2C9LR). Lidský cytochrom P450 2C9 oxiduje ellipticin na čtyři metabolity (9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu). Cytochrom P450 2C9 exprimovaný v prokaryotním systému s vyšší hladinou NADPH:CYP reductasy (CYP2C9R) oxiduje ellipticin mnohem účinněji než cytochrom P450 2C9 exprimovaný v eukaryotním systému (CYP2C9). Naopak účinnost v oxidaci ellipticinu je opačná u cytochromu P450 2C9 exprimovaného v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy (CYP2C9LR). CYP2C9LR oxiduje ellipticin méně efektivně než CYP2C9 exprimovaný v eukaryotním systému (Obr. 24, str. 62).

V další fázi práce byl sledován vliv cytochromu b_5 na oxidaci ellipticinu těmito cytochromy P450. Protein CYP2C9 exprimovaný v eukaryotním systému vykazuje za přítomnosti cytochromu b_5 nižší schopnost oxidace ellipticinu na jednotlivé metabolity. Tento efekt cytochromu b_5 je možné pozorovat především ve snížené tvorbě 12-hydroxyellipticinu (M2) a 13-hydroxyellipticinu (M3) (Obr. 24, str. 62). Tvorba N^2 -oxidu ellipticinu (M5) nebyla vyhodnocována vzhledem k možné nepřesnosti stanovení (blízké hodnoty retenčního času při HPLC s retenčním časem ellipticinu).

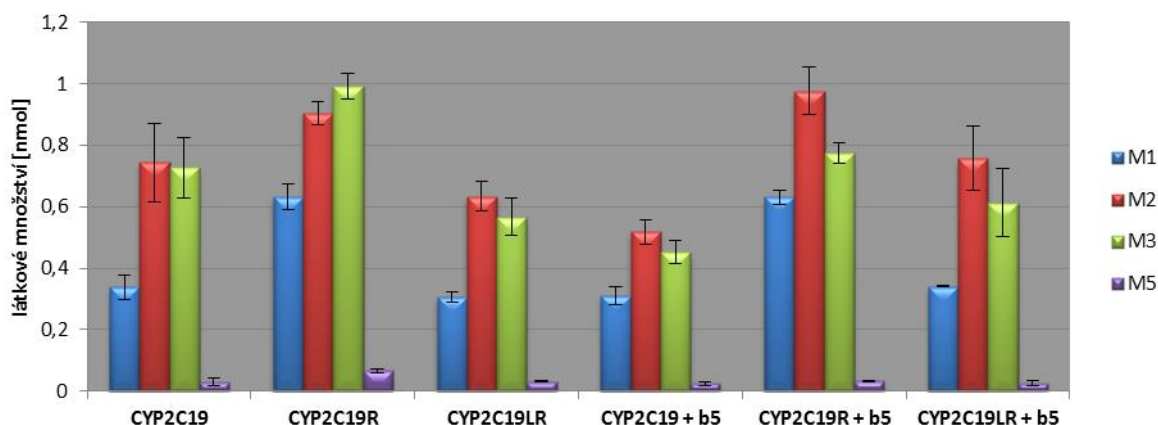


Obr. 24: Porovnání oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 2C9 exprimovaném v membráně endoplasmatického retikula hmyzích buněk (CYP2C9) a v membráně *E. coli* (CYP2C9R a CYP2C9LR). Prokaryotní systémy se liší v množství exprimované NADPH:CYP reduktasy (v CYP2C9R je aktivita NADPH:CYP reduktasy 4x vyšší). Použitá koncentrace cytochromu P450 je 50 nM. Data jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3).

Přeměnu ellipticinu na aktivační metabolity 12-hydroxyellipticin a 13-hydroxyellipticin CYP2C9 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy (CYP2C9LR) naopak cytochrom b_5 výrazně stimuluje (Obr. 24). Cytochrom b_5 však oxidaci ellipticinu cytochromem P450 2C9 exprimovaném v prokaryotním systému s vyšší hladinou reduktasy (CYP2C9R) neovlivňuje.

4.1.2. Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 2C19

Při oxidaci ellipticinu cytochromem P450 2C19 (CYP2C19) exprimovaném v eukaryotním a prokaryotním systému v koncentraci 50 nM dochází ke vzniku čtyř metabolitů: 9-hydroxy- (M1), 12-hydroxy- (M2), 13-hydroxyellipticinu (M3) a N^2 -oxidu ellipticinu (M5). Tvorba N^2 -oxidu ellipticinu nebyla opět, vzhledem k možné nepřesnosti v jeho stanovení, kvantifikována. CYP2C19 exprimovaný v prokaryotním systému s vyšší hladinou reduktasy (CYP2C19R) oxiduje ellipticin účinněji než CYP2C19 v systému eukaryotním (Obr. 25, str. 63). Naopak CYP2C19 exprimovaný v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy (CYP2C19LR) vykazuje sníženou efektivitu oxidovat ellipticin než CYP2C19 exprimovaný v eukaryotním systému (Obr. 25, str. 63).



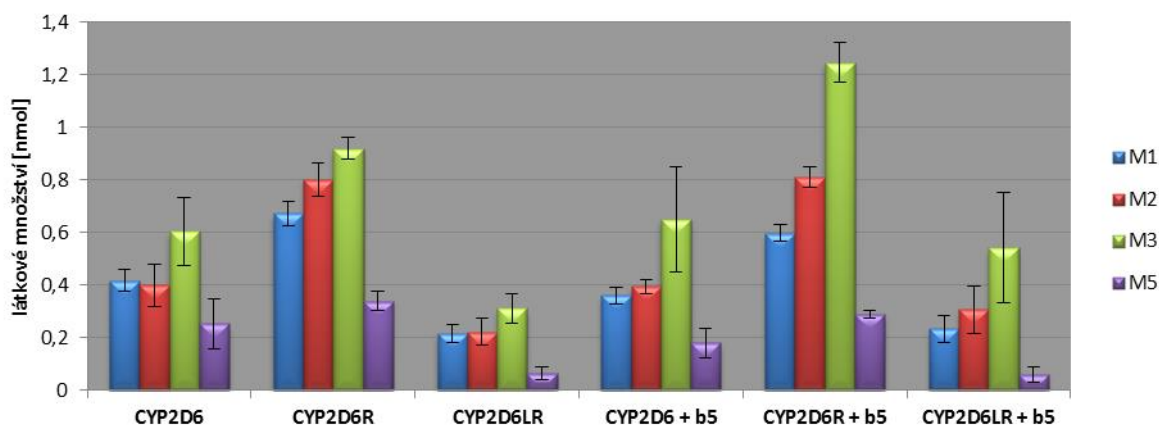
Obr. 25: Porovnání oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 2C19 exprimovaném v membráně endoplasmatického retikula hmyzích buněk (CYP2C19) a v membráně *E. coli* (CYP2C19R a CYP2C19LR). Prokaryotní systémy se liší v množství exprimované NADPH:CYP reduktasy (v CYP2C19R je aktivita NADPH:CYP reduktasy 4x vyšší). Použitá koncentrace cytochromu P450 je 50 nM. Data jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a *N*²-oxid ellipticinu (M5).

Po přidání cytochromu b₅ do inkubační směsi obsahující CYP2C19 dochází ke změně poměru tvořených metabolitů ellipticinu. Inhibiční efekt cytochromu b₅ je patrný na tvorbě aktivačních metabolitů 12-hydroxy- (M2) a 13-hydroxyellipticinu (M3) CYP2C19 exprimovaném v eukaryotním systému (Obr. 25). Přítomnost cytochromu b₅ v prokaryotních systémech (CYP2C19R, CYP2C19LR) naopak stimuluje tvorbu metabolitu 12-hydroxyellipticinu (M2). Funkci CYP2C19 exprimovaného v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy (CYP2C19LR) cytochrom b₅ také stimuluje, a to přeměnu ellipticinu na 13-hydroxyellipticin (M3). Cytochrom b₅ však CYP2C19 exprimovaný v prokaryotním systému s vyšší hladinou reduktasy (CYP2C19R) oxidaci ellipticinu na 13-hydroxyellipticin (M3) neovlivňuje (Obr. 25).

4.1.3. Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 2D6

V další fázi diplomové práce byla sledována účinnost cytochromu P450 2D6 oxidovat ellipticin, a to enzymu exprimovaného jednak v eukaryotním (CYP2D6) a jednak v prokaryotních systémech (CYP2D6R, CYP2D6LR). Lidský cytochrom P450 2D6 exprimovaný jak v eukaryotním, tak i v prokaryotním systému, oxiduje ellipticin na čtyři metabolity: 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticin a *N*²-oxid ellipticinu. CYP2D6 exprimovaný v prokaryotním systému s vyšší hladinou reduktasy (CYP2D6R) produkuje větší množství metabolitů ellipticinu než CYP2D6 exprimovaný v systému eukaryotním (Obr. 26, str. 64). Naopak CYP2D6 exprimovaný v druhém prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy (CYP2D6LR) vykazuje sníženou efektivitu oxidovat ellipticin oproti eukaryotnímu systému (Obr. 26, str. 64).

V další fázi práce jsme sledovali vliv cytochromu b_5 na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 2D6. Přítomnost cytochromu b_5 v systému CYP2D6 exprimovaného v prokaryotních systémech výrazně stimuluje tvorbu především metabolitu 13-hydroxyellipticinu (M3), v případě CYP2D6LR dochází navíc ke stimulaci produkce 12-hydroxyellipticinu (M2), (Obr. 26). Přítomnost cytochromu b_5 v systému CYP2D6 exprimovaném v eukaryotním systému oxidaci ellipticinu neovlivňuje (Obr. 26).



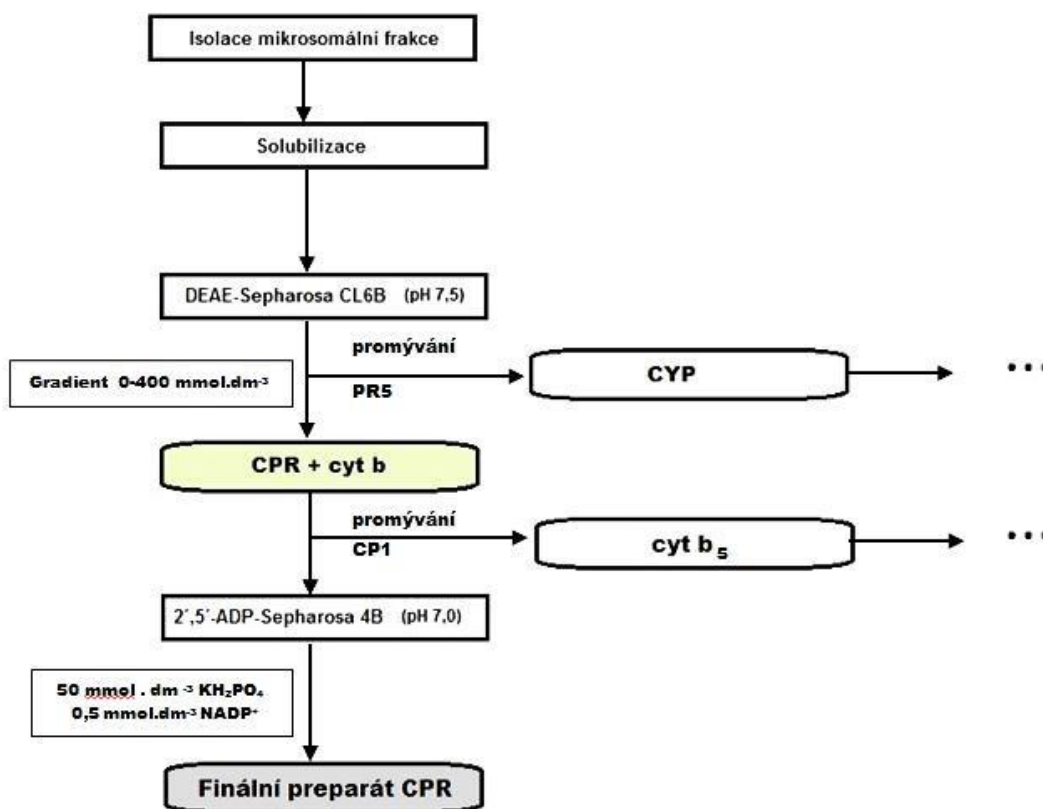
Obr. 26: Porovnání oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 2D6 exprimovaném v membráně endoplasmatického retikula hmyzích buněk (CYP2D6) a v membráně *E. coli* (CYP2D6R a CYP2D6LR). Prokaryotní systémy se liší v množství exprimované NADPH:CYP reductasy (v CYP2D6R je aktivita NADPH:CYP reductasy 4x vyšší). Použitá koncentrace cytochromu P450 je 50 nM. Data jsou průměry a směrodatné odchylky pěti měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a N^2 -oxid ellipticinu (M5).

Zajímavým zjištěním vyplývajícím z těchto experimentů byla skutečnost, že NADPH:CYP reductasa „koexprimovaná“ s jednotlivými isoformami cytochromů P450 exprimovanými v prokaryotním systému ovlivňuje množství metabolitů ellipticinu. Toto poznání nás vedlo k dalšímu studiu metabolismu ellipticinu, zkoumajícího vliv NADPH:CYP reductasy na přeměnu ellipticinu jednotlivými isoformami CYP exprimovanými v prokaryotním systému s nižší hladinou reductasy (CYP LR). A to v rekonstituovaném systému s NADPH:CYP reductasou a cytochromem b_5 . Pro takovou studii však NADPH:CYP reductasa musela být izolována.

4.2. Isolace NADPH:CYP reductasy

Prvním krokem vedoucím k poznání vlivu NADPH:CYP reductasy na oxidaci ellipticinu lidskými cytochromy P450 exprimovanými v prokaryotním systému a možnosti charakterizovat její vlastnosti byla její izolace. Jelikož NADPH:CYP reductasa nebyla v laboratoři, kde byla diplomová práce vypracována, k dispozici, bylo tedy nezbytné nejprve tento enzym izolovat. Isolován byl z jaterní tkáně králíka domácího. Problematika izolace enzymů MFO systému je v laboratoři, kde byla vypracována tato práce, řešena již řadu let. Purifikace enzymu probíhala podle postupu popsáným v práci Doc. RNDr. Miroslava Šulce, Ph.D. [Šulc, 2002]

Purifikace proteinu probíhala podle schématu zobrazeném na Obr. 27. Postupně docházelo k izolaci mikrosomální frakce z jater pokusných zvířat frakční centrifugací, k solubilizaci a přečištění proteinů pomocí ionexové (DEAE-Sepharosa CL-6B) a afinitní (2',5'-ADP-Sepharosa 4B) chromatografie. Celý isolační proces probíhal při 6 °C v chlazené místnosti.



Obr. 27: Schéma průběhu izolace NADPH:CYP reductasy

DEAE-Sepharosa CL-6B – ionexová kolona DEAE-Sepharosy CL-6B, 2',5'-ADP-Sepharosa 4B – afinitní kolona 2',5'-ADP-Sepharosy, CPR – NADPH:CYP reductasa, CYP – cytochrom P450, cyt b₅ – cytochrom b₅, PR5 - ekvilibrační pufr pro DEAE-Sepharosu CL-6B, CP1 - ekvilibrační pufr pro 2',5'-ADP-Sepharosu 4B.

4.2.1. Isolace mikrosomální frakce

Mikrosomy byly izolovány z jaterní tkáně dvou samců králíka domácího dle postupu v kapitole 3.3.1. Koncentrace proteinu byla stanovena metodou BCA, kapitola 3.2.1. Aktivita NADPH:CYP reduktasy v mikrosomech byla stanovena postupem popsaným v kapitole 3.2.2.

Celkem bylo ze dvou homogenizovaných jaterních tkání pomocí frakční centrifugace získáno 35 ml finální mikrosomální frakce (o obsahu bílkoviny 35 mg. ml^{-1} a o aktivitě NADPH:CYP reduktasy $2,48 \text{ } \mu\text{mol cyt c. min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$) a 31 ml finální mikrosomální frakce (o obsahu bílkoviny 30 mg. ml^{-1} a o aktivitě NADPH:CYP reduktasy $2,86 \text{ } \mu\text{mol cyt c. min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$). Na základě podobných hodnot aktivit NADPH:CYP reduktasy a obsahu proteinu byly získané mikrosomální frakce před provedením solubilizace spojeny.

4.2.2. Solubilizace membránových proteinů

Dalším nutným krokem při purifikaci enzymu NADPH:CYP reduktasy byla její solubilizace pomocí detergentů (cholát sodný, Emulgen E-911), postup solubilizace je uveden v kapitole 3.3.2. Detergenty slouží k rozrušení lipidové dvojvrstvy a navázáním na membránovou část enzymu blokuji hydrofobní interakce a udržují tak protein v rozpustné formě. Dále byl pro zvýšení rozpustnosti NADPH:CYP reduktasy do roztoku přidán protaminsulfát, který má vazebnou aktivitu k RNA. Aby nedocházelo k degradaci proteinů působením proteas přítomných v mikrosomální frakci, byla do roztoku přidána směs inhibitorů proteas (Complete inhibitor).

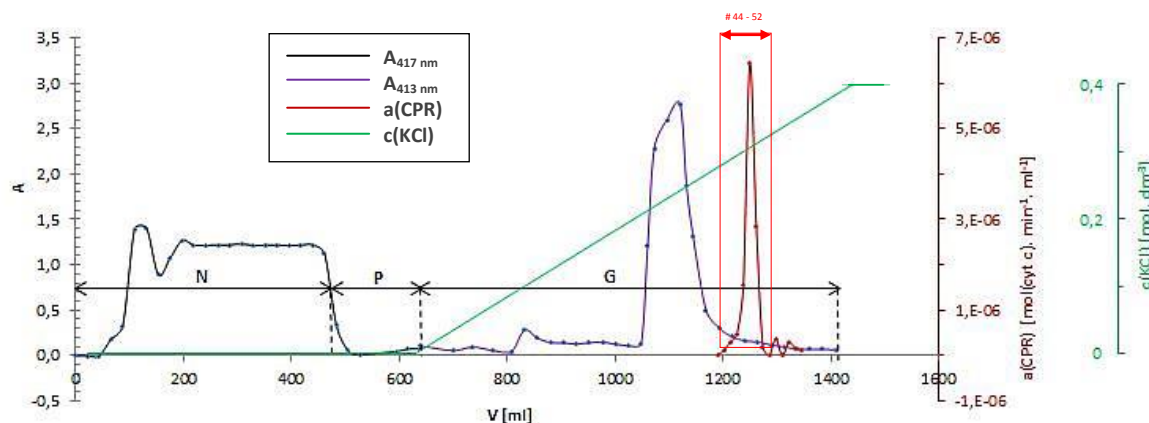
V získaném solubilizátu o objemu 415 ml byla měřena reduktasová aktivita, která činila $0,4 \text{ } \mu\text{mol cyt c. min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$, což odpovídá 98 % původní aktivity. Solubilizát byl postupně nanesen na ekvilibrovanou kolonu DEAE-Sepharosy CL-6B.

4.2.3. Chromatografie NADPH:CYP reduktasy na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (pH 7,5)

Chromatografie na tomto ionexovém nosiči byla provedena postupem popsaným v kapitole 3.3.3.1, přičemž v jednotlivých frakcích byla sledována absorbance při 417 nm a 413 nm. Měřena byla také aktivita NADPH:CYP reduktasy.

Chromatografie na DEAE-Sepharose CL-6B sloužila k oddělení cytochromu P450 od NADPH:CYP reduktasy a cytochromu b_5 . Cytochrom P450 se za daných podmínek (pH 7,5) na kolonu DEAE-Sepharosy CL-B6 nevázal, zatímco NADPH:CYP reduktasa a

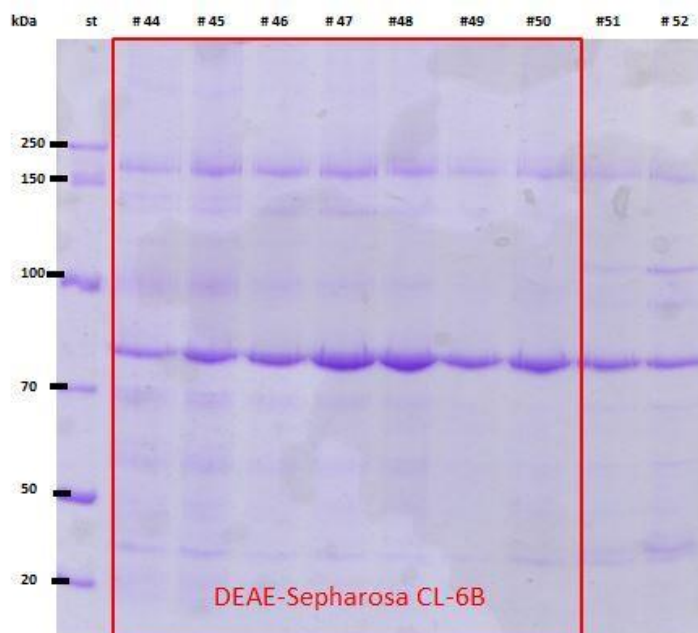
cytochrom b_5 naopak na nosiči v koloně navázané zůstaly a byly eluované z kolony lineárním gradientem 0-400 mM KCl. Průběh chromatografie je znázorněn na Obr. 28.



Obr. 28: Chromatografie supernatantu získaného solubilizací jaterní mikrosomální frakce na koloně DEAE-Sepharosy CL-6B (pH 7,5)

kolona $2,5 \times 40$ cm, 150 ml; ekvilibrační pufr PR5; promývací pufr PR5 s 0,4 % (w/v) emulgenem E-911, eluce gradientem 0 – 400 mM KCl v pufru PR5, $A_{417\text{ nm}}$ – absorbance měřená při vlnové délce 417 nm, $A_{413\text{ nm}}$ – absorbance měřená při vlnové délce 413 nm, # 44-52 – spojené frakce NADPH:CYP reductasy, a(CPR) – aktivita NADPH:CYP reductasy; N – nanášení; P – promývání; G – gradient KCl

S frakcemi eluovanými z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B, které vykazovaly aktivitu NADPH:CYP reductasy, byla provedena SDS-PAGE (8 % (v/w) gel, Obr. 29).



Obr. 29: SDS-PAGE frakcí NADPH:CYP reductasy eluovaných z DEAE-Sepharosy CL-6B gradientem KCl (pH 7,5)

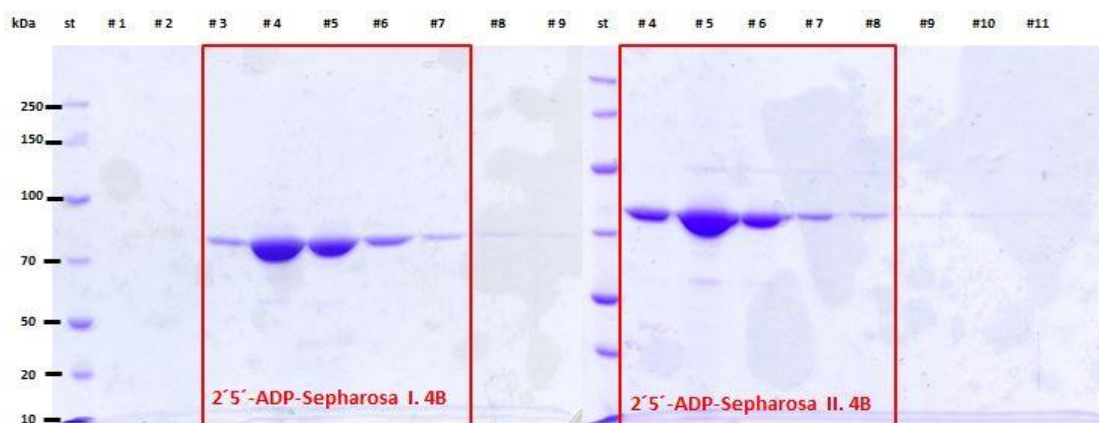
st – Sigma marker; # 44-52 – čísla frakcí. 8 % PAGE, barvení: CBB R-250.

Na základě SDS-PAGE byly spojeny frakce 44-50 obsahující alespoň 10% aktivity NADPH:CYP reduktasy v maximu a neobsahující kontaminaci tetrahydrofolátreduktasou (zóna o molekulové hmotnosti 95 kDa). Tyto frakce o objemu 80 ml byly dále zahuštěny ultrafiltrací na 35 ml (membrána Amicon PM-30, Millipore) a dialyzovány přes noc proti 2×1000 ml pufru PR6. Nedopatřením došlo k úniku části preparátu do dialyzačního roztoku. Ve snaze zachránit co nejvíce preparátu byly připraveny dvě kolony 2',5'-ADP-Sepharosy pro dvě separátní chromatografie. Zbylá část preparátu po úpravě pH (7,0) byla postupně nanášena na ekvilibrovanou kolonu 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (dále označována jako **2',5'-ADP-Sepharosa I. 4B**). Na druhou ekvilibrovanou kolonu 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (dále označována jako **2',5'-ADP-Sepharosa II. 4B**) byl postupně nanášen celý objem dialyzačního roztoku (2 000 ml, pH 7,0) s uniklým preparátem NADPH:CYP reduktasy.

4.2.4. Chromatografie NADPH:CYP reduktasy na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (pH 7,0)

K purifikaci NADPH: CYP reduktasy byla použita afinitní chromatografie na 2',5'-ADP-Sepharose 4B, která byla provedena dle postupu popsáno v kapitole 3.3.3.2. NADPH:CYP reduktasa se na nosič kolony selektivně navázala, zatímco kontaminanty byly odmyty. NADPH:CYP reduktasa byla z kolony eluována 60 ml mM KCl s 0,5 mM NADP⁺ (rychlost eluce 30 ml/hod). Jímány byly frakce o objemu asi 2 ml, ve kterých byla měřena aktivita NADPH:CYP reduktasy.

Na základě zjištěných aktivit NADPH:CYP reduktasy v eluovaných frakcích byla provedena SDS-PAGE (10 % (v/w) gel, Obr. 30).



Obr. 30: SDS-PAGE frakcí z 2',5'-ADP-Sepharosy 4B, pH 7,0 s nejvyšší aktivitou NADPH:CYP reduktasy

st – Sigma marker; #1-9; # 4-11 – čísla frakcí; 2',5'-ADP-Sepharosa I., ev. II. 4B – frakce eluované z kolony, 2',5'-ADP-Sepharosy I., ev. II. 4B obsahující NADPH:CYP reduktasu, 10 % PAGE, barvení: CBB R-250.

Frakce s největším obsahem (aktivitou) NADPH:CYP reductasy, tedy frakce 3-7 (frakce eluované z kolony 2'5'-ADP-Sepharosy I. obsahující NADPH:CYP reductasu), ev. frakce 4-8 (frakce eluované z kolony 2'5'-ADP-Sepharosy II. obsahující NADPH:CYP reductasu), byly spojeny a bylo k nim přidáno takové množství FMN, aby se jeho výsledná koncentrace rovnala 0,5 μM , jelikož v průběhu izolace dochází k jeho uvolnění z NADPH:CYP reductasy a jeho ztrátě.

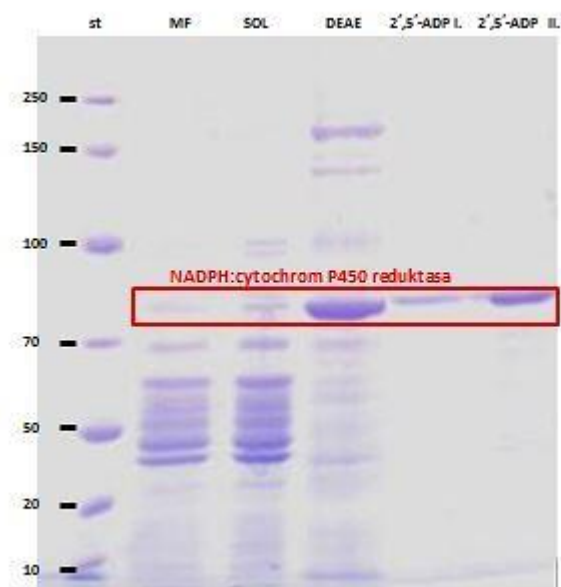
Afinitní chromatografie na 2',5'-ADP-Sepharose 4B odstranila z preparátů NADPH:CYP reductasy kontaminanty a koncentrovala je na objem 9 ml (spojené frakce eluované z kolony 2'5'-ADP-Sepharosy I. 4B obsahující NADPH:CYP reductasu) a 6 ml (spojené frakce eluované z kolony 2'5'-ADP-Sepharosy II. 4B obsahující NADPH:CYP reductasu), čímž v nich také došlo ke snížení poměru detergent: protein. Takto upravené preparáty byly přes noc podrobeny dialýze při 6°C proti 2 $\times$ 1000 ml pufru PR8.

Průběh purifikace NADPH:CYP reductasy je shrnut v Tab. 4 a na Obr. 31 (str. 70), který rovněž charakterizuje kvalitu (čistotu) získaného enzymu.

Tab. 4: Purifikace NADPH:CYP reductasy

	V [ml]	a [$\mu\text{mol cyt c. min}^{-1}$]	c _b [mg. ml ⁻¹]	s.a. [$\mu\text{mol cyt c. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]	Výtěžek [%]
Mikrosomální frakce	360	178	9,9	0,05	100
Solubilizát	415	174	8,0	0,05	98
DEAE-Sepharosa CL-6B	35	113	7,9	0,04	64
2'5'-ADP Sepharosa I. 4B	5	16	6,3	0,51	9
2'5'-ADP Sepharosa II. 4B	9	30	6,8	0,49	17

V – objem; a – aktivita, c_b – koncentrace bílkoviny, s.a. – specifická aktivita NADPH:CYP reductasy; [%] – procentuální výtěžek oproti mikrosomální frakci; DEAE – frakce eluované z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B; 2',5'-ADP – frakce eluované z kolony 2',5'-ADP-Sepharosy 4B.



Obr. 31: SDS-PAGE frakcí získaných v průběhu purifikace NADPH:CYP reductasy

st- Sigma marker, MF – mikrosomální frakce, SOL – solubilizát, DEAE – preparát NADPH:CYP reductasy eluovaný z kolony DEAE-Sepharosy CL-6B, 2',5'-ADP I. – preparát NADPH:CYP reductasy eluovaný z kolony 2',5'-ADP-Sepharosy I. 4B, 2',5'-ADP II.– preparát NADPH:CYP reductasy eluovaný z kolony 2',5'-ADP-Sepharosy II. 4B. 10 % PAGE, barvení: CBB R-250.

4.3. Vliv NADPH:CYP reductasy a cytochromu b₅ na oxidaci ellipticinu lidskými cytochromy P450 2C9, 2D6 a 3A4 exprimovanými v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy

V této části diplomové práce byl sledován vliv NADPH:CYP reductasy, izolované postupem popsáním v předchozích kapitolách, a to na oxidaci ellipticinu lidskými cytochromy P450 2C9, 2D6 a 3A4 exprimovanými v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy. V těchto experimentech nebyl studován cytochrom P450 2C19 exprimovaný v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy vzhledem k nedostatku experimentálního materiálu. Efektivitou cytochromů P450 3A4 exprimovaných v eukaryotním a prokaryotním systému s různou hladinou NADPH:CYP reductasy se laboratoř, kde byla vypracována tato diplomová práce, již zabývala. Proto CYP3A4 nebyl součástí experimentů v první části této diplomové práce, která se zabývala právě efektivitou cytochromů P450 exprimovaných v různých expresních systémech.

V experimentech byl použit preparát NADPH:CYP reductasy izolované z jaterní tkáně králíka se specifickou aktivitou 0,49 $\mu\text{mol cyt c. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (kapitola 4.2.4.).

V první části práce byl sledován vliv koncentrace NADPH:CYP reductasy na tvorbu jednotlivých metabolitů ellipticinu. NADPH:CYP reductasa byla přidávána k lidským cytochromům P450 2C9/2D6/3A4 exprimovanými v prokaryotním systému v poměru cytochrom P450 ku NADPH:CYP reductase 1:0,3 až 1:2 (1 = 50 nM CYP).

V další části práce byl pak zkoumán vliv cytochromu b₅ na tuto oxidaci. Cytochrom b₅ byl přidáván k lidským cytochromům P450 2C9/2D6/3A4 exprimovaném v prokaryotním systému v poměru CYP:cyt b₅ = 1:5 (1 = 50 nM CYP).

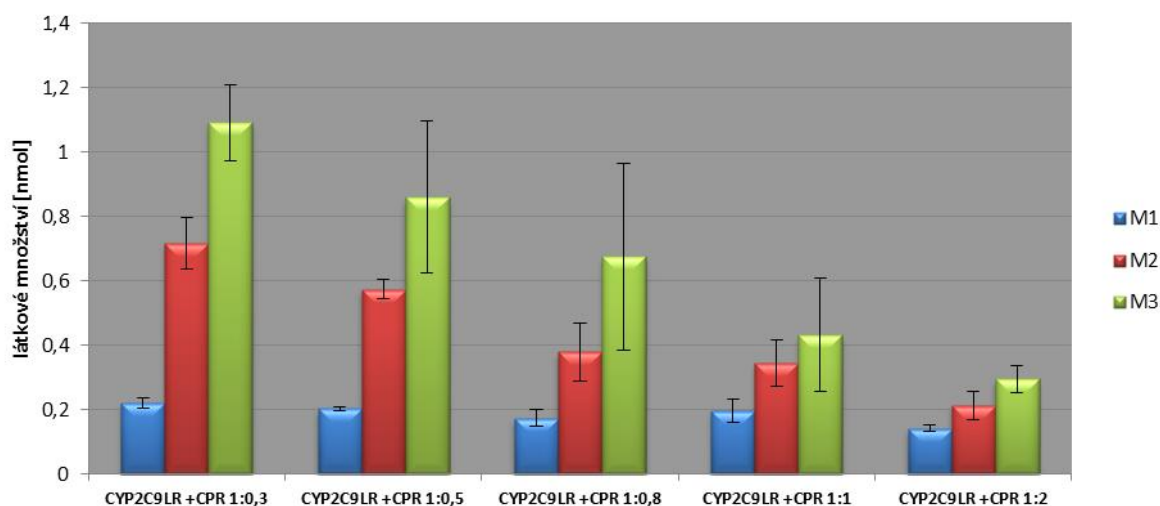
4.3.1. Vliv NADPH:CYP reductasy a cytochromu b₅ na oxidaci ellipticinu lidským cytochromem P450 2C9 exprimovaném s nižší hladinou reductasy

Jak již bylo zmíněno výše, při oxidaci ellipticinu lidským cytochromem P450 2C9 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy (CYP2C9LR) vznikají metabolity 9-hydroxy- (M1), 12-hydroxy- (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), kapitola 4.1.1.

V dalších experimentech bylo zjištěno, že vlivem zvyšující se koncentrace izolované NADPH:CYP reductasy dochází k významné změně v podílu tvorby metabolitů ellipticinu. Vlivem NADPH:CYP reductasy dochází ke snížení množství některých metabolitů ellipticinu. Tento efekt NADPH:CYP reductasy nebyl zjištěn v případě

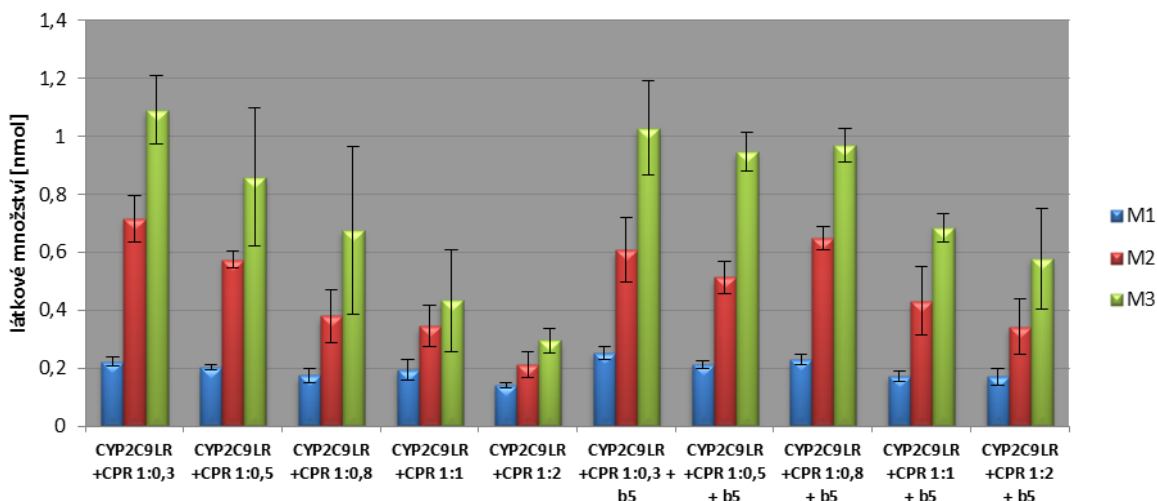
produkce 9-hydroxyellipticinu, ale ve snížené produkci 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu (Obr. 32). Tedy aktivačních metabolitů, které zodpovídají za tvorbu kovalentních aduktů ellipticinu s DNA.

Zvyšující se koncentrace NADPH:CYP reductasy tedy výrazně inhibuje oxidaci ellipticinu lidským cytochromem P450 2C9 na aktivační metabolity 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu (Obr. 32), zatímco vliv NADPH:CYP reductasy na detoxikační produkt metabolismu ellipticinu, 9-hydroxyellipticinu, prokázán nebyl.



Obr. 32: Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 2C9 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy (CYP2C9LR) za přítomnosti různých koncentrací NADPH:CYP reductasy (12 nM, 25 nM, 40 nM, 50 nM a 100 nM). Použitá koncentrace cytochromu P450 je 50 nM. Data jsou průměry a směrodatné odchylky šesti měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3).

V další části práce byl zkoumán společný vliv cytochromu b_5 a NADPH:CYP reductasy na oxidaci ellipticinu lidským cytochromem P450 2C9 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy (CYP2C9LR). Z předchozích měření bylo zjištěno, že cytochrom b_5 stimuluje přeměnu ellipticinu lidským CYP2C9LR na aktivační metabolity 12-hydroxyellipticin a 13-hydroxyellipticin (kapitola 4.1.1.). Přidání cytochromu b_5 do rekonstituovaného systému CYP2C9LR s izolovanou NADPH:CYP reduktasou mělo za následek u vyšších poměrů CYP2C9LR ku NADPH:CYP reduktase (1:0,8 až 1:2) stimulaci tvorby aktivačních metabolitů 12-hydroxy- (M2) a především 13-hydroxyellipticinu (M3), (Obr. 33, str. 73).



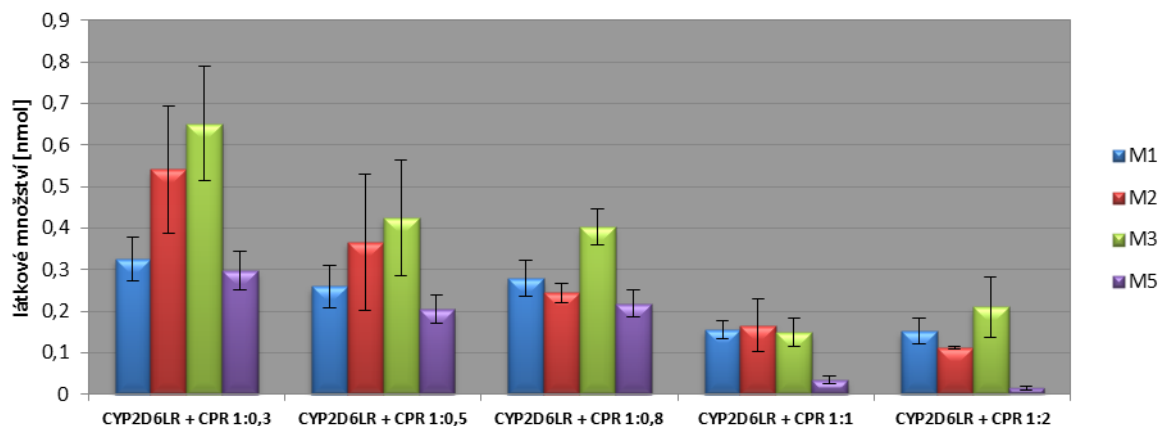
Obr. 33: Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 2C9 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy (CYP2C9LR) za přítomnosti cytochromu b_5 a různých koncentrací NADPH:CYP reduktasy (12 nM, 25 nM, 40 nM, 50 nM a 100 nM). Cytochrom b_5 byl přidáván k CYP2C9LR v poměru CYP:cyt b_5 = 1:5 (1 = 50 nM CYP). Data jsou průměry a směrodatné odchylky šesti měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3).

4.3.2. Vliv NADPH:CYP reduktasy a cytochromu b_5 na oxidaci ellipticinu lidským cytochromem P450 2D6 exprimovaném s nižší hladinou reduktasy

Z výsledků získaných v předchozích částech diplomové práce (kapitola 4.1.3) sledujících metabolismus ellipticinu lidským cytochromem P450 2D6 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy (CYP2D6LR) je patrné, že CYP2D6LR efektivně přeměňuje ellipticin na detoxikační metabolit 9-hydroxyellipticin (M1) a na aktivační metabolity 12-hydroxy- (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a N^2 -oxid ellipticinu (M5).

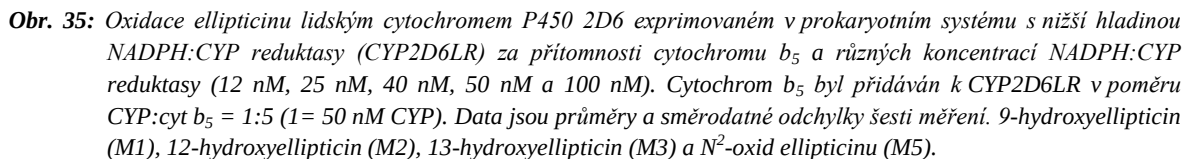
V experimentech, kde byly užity různé hladiny NADPH:CYP reduktasy bylo zjištěno, že vlivem zvyšující se koncentrace NADPH:CYP reduktasy dochází k významné změně v podílu tvorby metabolitů ellipticinu. Za přítomnosti NADPH:CYP reduktasy je modulována aktivita CYP2D6, a to v tvorbě všech čtyř metabolitů ellipticinu: 9-hydroxy-, 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu a N^2 -oxidu ellipticinu. V menší míře dochází i k inhibici tvorby 9-hydroxyellipticinu. Vlivem zvyšující se koncentrace NADPH:CYP reduktasy dochází ke snížení tvorby těchto metabolitů (Obr. 34, str. 74). Tento inhibiční efekt je patrný především ve tvorbě aktivačních metabolitů: 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticinu a N^2 -oxidu ellipticinu.

Rostoucí koncentrace NADPH:CYP reductasy tedy výrazně snižuje oxidaci ellipticinu lidským cytochromem P450 2D6 na metabolity 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticinu a N^2 -oxid ellipticinu (Obr. 34).



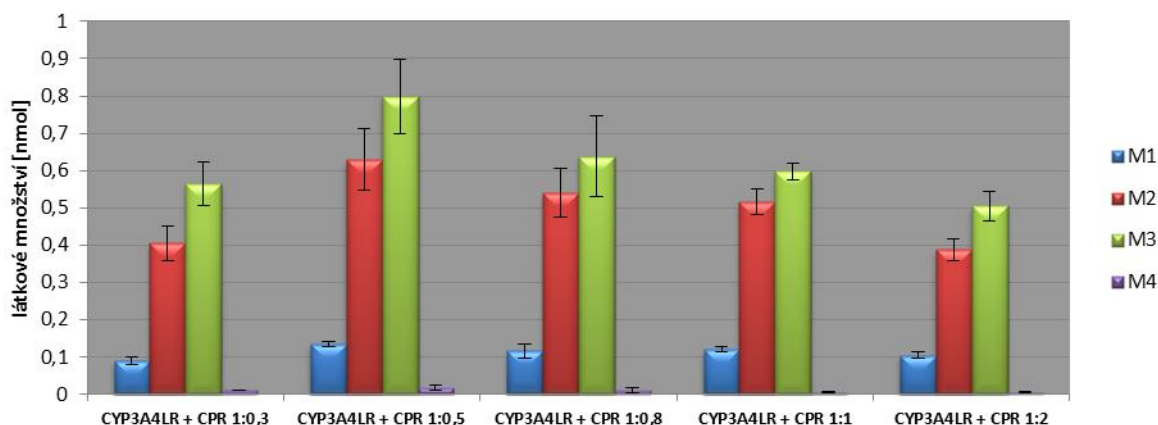
Obr. 34: Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 2D6 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy (CYP2D6LR) za přítomnosti různých koncentrací NADPH:CYP reductasy (12 nM, 25 nM, 40 nM, 50 nM a 100 nM). Použitá koncentrace cytochromu P450 je 50 nM. Data jsou průměry a směrodatné odchylky šesti měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a N^2 -oxid ellipticinu (M5).

Dalším předmětem našeho zájmu bylo sledování společného vlivu cytochromu b_5 a NADPH:CYP reductasy na přeměnu ellipticinu lidským cytochromem P450 2D6 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy (CYP2D6LR). Z předchozího měření bylo zjištěno, že cytochrom b_5 zvyšuje přeměnu ellipticinu lidským CYP2D6LR na aktivační metabolity 12-hydroxyellipticin (M2) a především na 13-hydroxyellipticin (M3), (kapitola 4.1.3). Zvyšující se koncentrace NADPH:CYP reductasy měla za následek snižující se tvorbu metabolitu 13-hydroxyellipticinu a N^2 -oxidu ellipticinu. Vlivem cytochromu b_5 dochází ve všech testovaných rekonstituovaných systémech CYP2D6LR s izolovanou NADPH:CYP reduktasou lišících se hladinou izolované NADPH:CYP reductasy ke zvýšení tvorby 13-hydroxyellipticinu (M3), (Obr. 35, str. 75).



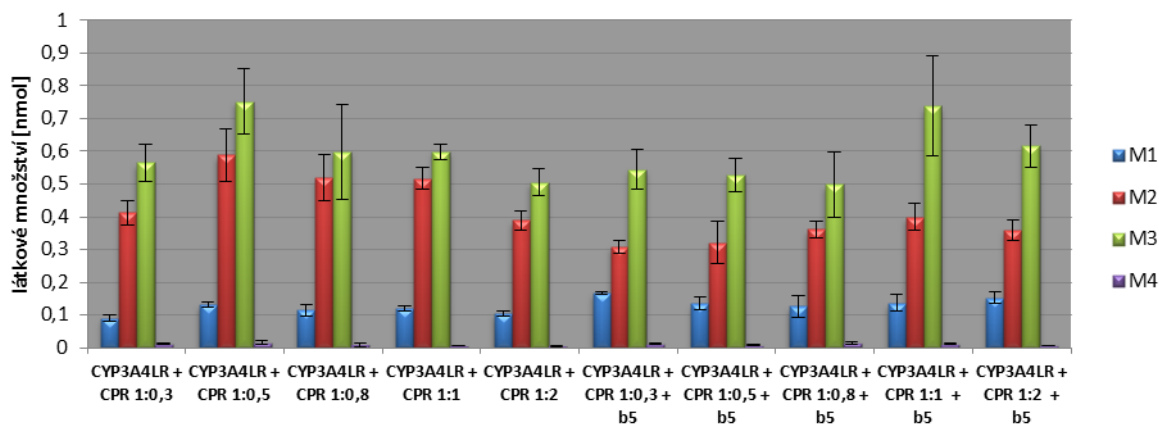
Lidský cytochrom P450 3A4 exprimovaný v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy (CYP3A4LR) oxiduje ellipticin za tvorby pěti metabolitů: 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxy-, 7-hydroxyellipticinu a N^2 -oxidu ellipticinu (*kapitola*). Metabolit N^2 -oxid ellipticinu nebyl v této studii opět kvantifikován vzhledem k možné nepřesnosti v jeho stanovení.

75



Obr. 36: Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 3A4 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy (CYP3A4LR) za přítomnosti různých koncentrací NADPH:CYP reductasy (12 nM, 25 nM, 40 nM, 50 nM a 100 nM). Použitá koncentrace cytochromu P450 je 50 nM. Data jsou průměry a směrodatné odchylky z pěti měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a N²-oxid ellipticinu (M5).

V dalším experimentu byl zkoumán společný vliv cytochromu b₅ a NADPH:CYP reductasy na přeměnu ellipticinu lidským cytochromem P450 3A4 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy (CYP3A4LR). Z Obr. 37 je patrné, že CYP3A4LR v přítomnosti cytochromu b₅ a NADPH:CYP reductasy produkuje metabolity 12-hydroxy- (M2) a 13-hydroxyellipticin (M3) méně efektivně.

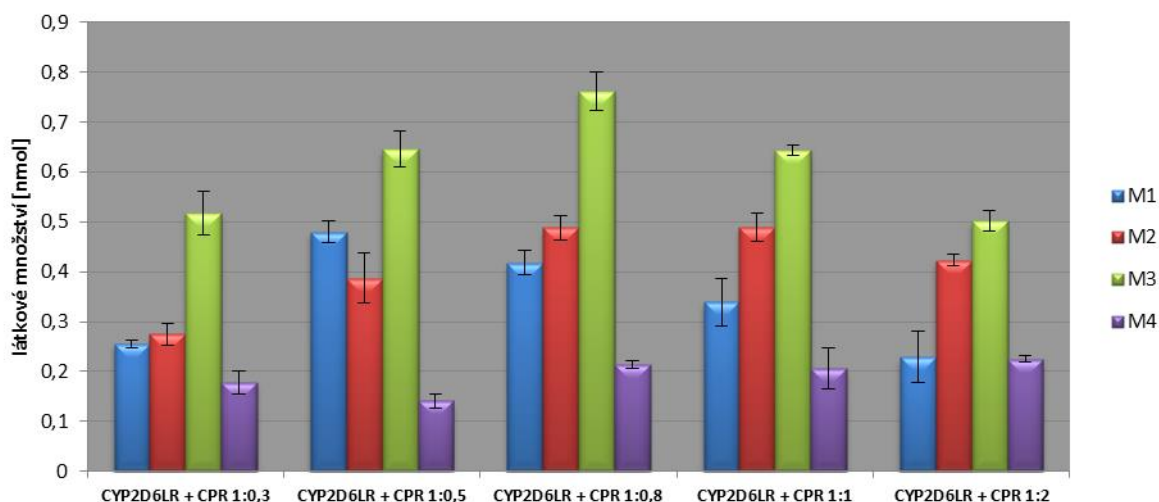


Obr. 37: Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 3A4 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy (CYP3A4LR) za přítomnosti cytochromu b₅ a různých koncentrací NADPH:CYP reductasy (12 nM, 25 nM, 40 nM, 50 nM a 100 nM). Cytochrom b₅ byl přidáván k CYP3A4LR v poměru CYP:cyt b₅ = 1:5 (1 = 50 nM CYP). Data jsou průměry a směrodatné odchylky z pěti měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a 7-hydroxyellipticin (M4).

V řadě případů experimentů s lidskými CYP exprimovanými v prokaryotním systému se ukázal inhibiční efekt NADPH:CYP reductasy u nejvyšší přidávané koncentrace (100 nM NADPH:CYP reductasy). Toto zjištění nás vedlo k předpokladu, že by mohl izolovaný preparát NADPH:CYP reductasy obsahovat nějaké kontaminanty např. detergent (Emulgen E-911), které by mohly ovlivňovat aktivitu cytochromů P450. To by pak mohlo vysvětlovat postupné snižování tvorby metabolitů ellipticinu se zvyšující koncentrací NADPH:CYP reductasy. Proto bylo dalším krokem v této diplomové práci ještě efektivnější odstranění tohoto detergentu z preparátu NADPH:CYP reductasy podle postupu uvedeném v kapitole 3.3.4. V purifikovaném preparátu byla stanovena specifická aktivita NADPH:CYP reductasy $0,54 \mu\text{mol cyt c. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Purifikace preparátu NADPH:CYP reductasy silikagelem bylo ukončeno, když specifická aktivita enzymového preparátu klesla pod 80 % počáteční koncentrace, tedy na hodnotu $0,43 \mu\text{mol cyt c. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

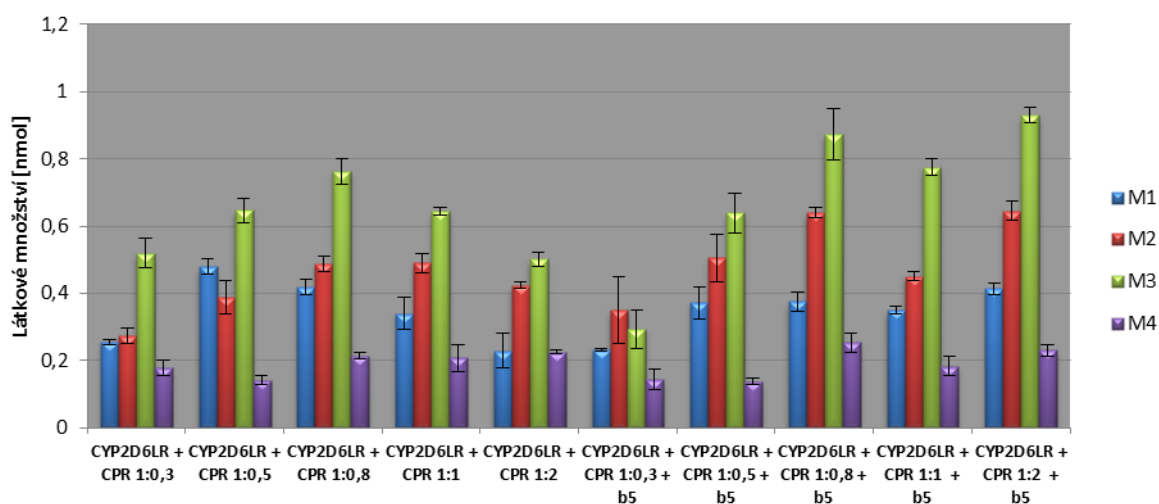
Abychom potvrdili výše uvedený předpoklad, provedli jsme další experiment s lidským cytochromem P450 2D6 exprimovaném v prokaryotním systému (CYP2D6LR), a to v rekonstituovaném systému s přečištěnou NADPH:CYP reductasou a cytochromem b₅. V tomto pokusu byl opět sledován vliv NADPH:CYP reductasy na oxidaci ellipticinu lidským CYP2D6LR. NADPH:CYP reductasa byla v rekonstituovaném systému s CYP2D6LR přidávána v poměru cytochrom P450 ku NADPH:CYP reductase 1:0,3 až 1:2 (1 = 50 nM CYP).

V rekonstituovaném systému CYP2D6LR s NADPH:CYP reductasou docházelo vlivem zvyšující se koncentrace přečištěné NADPH:CYP reductasy ke zvýšení účinnosti tvorby metabolitů ellipticinu: 9-hydroxy- (M1), 12-hydroxy- (M2) a 13-hydroxyellipticinu (M3). Nicméně oxidace ellipticinu na tyto metabolity byla stimulována pouze do poměru CYP2D6LR ku NADPH:CYP reductase 1:1. Při vyšší koncentraci NADPH:CYP reductasy (100 nM) již nedocházelo k další stimulaci tvorby těchto metabolitů (Obr. 38, str. 78).



Obr. 38: Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 2D6 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy (CYP2D6LR) za přítomnosti různých koncentrací NADPH:CYP reductasy (12 nM, 25 nM, 40 nM, 50 nM a 100 nM). Použitá koncentrace cytochromu P450 je 50 nM. Data jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a N²-oxid ellipticinu (M5).

V další části diplomové práce jsme opět studovali společný vliv cytochromu b₅ a izolované NADPH:CYP reductasy na oxidaci ellipticinu lidským cytochromem P450 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou reductasy (CYP2D6LR) v prostředí liposomů. V přítomnosti cytochromu b₅ dochází ke zvýšené tvorbě metabolitů 9-hydroxy-, 12-hydroxy- a především 13-hydroxyellipticinu, a to především u přidávaného poměru CYP2D6LR ku NADPH:CYP reductase 1:0,5 až 1:2 (Obr. 39).



Obr. 39: Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 2D6 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy (CYP2D6LR) za přítomnosti cytochromu b₅ a různých koncentrací NADPH:CYP reductasy (12 nM, 25 nM, 40 nM, 50 nM a 100 nM). Cytochrom b₅ byl přidáván k CYP2D6LR v poměru CYP:cyt b₅ = 1:5 (1 = 50 nM CYP). Data jsou průměry a směrodatné odchylky tří měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a N²-oxid ellipticinu (M5).

5. Diskuze

Cytochromy P450 patří mezi klíčové enzymy metabolismu xenobiotik. Z evolučního hlediska lze cytochromy P450 považovat za velice staré hemoproteiny, které se objevily dříve než hemoglobin. Jsou příkladem enzymu vyvíjejícím se cestou divergentní evoluce. Z jediného cytochromu P450 archebakterií se do současné doby vyvinulo velké množství odlišných genů kódujících cytochromy P450 organismů prokaryotních i eukaryotních [Stiborová et al. 1999]. V eukaryotních buňkách jsou cytochromy P450 vázány na membránu endoplasmatického retikula, ev. mitochondrií, prostřednictvím transmembránového N-terminálního α -helixu [Edwards et al. 1991]. V prokaryotních buňkách se cytochromy P450 vyskytují v rozpustné formě.

Pro studium substrátové specifity lidských cytochromů P450 je nezbytné pracovat s enzymovými preparáty jejich jednotlivých zástupců. Isolace lidských cytochromů P450 a jejich rekonstrukce s NADPH:CYP reduktasou v systémech simulujících prostředí membrány endoplasmatického retikula jsou experimentálně velmi obtížné. Proto se řada laboratoří začala zabývat přípravou lidských rekombinantních enzymů. Dnes je možné exprimovat cytochromy P450 v několika typech buněk. Běžná je exprese v hmyzích buňkách transfekovaných *Baculovirem*, v kvasinkách, v savčích buňkách, a v bakteriích (nejčastěji v *Escherichia coli*). Každý z těchto expresních systémů má řadu kladů a záporů. Při expresi v prokaryotních systémech je dosahováno vysoké hladiny exprese jednotlivých cytochromů P450, avšak je nutná „koexprese“ NADPH:CYP reduktasy, jelikož prokaryotní organismy tento enzym neobsahují [Gonzales et al., 1991]. Hlavním nedostatkem exprese cytochromu P450 v savčích buňkách je jeho nízká exprese. Naopak hmyzí buňky transfekované *Baculovirem* vykazují poměrně vysokou expresi proteinu, ale stejně jako u prokaryotního systému je nutná „koexprese“ NADPH:CYP reduktasy [Poter&Larson, 1991].

Cílem této diplomové práce bylo porovnat aktivity několika lidských cytochromů P450 exprimovaných v různých buněčných systémech, a to v systému eukaryotním a prokaryotním. Lidské cytochromy P450 exprimované v eukaryotním systému byly mikrosomy hmyzích buněk transfekované *baculovirem* nesoucím cDNA příslušných isoenzymů (SupersomesTM). Jako prokaryotní systémy byly použity membrány *E. coli*, transfekovaných cDNA stejných lidských enzymů (Bactosomes). Studovány byly dva prokaryotní expresní systémy, které se vzájemně lišily v množství exprimované

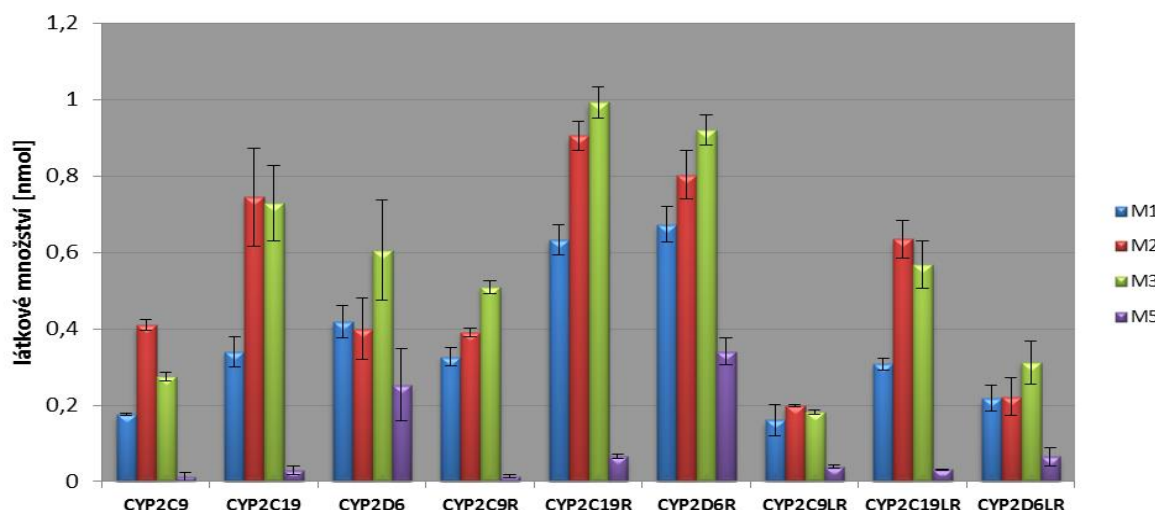
NADPH:CYP reductasy. Aktivita všech enzymů byla sledována vůči oxidaci protinádorového léčiva ellipticinu.

V první části diplomové práce byla sledována efektivita jednotlivých lidských cytochromů P450 CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6 exprimovaných v eukaryotním a prokaryotním systému, oxidovat ellipticin. Tyto cytochromy P450 byly vybrány pro tuto diplomovou práci z důvodu, že jejich efektivita v oxidaci ellipticinu nebyla dosud důkladně sledována. Předchozí experimenty sledovaly oxidaci ellipticinu především lidskými cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 [Kroftová, 2011, Stiborová et. al 2012]. V experimentech byl využíván jeden systém eukaryotní a dva prokaryotní systémy. Prokaryotní systémy se lišily v množství exprimované NADPH:CYP reductasy. Jedná se o enzym monooxygenasového systému, který katalyzuje transport elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromu P450 [Laursen et al., 2011]. Ovlivnění jejího množství a katalytické aktivity má vliv na fungování celého monooxygenasového systému.

Ve všech experimentech se ellipticin přeměňuje uvedenými cytochromy P450 na tři až čtyři metabolity: 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a N^2 -oxid ellipticinu (M5). N^2 -oxid ellipticinu byl eluován v retenčním čase blízkém retenčnímu času ellipticinu a pro možné zatížení chybou při stanovení nebyl kvantifikován. K separaci a detekci byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi.

Všechny tři studované lidské cytochromy P450 tvořily stejné metabolity ellipticinu bez ohledu na to, zda byly exprimovány v eukaryotním či prokaryotním systému. Při srovnání účinnosti lidských cytochromů P450 exprimovaných v eukaryotním a prokaryotním systému v oxidaci ellipticinu bylo zjištěno, že efektivita cytochromů P450 2C9, 2C19 i 2D6 v produkci metabolitů je vyšší u isoenzymů exprimovaných v prokaryotním systému s vyšší hladinou NADPH:CYP reductasy oproti těm, které byly exprimovány v systému eukaryotním a prokaryotním s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy. Signifikantně byla zvýšena aktivita cytochromu P450 2C9 exprimovaného v prokaryotním systému s vyšší hladinou NADPH:CYP reductasy, a to především v tvorbě metabolitů 9-hydroxy-, a 13-hydroxyellipticinu. Při oxidaci ellipticinu cytochromem P450 2C19 exprimovaném v prokaryotním systému s vyšší hladinou reductasy byla pozorována stimulace tvorby 9-hydroxy-, 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu oproti systému eukaryotnímu a prokaryotnímu s nižší hladinou reductasy (Obr. 40, str. 81). Také cytochrom P450 2D6 byl účinnější v oxidaci ellipticinu, byl-li exprimován v prokaryotním systému s vyšší hladinou NADPH:CYP reductasy. V tomto systému docházelo ke zvýšené

tvorbě 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticinu i N^2 -oxidu ellipticinu. Uvedené údaje naznačují, že studované formy cytochromu P450 exprimované v prokaryotním systému s vyšší hladinou NADPH:CYP reduktasy jsou efektivnější v oxidaci protinádorového léčiva ellipticinu, než cytochromy P450 exprimované v eukaryotním systému a prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy (Obr. 40).

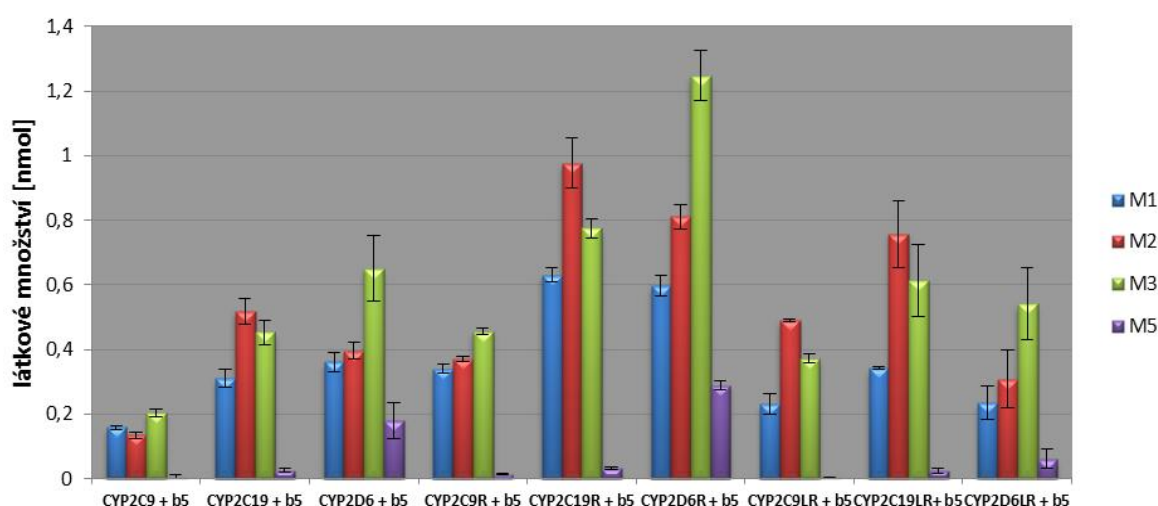


Obr. 40: Porovnání efektivity lidských cytochromů P450 2C9, 2C19 a 2D6 exprimovanými v membráně endoplasmatického retikula hmyzích buněk (CYP2C9, 2C19, 2D6) a v membráně *E. coli* (CYP2C9R, 2C19R, 2D6R, 2C9LR, 2C19LR, 2D6LR) oxidovat ellipticin. Prokaryotní systémy se liší v množství exprimované NADPH:CYP reduktasy. Použitá koncentrace cytochromu P450 je 50 nM. Data jsou průměry a směrodatné odchylky tří až pěti měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a N^2 -oxid ellipticinu (M5).

Získané výsledky naznačují, že v oxidaci modelového xenobiotika ellipticinu jsou ze studovaných cytochromů P450 nejúčinnější rekombinantní cytochromy P450 exprimované v prokaryotním systému s vyšší hladinou NADPH:CYP reduktasy, a to především CYP2C19 > CYP2D6 >> 2C9 (Obr. 40). Obecně však nelze říci, že cytochromy P450 exprimované v prokaryotním systému s vyšší hladinou NADPH:CYP reduktasy jsou účinnější pro katalýzu xenobiotik. Vždy záleží na metabolizovaném xenobiotiku a na použitém cytochromu P450. Z experimentů provedených v laboratoři, kde byla vypracována tato diplomová práce, je patrné, že při použití cytochromu P450 1A1 na oxidaci ellipticinu, je nejúčinnější CYP1A1 exprimovaný z prokaryotního systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy. CYP1A2 nejvíce potencuje tvorbu metabolitů ellipticinu, pokud je exprimovaný v eukaryotním systému [Kroftová, 2011]. Při studiích využívajících k metabolismu rekombinantní cytochromy P450 je tedy nutné si nejdříve uvědomit, jaký expresní systém bude pro experiment *in vitro* použit. Získané výsledky demonstrují, že rekombinantně připravené cytochromy P450 mohou oxidovat ellipticin

více či naopak méně efektivně v závislosti na expresním systému a na použitém cytochromu P450.

Dále byl v této diplomové práci zkoumán vliv cytochromu b_5 , fakultativní složky monooxygenasového systému, na metabolismus ellipticinu těmito lidskými cytochromy P450 exprimovanými jak v prokaryotním systému, tak i v systému eukaryotním. Funkce cytochromu b_5 nebyla dosud zcela vysvětlena. Předpokládá se však, že cytochrom b_5 má funkci donoru druhého elektronu v katalytickém cyklu cytochromu P450 [Gut et al., 1992]. Vliv cytochromu b_5 na reakce zprostředkované monooxygenasovým systémem je stále předmětem výzkumu. Cytochrom b_5 je schopen stimulovat, ale i inhibovat či vůbec neovlivňovat reakce zprostředkované cytochromy P450. Jak bude cytochrom b_5 působit je dáno použitým cytochromem P450, substráty enzymu či experimentálními podmínkami [Kotrbová et al., 2009]. Množství i poměrné zastoupení metabolitů ellipticinu je tedy za přítomnosti cytochromu b_5 velmi odlišné. Cytochromy P450 2C9, 2C19 a 2D6 exprimované v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy v přítomnosti cytochromu b_5 nejvíce potencovaly tvorbu 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu, tedy aktivačních metabolitů, které zodpovídají za tvorbu kovalentních aduktů s DNA [Stiborová et al., 2004b; Stiborová et al., 2007b; Stiborová et al., 2011]. V případě cytochromů P450 2C9 a 2D6 exprimovaných v prokaryotním systému s vyšší hladinou reductasy docházelo vlivem cytochromu b_5 pouze ke stimulaci tvorby 13-hydroxyellipticinu.



Obr. 41: Porovnání efektivity lidských cytochromů P450 2C9, 2C19 a 2D6 exprimovaných v membráně endoplasmatického retikula hmyzích buněk (CYP2C9, 2C19, 2D6) a v membráně *E. coli* (CYP2C9R, 2C19R, 2D6R, 2C9LR, 2C19R, 2D6LR) oxidovat ellipticin v přítomnosti cytochromu b_5 . Prokaryotní systémy se liší v množství exprimované NADPH:CYP reductasy. Použitá koncentrace cytochromu P450 je 50 nM, cytochromu b_5 je 250 nM. Data jsou průměry a směrodatné odchylky tří až pěti měření. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a N^2 -oxid ellipticinu (M5).

Opačný efekt cytochromu b_5 bylo možno pozorovat v případě cytochromů P450 2C9 a 2C19 exprimovaných v eukaryotním systému, kdy docházelo k výrazné inhibici aktivačních metabolitů ellipticinu 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu. V případě cytochromu P450 2D6 exprimovaného v eukaryotním systému nebyl pozorován žádný efekt cytochromu b_5 v oxidaci ellipticinu. Výše uvedené údaje naznačují, že cytochromy P450 2C9, 2C19 a 2D6 jsou v oxidaci ellipticinu stimulačně ovlivněny cytochromem b_5 pouze v případě, pokud jsou exprimovány v prokaryotním systému. Zvláště pak v prokaryotním systému s nižší hladinou reduktasy, zatímco v eukaryotním systému buď k žádným změnám v podílu aktivačních metabolitů nedochází (CYP2D6) nebo je tvorba aktivačních metabolitů ellipticinu výrazně snížena (CYP2C9/CYP2C19). Porovnáme-li jednotlivé aktivity studovaných cytochromů P450, potom přidavek cytochromu b_5 nejvíce stimuloval tvorbu metabolitů ellipticinu CYP2D6 exprimovaném v prokaryotním systému s vyšší hladinou NADPH:CYP reduktasy (CYP2D6R), a to především 13-hydroxyellipticinu (M3) a N^2 -oxidu ellipticinu. V případě cytochromu P450 2C19 exprimovaném v prokaryotním systému s vyšší hladinou NADPH:CYP reduktasy (CYP2C19R) docházelo ještě k většímu nárůstu tvorby metabolitu 12-hydroxyellipticinu, než v případě cytochromu P450 2C19 exprimovaném v prokaryotním systému s vyšší hladinou NADPH:CYP reduktasy (CYP2D6R). Tato skutečnost by mohla být vysvětlena tím, že část N^2 -oxidu ellipticinu přešla Polonowského přesmykem na 12-hydroxyellipticin (Obr. 41, str. 82).

V další části diplomové práce byl sledován vliv NADPH:CYP reduktasy na oxidaci ellipticinu lidskými cytochromy P450 2C9, 2D6 a 3A4 exprimovanými v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy. Uvedená NADPH:CYP reduktasa byla izolována z jaterní tkáně králíka domácího jako součást předkládané diplomové práce. Nové experimenty zabývající se vlivem NADPH:CYP reduktasy na oxidaci ellipticinu lidským cytochromem P450 2C19 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy nebylo možné uskutečnit z důvodu nedostatku experimentálního materiálu. Proto byl pro tuto diplomovou práci vybrán cytochrom P450 3A4 exprimovaný v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy, jehož aktivita byla v laboratoři, kde byla vypracována tato diplomová práce, již studována. Lidský cytochrom P450 3A4 exprimovaný v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy oxiduje ellipticin na pět metabolitů: 7-hydroxy-, 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu. V přítomnosti cytochromu b_5 v této inkubační směsi dochází k stimulaci tvorby 13-hydroxyellipticinu [Kroftová, 2011].

Přidaná izolovaná NADPH:CYP reduktasa byla v rekonstituovaném systému s lidskými cytochromy P450 2C9, 2D6 a 3A4 exprimovanými v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy přidávána v poměru cytochrom P450 ku NADPH:CYP reduktase 1:0,3 až 1:2 (1 = 50 nM CYP). V rekonstituovaném systému CYP3A4 s přidávanou NADPH:CYP reduktasou docházelo ke zvýšení účinnosti tvorby metabolitů ellipticinu, a to především aktivačních metabolitů 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu. Tato stimulace je patrná především u poměru cytochrom P450 ku NADPH:CYP reduktase 1:0,5. Nicméně při vyšších koncentracích NADPH:CYP reduktasy docházelo k postupnému ubývání těchto metabolitů. V případě cytochromu P450 2C9 a 2D6 docházelo vlivem vzrůstající koncentrace přidané NADPH:CYP reduktasy k postupné inhibici tvorby všech detekovaných metabolitů ellipticinu. Inhibiční efekt zvyšující se koncentrace přidávané NADPH:CYP reduktasy na tvorbu metabolitů ellipticinu byl v menší míře pozorován i v přítomnosti cytochromu b₅. Toto zjištění nás vedlo k předpokladu, že by mohl izolovaný preparát NADPH:CYP reduktasy obsahovat stále ještě určité množství detergentu (Emulgen E-911), což by vysvětlovalo postupné snižování plochy metabolitů ellipticinu se zvyšující koncentrací NADPH:CYP reduktasy, které bylo pozorováno při oxidaci ellipticinu cytochromy P450 2C9 a 2D6. Proto dalším krokem této diplomové práce bylo odstranění tohoto detergentu z preparátu NADPH:CYP reduktasy, což však mělo za následek snížení aktivity preparátu o 20 %.

Experiment s cytochromem P450 2D6 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy (CYP2D6LR) byl opakován za použití přečištěné NADPH:CYP reduktasy. V rekonstituovaném systému CYP2D6LR s přidávanou NADPH:CYP reduktasou docházelo ke stimulaci hladiny metabolitů ellipticinu: 9-hydroxy, 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu. Nicméně, při nejvyšším přidávaném množství NADPH:CYP reduktasy (100 nM) došlo opět k poklesu tvorby těchto metabolitů. Získaný výsledek tedy potvrdil výše uvedený předpoklad, že cytochrom P450 2D6 byl negativně ovlivněn přítomností kontaminant (Emulgen E-911) v izolovaném preparátu NADPH:CYP reduktasy. Experiment s lidským cytochromem P450 2C9 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy již nebyl opakován z důvodu nedostatku experimentálního materiálu, ale je velmi pravděpodobné, že v experimentu s izolovanou NADPH:CYP reduktasou docházelo také k negativnímu ovlivnění cytochromu P450 2C9 vlivem kontaminant v preparátu izolovaného enzymu. Naopak cytochrom P450 3A4 exprimovaný v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy nebyl touto kontaminací ovlivněn. Což je zajímavé zjištění, které

by ukazovalo na různou citlivost cytochromů P450 exprimovaných v prokaryotních systémech s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy na přítomnost kontaminant v přidávaných složkách.

Schopnost cytochromů P450 v rekonstituovaném systému oxidovat ellipticin na metabolity je závislá na poměru cytochromu P450 k NADPH:CYP reductase, a je důležité, aby tento poměr byl optimální. Z výše uvedených údajů je zřejmé, že účinnost oxidace ellipticinu cytochromy P450 2D6, ev. 3A4 exprimovanými v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy rekonstituovanými s přidávanou NADPH:CYP reductasou se zvyšuje se vzrůstajícím množstvím NADPH:CYP reductasy do poměru CYP ku NADPH:CYP reductase 1:0,8, ev. 1:0,5. Další, ale nesignifikantní nárůst byl pozorován za použití poměru cytochrom P450 ku NADPH:CYP reductase 1:1, ev. 1:0,8 a 1:1.

Z výsledků této práce vyplývá, že najít univerzální expresní systém lidských cytochromů P450 je velmi obtížné. Je důležité si uvědomit, že metabolismu xenobiotika se účastní nejen cytochromy P450, ale důležitou roli zde hraje také NADPH:CYP reductasa, resp. poměr NADPH:CYP reductasy ku cytochromu P450, dále cytochrom b_5 a také i přítomnost kontaminant v jednotlivých enzymových preparátech.

6. Souhrn a závěr

Předkládaná diplomová práce sleduje dva základní aspekty:

- (1) Srovnává efektivitu lidských cytochromů P450 exprimovaných v eukaryotních a prokaryotních systémech oxidovat ellipticin.
- (2) Zjišťuje vhodnost testovaných systémů lidských cytochromů P450 exprimovaných v eukaryotních a prokaryotních systémech pro studium metabolismu xenobiotik.

Nejdůležitější poznatky zjištěné v diplomové práci lze shrnout následovně:

- Lidské cytochromy P450 2C9, 2C19 a 2D6 exprimované v eukaryotním (membrána hmyzích buněk) i prokaryotním (membrána buněk *E. coli*) systému katalyzují oxidaci ellipticinu na čtyři metabolity: 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a N^2 -oxid ellipticinu (M5).
- V oxidaci modelového xenobiotika ellipticinu jsou ze studovaných cytochromů P450 nejúčinnější rekombinantní cytochromy P450 exprimované v prokaryotním systému s vyšší hladinou NADPH:CYP reduktasy, a to především 2C19 > 2D6 >> 2C9. Naopak jako nejméně účinné cytochromy P450 se v oxidaci ellipticinu projeví cytochromy P450 2C9/2C19/2D6 exprimované v prokaryotním systému s nižší hladinou reduktasy. Z testovaných cytochromů P450 se jako vhodnější v oxidaci ellipticinu ukázaly cytochromy P450 exprimované v prokaryotním systému s vyšší hladinou NADPH:CYP reduktasy, než cytochromy P450 exprimované v eukaryotním systému. Tento závěr zjištěný pro oxidaci ellipticinu však nelze zobecnit pro další substráty studovaných enzymů. Vždy totiž záleží na konkrétním xenobiotiku, které je studováno, a na použitém cytochromu P450.
- Cytochrom b_5 ovlivňoval množství i poměrné zastoupení jednotlivých metabolitů ellipticinu v reakcích katalyzovaných cytochromy P450 2C9/2C19/2D6 exprimovanými v různých expresních systémech. Za přítomnosti cytochromu b_5 nejúčinněji katalyzují oxidaci ellipticinu lidské cytochromy P450 2C9/2C19/2D6 exprimované v prokaryotním systému s vyšší hladinou NADPH:CYP reduktasy, a to v pořadí 2D6 > 2C19 >> 2C9. Z testovaných expresních systémů se jako nejméně vhodné ukázaly v tomto případě (za přítomnosti cytochromu b_5) cytochromy P450 2C9/2C19/2D6 exprimované v eukaryotním systému.

- Schopnost cytochromů P450 v rekonstituovaném systému oxidovat ellipticin je závislá na poměru cytochromu P450 ku NADPH:CYP reductase. Účinnost CYP2D6 exprimovaného v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy v oxidaci ellipticinu se zvyšuje s rostoucím množstvím NADPH:CYP reductasy do poměru cytochrom P450 ku reductase 1:0,8. V případě CYP3A4 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy se jako optimální poměr cytochromu P450 ku reductase jeví poměr 1:0,8.
- Vlivem cytochromu b₅ dochází ke změně v zastoupení jednotlivých metabolitů ellipticinu, tvořených cytochromem P450 2D6 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy rekonstituovaným s přidanou NADPH:CYP reductasy, a to ve prospěch aktivačních metabolitů 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu. Naopak cytochrom b₅ snižuje oxidaci ellipticinu na 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin cytochromem P450 3A4 exprimovaném v prokaryotním systému s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy ve výše uvedeném rekonstituovaném systému.

7. Seznam použité literatury

1. Anzenbacher P., Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **58** (2001) 737-747.
2. Auclair C. Multimodal action of antitumor agents on DNA: the ellipticine series. *Arch. Biochem. Biophys.* **259** (1987) 1-14.
3. Bořek-Dohalská L., Frei E., Stiborová M. DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine and its hydroxyderivates in human breast adenocarcinoma MCF-7 cell. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **69** (2004) 603-615.
4. Coon M. J., Ding X., Pernecky S. J., Vaz A. D. N. Cytochrome P450: progress and prediction. *FASEB J.* **6** (1992) 669-673.
5. Edwards R. J., Murray B. P., Singleton A. M., Boobis A. R. Orientation of cytochromes P450 in the endoplasmatic reticulum. *Biochem.* **30** (1991) 71-76.
6. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice, program SVOD (2011), http://www.svod.cz/graph/?sessid=gqh3dcslo6dd74jihtakqmkls7&typ=incmor&diag=C50,D05&pohl=z&kraj=&vek_od=1&vek_do=18&zobrazeni=graph&incidence=1&mortalita=1&mi=0&vypocet=w&obdobi_od=1977&obdobi_do=2010&stadium=&t=&n=&m=&pt=&pn=&pm=&t=&n=&zije=&umrti=&lecba=## (14. 2. 2013)
7. Fossé P., René B., Charra M., Paoletti C., Saucier J. M. Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by ellipticine derivatives: structure-activity relationship. *Mol. Pharmacol.* **42** (1992) 590-595.
8. Goodwin S., Smith A. F., Horning E. C. Alkaloids of *Ochrosia elliptica* Labill.¹. *J. Am. Chem. Soc.* **81** (1959) 1903-1908.
9. Gonzalez F. J., Kimura S., Tamura S., Gelboin H. V. Expression of mammalian cytochrome P450 using baculovirus. *Methods Enzymol.* **206** (1991) 93-99.
10. Gut I., Souček P., Hodek P. Monooxygenázy závislé na cytochromu P450: Jedinečné aktivační a detoxikační systémy. *Prac. Lék.* **1** (1992) 15-20.
11. Hägg M., Berndtsson M., Mandic A., Zhou R., Shoshan M. C., Linder S. Induction of endoplasmic reticulum stress by ellipticine plant alkaloids. *Mol. Cancer Ther.* **3** (2004) 489-497.
12. Hampl F., Rádl S., Paleček J. *Farmakochemie*. VŠCHT (2007) 450 s. ISBN 978-80-7080-639-5.
13. <http://www.onkoforum.cz/> [4. 1. 2013]

14. http://www.safcglobel.com/medium/prodimages/c/c3499_1.jpg [16. 3. 2013]
15. <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S157096391000186X-gr1.sml>
[16. 3. 2013]
16. <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S157096391000186X-gr3.sml>
[17. 3. 2013]
17. http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_redox1.gif [17. 3. 2013]
18. <http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~xraylab/research/image15.jpg> [22. 3. 2013]
19. <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/> [1. 2. 2013]
20. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cb/PDB_1cyo_EBI.jpg
[21. 3. 2013]
21. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/ee/Ochrosia_borbonica_02.JPG/1280px-Ochrosia_borbonica_02.JPG [23. 2. 2013]
22. Hynie S. *Speciální farmakologie*. 2. Karolinum (2003) 166 s. ISBN 80-246-0656-9.
23. Hynie S. *Farmakologie v kostce*. Triton (2001) 520 s. ISBN 80-725-4181-1.
24. Chadwick M., Silveira D. M., Platz B. B., Hayes D. Comparative physiological disposition of ellipticine in several animal species after intravenous administration. *Drug Metab. Dispos.* **6** (1978) 528-541.
25. Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M. Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chem. Listy* **95** (2001) 212-222.
26. Chu Y., Hsu M. T. Ellipticine increases the superhelical density of intracellular SV40 DNA by intercalation. *Nucleic Acids Res.* **20** (1992) 4033-4038.
27. IARC, International Institute for Research on Cancer. <http://www.iarc.fr/> [13. 2. 2013]
28. Iyanagi T. Structure and function of NADPH-cytochrome P450 reductase and nitric oxide synthase reductase domain. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **338** (2005) 520-528
29. Juret P., Tanguy A., Girard A., Le Talaer J. Y., Abbattu J. S., Dat-Yuong, Le Pecq J. B., Paoletti C. [Hydroxy 9-methyl 2-ellipticinium acetate (NSC 264-137). Toxicologic study and therapeutic effect in 100 cancers]. *Toxicologic study and therapeutic effect in 100 cancers. Nouv. Presse Med.* **8** (1979) 1495-1498.
30. Klener P. Úspěšnost léčby nádorových onemocnění cytostatiky. *Vesmír* **4** (1994) 205.
31. Klener P. *Protinádorová chemoterapie*. Galén (1996) 614 s. ISBN 80-858-2436-1

32. Klener P. *Základy klinické onkologie*. Galén (2011) 96 s. ISBN 978-80-7262-716-5.
33. Knejzlík Z., Káš J., Ruml T. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. Listy* 94 (2000) 913-918.
34. Kroftová N. *Bakalářská práce*. PřF UK. Praha (2011)
35. Kotrbová V., Aimová D., Ingr M., Bořek-Dohalská L., Martínek V., Stiborová M. Preparation of a biologically active apo-cytochrome b₅ via heterologous expression in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 66 (2009) 203-209.
36. Kvasničková E., Rádl S., Paleček J. *Xenobiochemie*. Karolinum (1995) 49 s. ISBN 80-706-6993-4.
37. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.
38. Laursen T., Jensen K., Møller B. L. Conformational changes of the NADPH-dependent cytochrome P450 reductase in the course of electron transfer to cytochromes P450. *Biochim. Biophys. Acta.* 1814 (2011) 132-138.
39. Martínková E., Dontenwill M., Frei E., Stiborová M. Cytotoxicity of and DNA adduct formation by ellipticine in human U87MG glioblastoma cancer cells. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 30 (2009) 60-66.
40. Mathé G., Triana K., Pontiggia P., Blanquet D., Hallard M. and Morette C. Data of pre-clinical and early clinical trials of acriflavine and hydroxy-methyl-ellipticine reviewed, enriched by the experience of their use for 18 months to 6 years in combinations with other HIV1 virostatics. *Biomed. Pharmacother.* 52 (1998) 391-396.
41. Nebert D. W., Nelson D. R., Adesnik M., Coon M. J., Eshbrook R. W., Gonzales F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F., Kemper B., Levin W., Philips J. R., Sato R., Waterman M. R. The P450 superfamily – updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA* 8 (1989) 1-13.
42. Ohashi M., Sugikawa E., Nakanishi N. Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism. *Jpn. J. Cancer Res.* 86 (1995) 819-827.
43. Paoletti C., Le Pecq J. B., Dat-Xong N., Juret P., Garnier H., Amiel J. L., Rouesse J. Antitumor activity, pharmacology, and toxicity of ellipticines, ellipticinium, and 9-hydroxy derivatives: preliminary clinical trials of 2-methyl-9-hydroxy ellipticinium. *Recent Results Cancer Res.* 74 (1980) 107-123.

44. Poljaková J., Frei E., Gomez J. E., Aimová D., Eckschlager T., Hraběta J., Stiborová M. DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human leukemia HL-60 and CCRF-CEM cells. *Cancer Lett.* 252 (2007) 270-279.
45. Poljaková J., Frei E., Gomez J. E., Aimová D., Eckschlager T., Hraběta J., Stiborová M. The mechanism of cytotoxicity and DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human neuroblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 77 (2009) 1466-1479.
46. Porter T. D., Larson J. R. Expression of mammalian P450s in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 206 (1991) 108-116.
47. Porter T. D. The roles of cytochrome b₅ in cytochrome P450 reactions. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16 (2002) 311–316.
48. Purnapatre K., Khattar S. K., Saini K. S. Cytochrome P450s in the development of target-based anticancer drugs. *Cancer Lett.* 259 (2008) 1-15.
49. Rouësse J. G., Le Chevalier T., Caille P., Mondesir J. M., Sancho-Garnier H., May-Levin F., Spielmann M., De Jager R. and Amiel J. L. Phase II study of elliptinium in advanced breast cancer. *Cancer. Treat. Rep.* 69 (1985) 707-708.
50. Rusek V. *Základy toxikologie a úvod do problematiky hygieny a bezpečnosti práce v chemické laboratoři*. Univerzita Pardubice (2001) 125s.
51. Schenkman J. B., Jansson I. The many roles of cytochrome b₅. *Pharmacol. Ther.* 97 (2003) 139-152.
52. Schwaller M. A., Allard B., Lescot E., Moreau F. Protonophoric activity of ellipticine and isomers across the energy-transducing membrane of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 22709-22713.
53. Slíva J., Votava M. *Farmakologie*. Triton (2010) 238 s. ISBN 978-807-3874-247.
54. Stibor I. Interkalace planárních molekul s nukleovými kyselinami-interkalace. (2009). http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CDIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.uochb.cas.cz%2FZpravy%2FPostGrad2005%2F7_Stibor.pdf&ei=k9tzUZ3fM8fPtQao_ICgDg&usg=AFQjCNE0i3I4l6WI-dyzD2lpm8zHPnmWag&bvm=bv.45512109,d.Yms [25. 3. 2013]
55. Stiborová M., Mikšanová M. Molekulární mechanismus kancerogeneze. *Živa* 4 (1999) 146-148.
56. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy* 93 (1999) 229-237.

57. Stiborová M., Bieler C. A., Wiessler M., Frei E. The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochem. Pharmacol.* 62 (2001) 675-684.
58. Stiborová M., Breuer A., Aimová D., Stiborová-Rupertová M., Wiessler M., Frei E. DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in rats determined by ³²P-postlabeling. *Int. J. Cancer* 107 (2003) 885-890.
59. Stiborová M., Hudeček J., Páca J. Jr., Martínek V., Páca J. Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy* 98 (2004a) 876-890.
60. Stiborová M., Sejbal J., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Poljaková J., Forsterová K., Rupertová M., Wiesner J., Hudeček J., Wiessler M., Frei E. The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N²-oxide. *Cancer Res.* 64 (2004b) 8374-8380.
61. Stiborová M. Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace. Sborník s multioborového semináře „Otevřená věda“ (2005). http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CDIQFjAA&url=http%3A%2F%2Farchiv.otevrena-veda.cz%2Fusers%2Fimage%2Fdefault%2FC2Seminare%2FMultiObSem%2F001.pdf&ei=itxzUfWoGIWNtQam04Bw&usg=AFQjCNERs_netL4gMEszQxr39uSyZ-P-dw&bvm=bv.45512109,d.Yms [10. 10. 2012]
62. Stiborová M., Rupertová M., Schmeiser H. H., Frei E. Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 150 (2006a) 13-23.
63. Stiborová M., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Kotrbová V., Kukačková K., Janouchová K., Rupertová M., Ryšlavá H., Hudeček J., Frei E. Oxidation pattern of the anticancer drug ellipticine by hepatic microsomes - similarity between human and rat systems. *Gen. Physiol. Biophys.* 25 (2006b) 245-261.
64. Stiborová M., Poljaková J., Ryšlavá H., Dračinský M., Eckschlager T., Frei E. Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates forming deoxyguanosine adducts in DNA identical to those found *in vivo* and generated from 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine. *Int. J. Cancer* 120 (2007a) 243-251.

65. Stiborová M., Rupertová M., Aimová D., Ryšlavá H., Frei E. Formation and persistence of DNA adducts of anticancer drug ellipticine in rats. *Toxicol.* 236 (2007b) 50-60.
66. Stiborová M., Arlt V. M., Henderson C. J., Wolf C. R., Kotrbová V., Moserová M., Hudeček J., Phillips D. H., Frei E. Role of hepatic cytochromes P450 in bioactivation of the anticancer drug ellipticine: studies with the hepatic NADPH:cytochrome P450 reductase null mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 226 (2008) 318-327.
67. Stiborová M., Rupertová M., Frei E. Cytochrome P450- and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* 1814 (2011) 175-185.
68. Stratil P., Kubáň V. Princip karcinogeneze a přírodní karcinogenní sloučeniny v potravinách. *Chem. Listy* 98 (2004) 379-387
69. Šulc M. *Disertační práce*. PřF UK. Praha (2002)
70. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. *Novotvary 2009*. <http://www.uzis.cz/publikace/novotvary-2009> [15. 3. 2013]
71. Velick S. F., Strittmatter P. The oxidation–reduction stoichiometry and potential of microsomal cytochrome. *J. Biol. Chem.* 221 (1956) 265–275.
72. Vergeres G., Waskell L. Cytochrome b₅, its functions, structure and membrane topology. *Biochim.* 77 (1995) 604–620.
73. Wang M., Roberts D. L., Paschke R., Shea T. M., Masters B. S., Kim J. J. Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 8411-8416.
74. Voet D., Voetová J. G. *Biochemie*. Victoria Publishing a.s. Praha (1995) 227-228.
75. Zdravě.cz. <http://rakovina-nador.zdrave.cz/svetovy-den-boje-proti-rakovine/> [20. 2. 2013]

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka