

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Eubica Orlovská

Endokrinní disruptory a jejich vliv na expresi cytochromu P450 1A2

The influence of endocrine disruptors on the expression of cytochrome P450 1A2

Bakalářská práce

Vedoucí práce: **RNDr. Helena Dračínská, Ph.D.**

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Heleny Dračínské, Ph.D. a že jsem všechny použité informační zdroje a literaturu řádně citovala.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D. za cenné odborné rady při sepisování této práce, za trpělivost, ochotu a hlavne čas, který mi věnovala během celé naší spolupráce.

Abstrakt

Termín „endokrinní disruptor“ se používá pro sloučeniny, které napodobují nebo antagonizují účinky endogenních hormonů, mění syntézu a metabolismus přirozených hormonů nebo modifikují hladiny hormonálních receptorů. Syntetický estrogen 17 α -ethinylestradiol (EE2) a karcinogenní látka znečišťující životní prostředí, benzo[*a*]pyren (BaP), patří do skupiny chemikálií, které jsou označeny jako exogenní sloučeniny s endokrinní destrukcí, zatímco estrogenový hormon 17 β -estradiol (EST) je přírodní endogenní endokrinní disruptor.

V bakalářské práci byl studován vliv těchto endokrinních disruptorů a jejich kombinací na expresi a specifickou aktivitu CYP1A2. V rámci této práce byla izolována RNA z plic potkanů nepremedikovaných a premedikovaných uvedenými endokrinními disruptory. Metodou reverzní transkripce byla RNA převedena na cDNA. Relativní zastoupení CYP1A2 bylo kvantifikováno metodou kvantitativní PCR v játrech, ledvinách a plicích. Ve vzorcích mikrosomální frakce jater byla stanovena míra exprese CYP1A2 metodou Western blot s následnou imunodetekcí. Nakonec byla v játrech stanovena specifická aktivita CYP1A2 měřením *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu.

Bylo potvrzeno, že BaP indukuje genovou expresi CYP1A2 v játrech, ledvinách a plicích, a to i v kombinaci s EE2 a EST. Oba estrogény nicméně snižují indukční potenciál BaP. Při samotném podání oba estrogenní endokrinní disruptory významně snižují genovou expresi CYP1A2 v játrech premedikovaných potkanů, EE2 i v ledvinách. V jaterní tkáni bylo na úrovni proteinu indukováno zvýšené množství CYP1A2 po podání BaP a BaP v kombinacích s estrogény. Specifická aktivita CYP1A2 odpovídala výsledkům z proteinové exprese. Nicméně při stanovení specifické aktivity nebylo pouze u premedikace EST zjištěno zvýšení aktivity CYP1A2 v játrech laboratorních potkanů. U premedikací s EE2 a jeho kombinací s EST ovšem došlo k nárůstu enzymové aktivity CYP1A2 pouze ve velmi malé míře.

CYP1A2 se účastní metabolické aktivace nebo inaktivace mnohých karcinogenů a léčiv. Změny v expresi CYP1A2 vyvolané studovanými endokrinními disruptory mohou tedy vést k ovlivnění biotransformace různých xenobiotik a měnit tak jejich účinek na organismus.

Klíčová slova: benzo[*a*]pyren, 17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol, endokrinní disruptory, CYP1A2, exprese, specifická aktivita

Abstract

The term endocrine disruptor is used for chemical compounds which imitate or antagonize the effects of endogenous hormones, alter hormone synthesis and metabolism or modify levels of hormonal receptors. Synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol (EE2) and carcinogenic substance benzo[*a*]pyrene (BaP) belong to the group of chemicals described as exogenic compounds with endocrine destruction, while estrogenic hormone 17 β -estradiol (EST) figures as natural endogenous endocrine disruptor.

The bachelor thesis focuses on study of the influence of these endocrine disruptors and their combinations on expression and specific activity of CYP1A2. RNA was isolated from the lungs of rats treated with the endocrine disruptors and from untreated rats. RNA was converted to cDNA by reverse transcription. Relative amount of CYP1A2 in livers, kidneys and lungs was quantified by real-time PCR. The protein expression of CYP1A2 was studied using the Western blot with consecutive immunodetection. Finally, the specific activity of hepatic CYP1A2 was determined by measuring 7-methoxyresorufin *O*-demethylation.

It was confirmed that BaP induces gene expression of CYP1A2 in livers, kidneys and lungs, even in combination with EE2 and EST. However, both estrogens decrease the induction potential of BaP. When given individually, both estrogenic endocrine disruptors significantly reduce gene expression of CYP1A2 in the livers of treated rats and EE2 even in the kidneys. Analysis of CYP1A2 levels present in the liver tissue showed increased amount of the protein after exposure to BaP and BaP in combination with both estrogens. CYP1A2 specific activity corresponded to the results of protein expression. Nevertheless, only pre-treatment of rats with EST caused no changes in the activity of hepatic CYP1A2, while the application of sole EE2 and EE2 in combination with EST led only to a very slight increase in 7-methoxyresorufin demethylation in comparison to control rats.

CYP1A2 is involved in metabolic activation or inactivation of many carcinogens and drugs. The changes in the expression of CYP1A2 induced by the endocrine disruptors used in this thesis might thus influence the biotransformation of these xenobiotics and thereby modify their biological effects.

Keywords: benzo[*a*]pyrene, 17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol, endocrine disruptors, CYP1A2, expression, specific activity

Obsah

1 Úvod a přehled literatury	9
1.1 Endokrinní disruptory	9
1.1.1 Estrogeny a sloučeniny s estrogením účinkem.....	10
1.1.2 17 α -ethinylestradiol (EE2)	11
1.1.2.1 Metabolismus 17 α -ethinylestradiolu	12
1.1.3 Benzo[<i>a</i>]pyren (BaP).....	13
1.1.3.1 Metabolismus benzo[<i>a</i>]pyrenu	14
1.2 Cytochromy P450.....	15
1.2.1 Struktura cytochromu P450	16
1.2.2 Cytochrom 1A2 a jeho vztah k ED BaP a EE2	17
2 Cíl práce.....	19
3 Materiál a metody	20
3.1 Materiál	20
3.1.1 Použité chemikálie a rozpouštědla	20
3.1.2 Použité přístroje.....	21
3.2 Metody	24
3.2.1 Premedikace potkanů.....	24
3.2.2 Izolace RNA	25
3.2.3 Elektroforéza na agarosovém gelu	26
3.2.4 Stanovení koncentrace a čistoty RNA	26
3.2.5 Syntéza cDNA – reverzní transkripce	27
3.2.6 Real-Time PCR (qPCR)	28
3.2.7 Diskontinuální elektroforéza SDS PAGE	29
3.2.8 Přenos proteinů metodou „Western blot“ a imunodetekce CYP1A2	31
3.2.9 <i>O</i> -demethylace 7-methoxyresorufinu (MROD)	32

4 Výsledky a diskuse	34
4.1 Izolace RNA.....	34
4.2 Genová exprese CYP1A2	35
4.3 Proteinová exprese CYP1A2.....	39
4.4 Stanovení aktivity CYP1A2.....	41
5 Závěr	44
6 Seznam literatury	45

Seznam použitých zkratek

AhR	aryl hydrocarbon receptor; receptor aromatických uhlovodíků
ALP	alkalická fosfatasa
APS	persíran amonný
BaP	benzo[<i>a</i>]pyren
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
BIS	N,N'-methylen-bis-akrylamid
CTRL	kontrolní premedikační skupina
CYP	cytochromy P450
ED	endokrinní disruptory
EE2	17 α -ethinylestradiol
ER	estrogenní receptory
EST	17 β -estradiol
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
IgG-AP	sekundární protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatasou
MROD	<i>O</i> -demethylace 7-methoxyresorufínu
NADPH	nikotinamidadenin dinukleotidfosfát (redukovaná forma)
NBT	nitro blue tetrazolium chlorid
PBS-Triton	phosphate-buffered saline with Triton; fosfátový pufr se zvýšenou iontovou silou
PVDF	polyvinyliden fluorid
qPCR	quantitative polymerase chain reaction; metoda kvantitativní PCR
RT	reverzní transkriptasa
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid
Wb	Western blotting; metoda Western blot
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem

1 Úvod a přehled literatury

V posledních dvou desetiletích postupně vzrostlo povědomí o možnosti narušení endokrinního systému vlivem vystavení člověka a volně žijících živočichů chemickým látkám. Tyto cizorodé látky jsou schopné napodobit přirozené hormony nebo interferovat s působením endogenních hormonů, a tak způsobit různé ekologické a zdravotní problémy. Nazýváme je endokrinní disruptory (ED)¹. Jedná se o chemické sloučeniny, které se hojně využívají v průmyslu a zemědělství². Mezi nejvýznamnější látky této skupiny patří estrogeny nebo sloučeniny s estrogení aktivitou³. Velké riziko těchto látek spočívá v tom, že ovlivňují hormonální systém živočichů. V této souvislosti se v dnešní době ve velké míře sleduje účinek hormonální antikoncepce na organismus¹. Dlouhodobý výzkum mnoha světových laboratorí jednoznačně prokázal přítomnost endokrinních disruptorů v životním prostředí. Jedním z nejvýznamnějších zdrojů ED jsou komunální čistírny odpadních vod⁴.

1.1 Endokrinní disruptory

Endokrinní disruptory jsou definovány jako exogenní látky, které napodobují účinek přirozeně se vyskytujících hormonů. Můžeme je rozdělit do dvou základních skupin, na přirozené a na syntetické⁵. Detailněji je můžeme klasifikovat na velkou skupinu sloučenin antropogenního původu (některá léčiva, pesticidy, průmyslové chemikálie, produkty spalování) a přírodního původu (fytoestrogeny, mykoestrogeny, hormony)⁶. Mechanismus jejich působení je velice pestrý. Mohou přímo ovlivnit biosyntézu, transport, sekreci nebo eliminaci přirozených hormonů a tím narušit vazbu a účinek přirozených hormonů, které jsou zodpovědné za udržení homeostázy a chování živočichů^{5,7}. Mezi negativní vlivy, které byly prokázány u lidí vystavených působení ED, patří zvýšené riziko vzniku rakoviny a neplodnost⁸. U vyšších organismů dále ovlivňují vývoj plodu⁷ a narušují vývoj nervového systému a imunitních odpovědí⁹. V neposlední řadě jsou zodpovědné za feminizaci samců u ryb^{4,10}.

V současné době se klade velká pozornost na studium ED, které znečišťují vodní ekosystém. Do odpadní vody se tyto látky dostávají lidskou močí¹¹, z přípravků pro osobní hygienu, kosmetických přípravků aj. Významným zdrojem látek s estrogením účinkem je i odpad z chovu hospodářských zvířat¹². Hlavním faktorem ovlivňujícím účinnost odstraňování znečišťujících látek z vody je jejich schopnost interagovat s pevnými částicemi, přírodními (hlína, sedimenty, mikroorganismy) nebo přidávanými do média

(aktivní uhlí, koagulanty), díky čemuž je usnadněno jejich odstranění usazováním či flotací nebo pomocí biodegradace¹³.

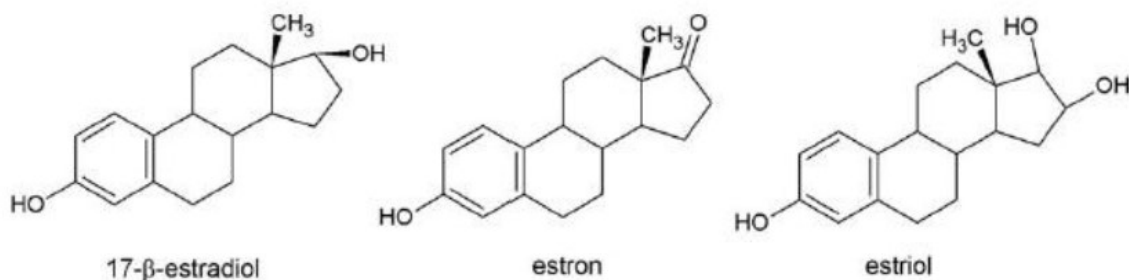
Tato práce se zabývá endogenním ED 17 β -estradiolem (EST) a dvěma exogenními ED, 17 α -ethinylestradiolem (EE2) a benzo[*a*]pyrenem (BaP).

1.1.1 Estrogeny a sloučeniny s estrogením účinkem

Skupina těchto látek je známá tím, že se řadí mezi steroidy přirozeně se vyskytující v organismu a působící jako environmentální polutanty¹⁴. Ve své struktuře obsahují aromatický kruh, který má velkou afinitu k estrogením receptorům. Dále mají dva cyklohexanové kruhy a jeden kruh cyklopentanový¹⁵. Mezi nejdůležitější zástupce patří tři přirozené estrogeny: estron (E1), 17 β -estradiol (EST), estriol (E3), které vykonávají funkce nezbytné pro správný vývoj, růst a udržování reprodukčních orgánů¹⁶. Uvedené estrogeny jsou tvořeny 18-ti atomy uhlíku (obr. 1, str. 11).

V případě perorálního podání je značná část 17 β -estradiolu metabolizována v gastrointestinálním traktu na estron. Po absorpci z tenkého střeva vstupuje částečně metabolizovaný i nemetabolizovaný 17 β -estradiol do portální žíly krve, která prokrvuje játra, kde se vyskytují mnohé biotransformační enzymy jako hydroxylasy, methyltransferasy, sulfuryl či glukuronyltransferasy a transformují 17 β -estradiol na různé metabolity. Metabolismus zahrnuje hlavně hydroxylaci v různých pozicích steroidního kruhu, nejčastěji v pozicích 2, 4 a 16¹⁷. Mechanismus působení estrogenů je velmi dobře prozkoumaný. Nejprve dojde k navázání těchto látek na specifické estrogení receptory (ER), ligandem aktivované ER se dimerizují a přemístí se do jádra. Dochází k modulaci transkripce DNA klíčových genů, které mají ve svém promotoru oblasti specifické vůči působení receptoru^{18,19}.

Estrogeny jsou vylučovány do značné míry v žluči a částečně reabsorbovány ze střeva¹⁷. Ačkoli jsou vylučované jako biologicky neaktivní konjugáty, v odpadních vodách mohou být přeměněny na aktivní formu pomocí bakterií²⁰. V důsledku neúplného odstranění během procesu zpracování odpadu se 17 β -estradiol a jeho syntetický derivát 17 α -ethinylestradiol stávají hlavními přispěvateli estrogení aktivity v životním prostředí^{3,14}.

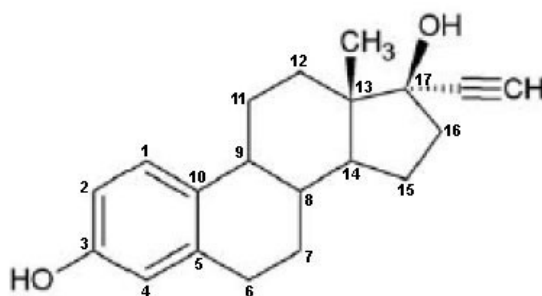


Obrázek 1: Struktura endogenních estrogenů.

1.1.2 17 α -ethinylestradiol (EE2)

Syntetickému estrogenu 17 α -ethinylestradiolu je v poslední době věnována velká pozornost, protože je jedním z nejúčinnějších estrogenů v životním prostředí (obr. 2, str.12). Vzhledem ke své vysoké odolnosti vůči procesu biodegradace působí tato biologicky aktivní látka negativně na životní prostředí. EE2 je derivátem přirozeného hormonu 17 β -estradiolu a používá se jako hlavní složka kombinované hormonální antikoncepce. Kromě antikoncepce se EE2 využívá jako lék při hormonální substituční terapii pro léčbu osteoporózy, menstruačních poruchách, rakovině prostaty a menopauze³. EE2 je aktivní farmaceutickou látkou v pěti lécích, které byly podle průzkumu zařazeny mezi 200 nejprodávanějších léků¹⁷.

Hlavním důvodem zvýšené pozornosti spojené s EE2 je jeho přítomnost v povrchových vodách, kam se dostává po průchodu čistírnami odpadních vod. Mnohé studie se proto zaměřují na možnosti odstranění této sloučeniny právě z vodního ekosystému¹⁰. Bylo prokázáno, že schopnost EE2 negativně ovlivnit některé vodní živočichy se projevuje již při stopových koncentracích (ng/l)¹⁰. Jedním z jeho negativních účinků ve vodním ekosystému je feminizace samců ryb. Rovněž ovlivňuje změny chování vodních živočichů, snižuje u nich kvalitu gamet, způsobuje sníženou produkci spermií ryb³. Techniky čištění vody jako je UV záření nebo aktivní uhlí mohou významně pomoci k odstranění tohoto endokrinního disruptoru²¹. Rychlost degradace EE2 je závislá i na pH²².

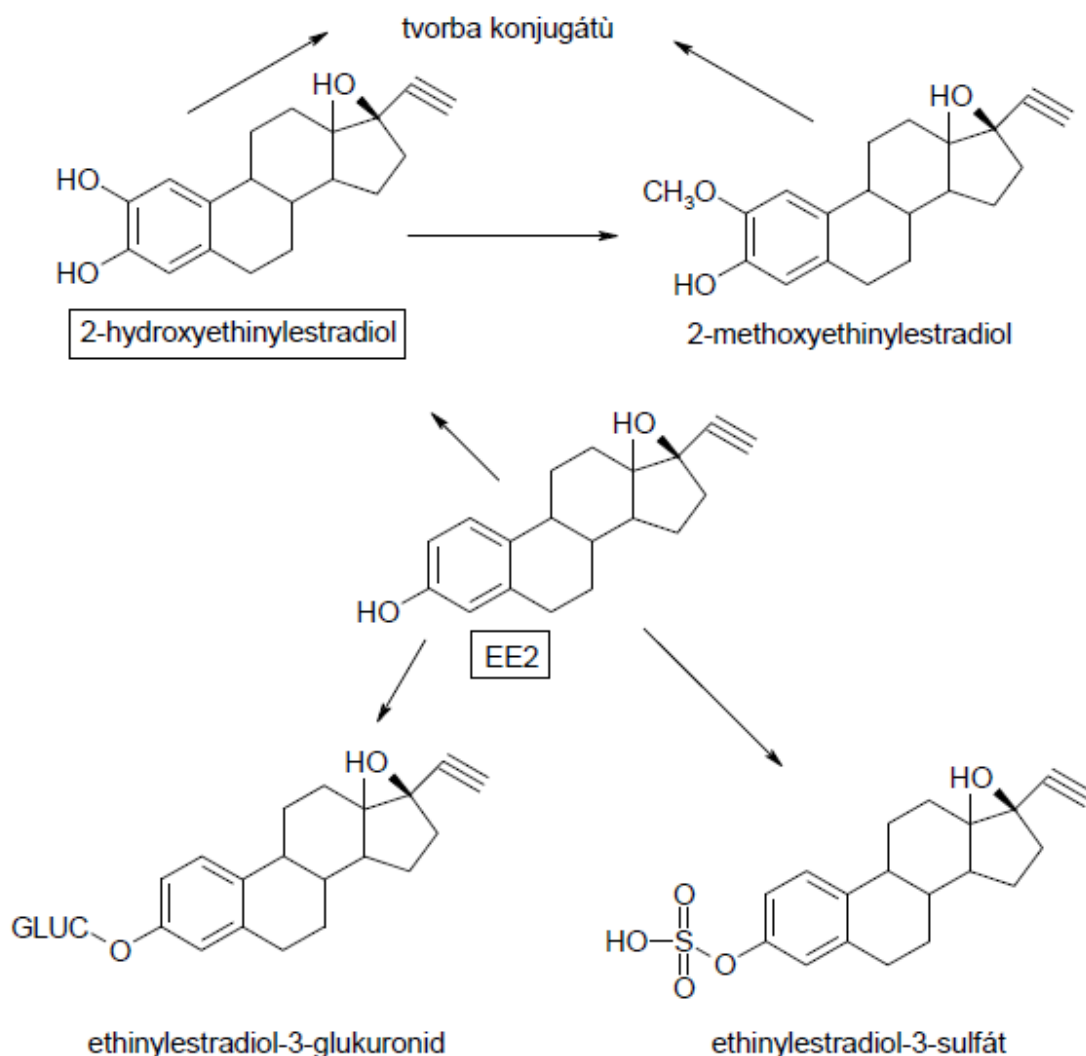


Obrázek 2: Struktura 17 α -ethinylestradiolu.

1.1.2.1 Metabolismus 17 α -ethinylestradiolu

Vzhledem k tomu, že metabolismus EE2 probíhá více způsoby a vzhledem k negativnímu působení tohoto disruptoru, je znalost průběhu metabolismu velmi důležitá. Hlavní metabolická cesta v lidském organismu probíhá v játrech. Prvním krokem přeměny jsou hydroxylační reakce, ke kterým dochází v poloze 2, 4, 6 a 16 steroidního jádra. Mezi nejvýznamnější enzymy katalyzující tyto reakce patří cytochromy P450 (viz dále, kapitola 1.2). Z těchto hydroxylačních reakcí je 2-hydroxylace kvantitativně nejdůležitější dráha metabolismu EE2. Primární oxidační produkt je 2-hydroxyethinylestradiol, který může být následně methylován za vzniku sekundárního metabolitu 2-methoxyethinylestradiolu (obr. 3, str. 13). Změny v rychlosti 2-hydroxylace mohou mít významný vliv na farmakokinetiku a účinnost EE2 jako složky antikoncepce²³. V menší míře jsou hydroxylovány produkty v pozicích 4 a 6¹⁷. Z důvodu sterického bránění ethinylové skupiny na C17 uhlíku k hydroxylaci EE2 na pozici C16 nedochází velmi často. Právě omezení 16-hydroxylace je příčinou rozdílů v metabolismu syntetického 17 α -ethinylestradiolu oproti přirozenému hormonu 17 β -estradiolu²³.

V játrech dochází ke konjugaci nemetabolizovaného EE2 a jeho hydroxylovaných metabolitů s kyselinou glukuronovou pomocí uridindifosfátglukuronosyltransferasy 1A1 anebo sulfataci za katalýzy sulfotransferasou 1E1²⁴ (obr. 3, str. 13). Tyto nově vzniklé sloučeniny rozpustné ve vodě jsou spolu se zbytkovým EE2 vylučovány močí a stolicí. Takto se dostávají do odpadních vod. Částečná degradace v čistírnách odpadních vod způsobuje jejich opětovnou aktivitu^{14,20}. EE2 může být účinně degradován bakteriemi za aerobních podmínek nebo mořskými vodními mikroorganismy. Další možností přeměny EE2 je degradace ligninolytickými houbami²⁵.

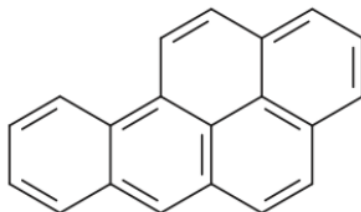


Obrázek 3: Metabolické přeměny EE2 v lidském organismu.

1.1.3 Benzo[*a*]pyren (BaP)

Benzo[*a*]pyren (obr. 4, str. 14) je významným ED přítomným ve značné míře ve všech sférách lidského působení. Patří do skupiny polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH). Do této skupiny patří více než 200 sloučenin s dvěma nebo více kondenzovanými benzenovými kruhy²⁶. Vznikají především nedokonalým spalováním nebo pyrolýzou organické hmoty a jsou všudypřítomné v životním prostředí²⁷. Díky svým toxickým, mutagenním a karcinogenním vlastnostem patří BaP mezi nejvýznamnější látky znečišťující životní prostředí²⁸. Ve stopovém množství se obvykle vyskytuje i ve vodě, půdě a v sedimentech²⁷. Kromě inhalace znečištěného vzduchu jsou hlavními cestami expozice tabákový kouř, potraviny a farmaceutické přípravky na bázi uhlého dehtu^{27,29}. BaP představuje jeden z primárních karcinogenů zodpovědných za vznik rakoviny kůže, žaludku

a plic³⁰. BaP je odpovědný za zvýšení exprese cytochromů P450 1A1 a 1A2. Tyto enzymy jsou indukovány prostřednictvím vazby BaP na receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR)²⁷.



Obrázek 4: Struktura benzo[*a*]pyrenu²⁷.

1.1.3.1 Metabolismus benzo[*a*]pyrenu

Metabolismus BaP je složitý a v procesu biotransformace vzniká množství metabolitů včetně hydroxylovaných meziproductů, epoxidů, chinonů, dihydrodiolů, dihydrodiol epoxidů³¹. BaP vyžaduje metabolickou aktivaci před uskutečněním reakce s DNA. Hlavní enzymy katalyzující metabolickou přeměnu BaP jsou cytochromy P450 a epoxidhydrolasa, které přeměňují BaP na karcinogenní metabolity²⁷. Ty interagují s DNA za vzniku DNA aduktů, které mají mutagenní a karcinogenní účinky^{26,30}.

Na obrázku 5 (str. 15) je popsána nejvýznamnější dráha aktivace BaP. Tento metabolismus probíhá v třech krocích a ve velké míře se na něm podílejí CYP1A1 a CYP1B1, zapojené do tvorby diolů a diolepoxidů, a epoxidhydrolasa. CYP1A2 se také podílí na metabolismu BaP, ale v menší míře než předchozí cytochromy²⁷.

Jedna z aktivačních drah tohoto metabolismu probíhá tak, že BaP je oxidován CYP1A1 na benzo[*a*]pyren-7,8-epoxid, který je následně přeměněn působením epoxidhydrolasy na klíčový metabolit benzo[*a*]pyren-7,8-dihydrodiol. V procesu sekundární epoxidace může být tento meziproduct metabolizován CYP1A1 a 1B1, kdy dochází k tvorbě reaktivního benzo[*a*]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxidu (BPDE), který může reagovat s DNA a tvořit kovalentní adukty na zbytecích purinů³⁰.

biochemiky a farmakology, kteří se zaměřili na studie oxidativního metabolismu léků. V lidském těle se vyskytují především v játrech, plicích a ledvinách, nicméně významné jsou i jejich hladiny v tenkém střevě, kůži, mozku a nadledvinkách³⁶.

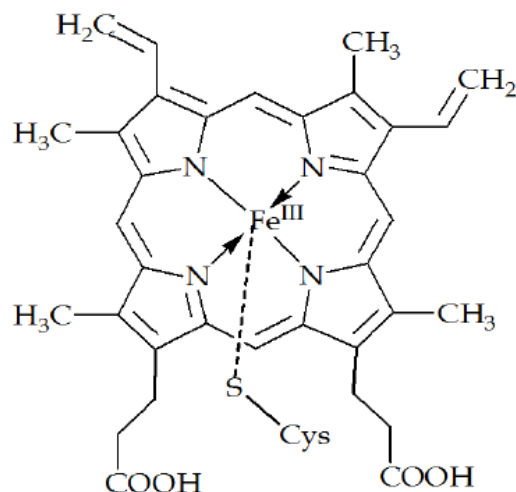
Název těchto enzymů byl odvozen od charakteristické absorpce redukovaného CYP v komplexu s CO při vlnové délce 450 nm. Písmeno P ve zkratce znamená pigment³⁵.

Cytochromy P450 jsou zařazeny do genetických rodin a podrodin podle míry homologie primární struktury jejich proteinových molekul. Rodiny cytochromů P450 jsou označovány prvním číslem za zkratkou P450. Následuje velké písmeno označující podrodinu. Jednotlivé izoenzymy jsou pak označeny číslem za písmenem podrodiny. Např. izoenzym CYP1A2 je členem podrodiny A patřící do enzymové skupiny 1. Do stejné rodiny patří CYP, u kterých byla nalezena více než 40% homologie aminokyselinové sekvence jejich proteinů, do stejné podrodiny pak ty, které vykazují homologii více než 60 %^{2,34}.

1.2.1 Struktura cytochromu P450

CYP obsahují porfyrinový skelet (protoporfyrin IX, obr. 6, str. 17) částečně vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu (pátý ligand železa protoporfyrinu IX). Toto uspořádání umožňuje výjimečné chování těchto hemoproteinů (odlišné spektrální a katalytické vlastnosti). Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody³⁴.

I když se aminokyselinová sekvence CYP liší podle rodin enzymů významně, prostorové uspořádání proteinových molekul je zřejmě velmi podobné (především v aktivním centru enzymu). N-terminální doména eukaryotických enzymů je odpovědná za vazbu těchto proteinů v membránách, v CYP prokaryotických organismů chybí³⁵.



Obrázek 6: Struktura hemu b³⁶.

1.2.2 Cytochrom 1A2 a jeho vztah k ED BaP a EE2

V rámci této bakalářské práce byla věnována pozornost cytochromu P450 1A2. Tento cytochrom je typickým jaterním enzymem³⁴, ale nachází se také v gastrointestinálním traktu, nosním epitelu, plicích, ledvinách, mozku, prostatě a kůži³⁷. Patří do rodiny CYP1, která se podílí na metabolismu endogenních hormonů, xenobiotik a léků³⁸. Je zajímavá díky své schopnosti metabolicky aktivovat a deaktivovat velké množství chemických karcinogenů^{39,40}. Příkladem prokarcinogenu aktivovaného CYP1A je benzo[*a*]pyren. Pro tuto podrodinu je hlavním zprostředkovatelem indukce AhR⁴¹. Hlavní rozdíl mezi izoformami této podrodiny spočívá v jejich různé lokalizaci v organismu.

CYP1A2 má širokou substrátovou specifitu. Hraje významnou roli v metabolismu kofeinu, dalšími významnými substráty jsou aromatické aminy, které vznikají jako pyrolytické produkty tepelné úpravy potravin³⁴. Pravidelnou konzumací těchto potravin následně dochází ke zvýšení jejich koncentrace v organismu. To může vést ke zvýšenému riziku vzniku nádorů⁴². Podílí se také ve velké míře na katabolismu environmentálních polutantů³⁹ a mnohých xenobiotik včetně léčiv, jako je např. teofylin³⁷. CYP1A2 hraje hlavní roli v metabolismu melatoninu v lidských jaterních mikrozomech. Melatonin je jedním z mnoha endogenních hormonů, jehož hladina je zvyšována působením EE2⁴³. Modulace aktivity tohoto enzymu může mít významné důsledky pro metabolismus léků⁴⁴.

Cytochromy podrodiny CYP1A jsou inducibilní enzymy vysoce indukované BaP přes AhR²⁴. Mezi tímto receptorem a BaP dochází ke vzniku specifické vazby, která vede k aktivaci AhR⁴⁵. Neaktivovaný protein AhR se nachází v cytosolu v proteinovém

komplexu⁴². Je aktivován navázáním ligandu na jednu ze tří domén, což vede ke konformační změně a rozpadu multiproteinového komplexu. Aktivovaný Ah receptor je translokován do jádra, kde dochází k interakci s ARNT proteinem (AhR nuclear translocator) za vzniku komplexu dvou molekul⁴⁶. Takto vytvořený AhR-ARNT komplex je schopen se vázat s vysokou afinitou na specifické elementy DNA, označované jako DRE/XRE (dioxin/xenobiotic response element) a prostřednictvím kofaktorů dochází ke změně genové exprese cílových genů (např. CYP1A1 a 1A2)⁴⁷.

CYP1A2 se účastní metabolismu steroidů³⁴. Do této skupiny látek spadá mimo jiné i skupina ženských pohlavních hormonů, estrogenů. CYP1A2 je jedním ze dvou důležitých enzymů katalyzujících hlavní metabolickou dráhu endogenního estradiolu, 2-hydroxylací⁴⁸. CYP1A2 také efektivně oxiduje estradiol v poloze 16 α v lidských jaterních mikrosomech⁴⁹. Indukční potenciál estradiolu na enzymy CYP je však stále málo prozkoumán. Syntetický derivát 17 β -estradiolu EE2 je reverzibilní inhibitor lidských cytochromů P450 1A1 a 1A2. Poměrně silná inhibice pomocí EE2 se projevila hlavně u CYP1A1⁴³.

V játrech, ledvinách a plicích krys BaP silně indukuje expresi izoformy CYP1A1, zatímco žádná významná indukce CYP1A1 se neprojevila působením EE2 nebo EST. Tyto estrogeny v kombinaci s BaP snižují indukční potenciál tohoto karcinogenu, takže v játrech premedikovaných potkanů snižují nárůst exprese CYP1A1 vyvolaný BaP⁴⁵. Vzájemné působení ED může tedy ovlivňovat expresi CYP a modulovat jejich biologickou účinnost.

2 Cíl práce

Bakalářská práce byla součástí grantového projektu Laboratoře molekulární karcinogeneze a vývoje léčiv nazvaného „Organismy a mechanismy určující osud endokrinních disruptorů v životním prostředí“. Úkolem bakalářské práce bylo studium vlivu endokrinních disruptorů benzo[*a*]pyrenu (BaP), 17 α -ethinylestradiolu (EE2), 17 β -estradiolu (EST) a jejich kombinací na expresi a specifickou aktivitu cytochromu P450 1A2 u potkanů *in vivo*.

Hlavní cíle práce byly:

Izolovat celkovou RNA z plic potkanů nepremedikovaných a premedikovaných výše uvedenými sloučeninami a jejich kombinacemi.

Převést izolovanou RNA pomocí reverzní transkripce na cDNA.

Metodou kvantitativní PCR porovnat genovou expresi CYP1A2 v orgánech laboratorních potkanů nepremedikovaných a premedikovaných endokrinními disruptory a jejich kombinacemi.

Pomocí metody Western blot s následnou imunodetekcí zjistit míru proteinové exprese CYP1A2 v mikrosomálních vzorcích a zastoupení enzymu v játrech jednotlivých premedikačních skupin potkanů.

Stanovit enzymovou aktivitu cytochromu P450 1A2 ve vzorcích mikrosomální frakce jater potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo[*a*]pyrenem, 17 α -ethinylestradiolem, 17 β -estradiolem a jejich kombinacemi.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie a rozpouštědla

Použité chemikálie a rozpouštědla pocházejí z těchto zdrojů:

Ambion, USA: Nuclease-Free Water

Applied Biosystems, USA: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, TaqMan Gene Expression Assays

BIO-RAD, USA: APS, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, TEMED

Fluka, Švýcarsko: 2-merkptoethanol, akrylamid, BIS, Tris-HCl

Gentest BD Bioscience, USA: potkaní rekombinantní CYP1A1 a CYP1A2 v Supersomech™

Invitrogen, USA: agarosa, Syber Green II, TRIzol Reagent

Laboratoř prof. RNDr. Petra Hodka, CSc.: slepičí protilátka proti cytochromu P450 1A2

Lach-Ner, ČR: ethanol, KH_2PO_4 , kyselina octová, methanol

Lachema, ČR: bromfenolová modř, EDTA, glycerol, chloroform, isopropanol, kyselina boritá, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

Laktino, ČR: sušené mléko

Linde, Česká republika: kapalný dusík

Loba-Chemie, Indie: Ponceau barva

Penta, ČR: ethanol, NaCl

Promega Corporation, USA: ALP, BCIP, NBT

Roche diagnostics GmbH, Německo: FastStart Essential DNA Probes Master

Serva, Německo: Coomassie brilliant blue R-250 (CBB), Triton X-100

Sigma-Aldrich, USA: Anti-chicken IgG (sekundární protilátka), Anti-rabbit IgG (sekundární protilátka), dodecylsulfát sodný (SDS), H₂O₂, králičí protilátka proti GAPDH, NADPH, resorufin, 7-methoxyresorufin

3.1.2 Použité přístroje

Analytické váhy:

40 SM-200 A Pesa, Švýcarsko

Aparatura pro metodu Western blot:

Fastblot B43 Biometra, Německo

Automatické pipety:

Eppendorf Multipette M4, Německo

Eppendorf, Německo

Nichiryo Nichipet EX, Japonsko

Centrifugy:

centrifuga 5415R, úhlový rotor Eppendorf, Německo

minicentrifuga Spectrafuge™, úhlový rotor Labnet, USA

Elektroforetická aparatura:

BIO-RAD, USA

Inkubátory:

Incubator mini Dry Bath MiniB-100 MIULAB, Čína

IR 1500 Flow Laboratories, Německo

Thermomixer Compact Eppendorf, Německo

Laminární box:

Labox

Luminiscenční spektrofotometr:

LS55 Perkin Elmer, USA

Magnetická míchačka:

Variomag Monotherm, Německo

PCR cycler:

Techne (Techgene)

Předvážky:

440-35N Kern, Německo

EW 600-2M Kern, Německo

PVDF membrána:

BIO RAD, USA

Real-time PCR cycler:

Rotor-Gene 2000 (Corbett Research)

Spektrofotometry:

Helios α

Sunrise Absorbance Reader TECAN, Švýcarsko

Transilluminator:

DarkReader DR-45M

Třepačky:

Mini rocker MR-1 Biosan, Lotyšsko
třepačka ČSAV vývojové dílny, ČR

Vortexy:

Genius 3 IKA, Německo
MS2 minishaker IKA, USA
Vortex Mixer VX-200 Labnet, USA

Zdroje napětí:

Electrophoresis Power Supply-EPS 301 Amersham Pharmacia Biotech, USA
PowerPac™ Basic Power Supply BIO RAD, USA

3.2 Metody

3.2.1 Premedikace potkanů

Potkani kmene Wistar byli vystavení účinku benzo[*a*]pyrenu (BaP), 17 α -ethinylestradiolu (EE2), 17 β -estradiolu (EST) a jejich kombinacím dle tabulky 1. Všechny látky byly rozpuštěné ve slunečnicovém oleji a jednorázově podávány laboratorním potkanům pomocí žaludeční sondy (gaváží). V každé premedikované skupině byli tři laboratorní potkani a v kontrolní skupině (CTRL) byl aplikován pouze slunečnicový olej.

Tabulka 1: Premedikace laboratorních potkanů.

Označení	Premedikační sloučenina
CTRL	kontrola
BaP	benzo[<i>a</i>]pyren
EE2	17 α -ethinylestradiol
EST	17 β -estradiol
BaP + EE2	benzo[<i>a</i>]pyren + 17 α -ethinylestradiol
BaP + EST	benzo[<i>a</i>]pyren + 17 β -estradiol
EE2 + EST	17 α -ethinylestradiol + 17 β -estradiol

Dávka: **BaP** 150 mg/kg hmotnosti potkana v 0,5 ml oleje
 EE2 20 mg/kg hmotnosti potkana v 0,5 ml oleje
 EST 20 mg/kg hmotnosti potkana v 0,5 ml oleje

Třetí den byla zvířata usmrcena a byly z nich odebrány orgány (játra, ledviny, plíce) a uchovány při teplotě -80 °C.

Experimenty byly prováděny v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (č. 509/2008 Sb.) a vyhláškou „O chovu a využití pokusných zvířat č. 419/2012 Sb.“ v prostoru Centra pro experimentální biomodely 1. LF UK (U nemocnice 478/5, Praha 5). Premedikace potkanů byla uskutečněna před zahájením bakalářské práce. V rámci této práce byly experimenty prováděny s již odebranými orgány.

3.2.2 Izolace RNA

Při izolaci RNA je potřebné dbát na to, aby nedošlo k poškození RNA, protože se rychle degraduje účinkem ribonukleas, které jsou všeobecnými kontaminanty vzorků, pomůcek a chemikálií. RNasy jsou navíc termostabilní, aktivitu si zachovávají i po vyčištění materiálu denaturačními činidly. Proto je nutné při práci s RNA pracovat sterilně a v rukavicích bez pudru.

Plastové mikrozkušavky a MilliQ H₂O byly sterilizované v autoklávu při teplotě 134 °C 20 minut. Třecí misky, tloučky, pinzety, špachtle a kádinky byly před použitím omyty 10% H₂O₂, zabalené do alobalu a vloženy do sušárny na 6 hodin při teplotě 180 °C. V den izolace byla 10% H₂O₂ očištěna pracovní plocha laminárního boxu (Flow-boxu) a do něj vloženy veškeré potřebné nástroje. Pipety, krabičky se špičky s filtrem a mikrocentrifuga byly ošetřeny 70% ethanolem a vloženy do Flow-boxu, který byl vysvícený UV světlem po dobu 15 minut.

Pro homogenizaci byly kousky plic potkanů z jedné premedikační skupiny spojeny dohromady. Ze společného homogenátu byly uskutečněny tři paralelní izolace RNA. Homogenizace probíhala ve třecí misce s tloučkem v přítomnosti tekutého dusíku. Jednotlivé vzorky byly převedeny do 1 ml činidla TRIzol™. Vzorky byly promíchány na vortexu a inkubovány při pokojové teplotě 5 minut.

V dalším kroku izolace bylo k homogenátu přidáno 200 µl chloroformu, vzorky byly 15 sekund třepány na vortexu, inkubovány při pokojové teplotě 3 minuty. Následovala centrifugace (centrifuga Eppendorf 5415R, 12 000 g, 4 °C, 15 minut), po které byla odebrána vrchní vodná fáze obsahující RNA do nových mikrozkušavek tak, aby nedošlo ke kontaminaci mezifází. Do vzorků bylo přidáno takové množství ledového isopropanolu, které odpovídalo objemu odebrané vodné fáze s RNA. Po 10min inkubaci při pokojové teplotě a následné centrifugaci (12 000 g, 4 °C, 15 minut) byl supernatant odstraněn a do jednotlivých mikrozkušavek bylo k peletě přidáno 750 µl 75% ethanolu. Vzorky byly promíchány na vortexu, proběhla centrifugace (7600 g, 4 °C, 5 minut), supernatant byl odstraněn odsátím pipetou a pelety byly vysušeny na termostatu 5 minut při 60 °C.

Na závěr byly vzorky ředěny vodou bez RNas („RNase free“ vodou), promíchány na vortexu a inkubovány 15 minut při 60 °C. Izolovaná RNA byla rozpipetována na aliquoty a uchována ve vysokomrazícím boxu při teplotě –80 °C.

3.2.3 Elektroforéza na agarosovém gelu

Erlenmayerova baňka, odměrné válce (50 a 500 ml) a MilliQ voda byly vyklávané. Nádoba na elektroforézu byla ošetřena 10% H₂O₂ a opláchnutá MilliQ vodou. Ze zásobního roztoku 5x TBE pufru (445 mM Tris; 445 mM H₃BO₃; 10 mM EDTA; pH 8-8,3) byl připraven 0,5x TBE pufr. Potom bylo připraveno 40 ml 1% agarosového gelu v 0,5x TBE pufru. Směs byla zahřívána přibližně 2 minuty v mikrovlnné troubě, dokud se agarosa úplně nerozpustila. Po ochlazení proudem tekoucí vody byl roztok nalit do připravené formy na gel. Před ztuhnutím byl do gelu vložen hřeben, aby vytvořil jamky na vzorky. Aparatura pro elektroforézu byla naplněna 0,5x TBE pufrům a byla do ní vložena vanička s gelem.

Následovala příprava vzorků. Ke 2 μl vzorků izolované RNA byla přidána „RNase free“ voda (3 μl) do celkového objemu 5 μl. Následně byl přidán 1 μl vzorkového pufru (6x Loading dye). Jako marker délky řetězce RNA byl použit ssRNA Ladder, který byl připraven dle protokolu výrobce, zahříván při 90 °C po dobu 2 minut a poté vložen na led. Do jamek v gelu bylo pipetováno 10 μl markeru a 8 μl roztoku RNA. Elektroforéza probíhala 45 minut při 110 V.

Při vizualizaci gelu bylo potřeba pracovat ve dvojitých rukavicích. Po ukončení elektroforézy byl gel vložen do misky s barvicí lázní (50 ml 1x TBE + 5 μl SyberGreen II). Miska byla zabalena do alobalu a nechána na třepačce 30 minut. Po uplynutí času proběhlo vyvolání gelu v temné místnosti na Dark Readeru. Gel byl vyfotografován.

3.2.4 Stanovení koncentrace a čistoty RNA

Pro stanovení čistoty a koncentrace byla odečtena absorbance jednotlivých vzorků při 260, 280 a 320 nm. Před měřením bylo potřeba vzorky ředit 40x (10 μl vzorku a 390 μl „RNase free“ vody). Na spektrofometru Helios α bylo měřeno absorpční spektrum vzorků izolované RNA v rozmezí vlnových délek od 220 do 324 nm.

Absorpční maximum nukleových kyselin je při vlnové délce 260 nm. Čistota RNA byla vypočítána z poměru absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm, při které absorbují nejvíce proteiny. Hodnotu absorbance při vlnové délce 320 nm je nutné odečíst od každé hodnoty jako absorbanci pozadí. Pro stanovení čistoty RNA získáme vzorec:

$$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$$

Při vlnové délce 260 nm vykazuje roztok RNA o koncentraci 40 µg/ml absorbanci 1. Pro výpočet koncentrace RNA ve vzorku byl tedy použit vzorec:

$$c = \frac{A_{260} - A_{320}}{1000} \cdot 40 \cdot \text{\u0177eden\u00ed}; [c] = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

3.2.5 Synt\u00e9za cDNA – reverzn\u00ed transkripce

Reverzn\u00ed transkripce je metoda, p\u0159i které je pomoc\u00ed enzymu reverzn\u00ed transkriptasy (RNA-dependentn\u00ed DNA polymerasa) syntetizovan\u00e1 molekula cDNA (complementary DNA) podle jedno\u0159et\u011bzcov\u00e9ho \u00faseku RNA. Synt\u00e9za prob\u00edh\u00e1 od m\u00edsta nav\u00e1zan\u00ed primeru. Pro iniciaci synt\u00e9zy je nej\u00e7ast\u011bj\u00ed vyu\u017e\u00edvan\u00fd primer poly-dT (komplement\u00e1rn\u00ed \u00fasek k sekvenci poly-A) nebo se vyu\u017e\u00edv\u00e1 sm\u011b\u0165 hexanukleotid\u0165. Mohou se pou\u017e\u00edt i oligonukleotidy, kter\u00e9 jsou specifick\u00e9 pro konkr\u00e9tn\u00ed sekvence dan\u00e9ho genu⁵⁰.

P\u0159ed za\u00e7\u00e1tkem p\u0159\u00e1ce byl Flow-box o\u00e7i\u0161t\u011bn\u00fd 10% H₂O₂, byly do n\u011bj vlo\u017eeny v\u0161echny pot\u0159ebn\u00e9 n\u00e1stroje, kter\u00e9 byly vysv\u00edceny UV sv\u011btlem po dobu 20 minut. Jednotliv\u00e9 vzorky byly po celou dobu p\u0159\u00edpravy co nejv\u00edc udr\u017eovan\u00e9 na ledu a pracovalo se v rukavic\u00edch. Reverzn\u00ed transkripce byla provedena pomoc\u00ed kitu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Jako prvn\u00ed byla p\u0159ipravena reak\u00e7n\u00ed sm\u011b\u0165 („RT master mix“), kter\u00e1 obsahovala slo\u017eky v p\u0159\u00edslu\u0161n\u00fdch objemech z tabulky 2.

Tabulka 2: Slo\u017een\u00ed „RT master mixu“ pro jeden vzorek

4,2 \u00b5l RNase free H ₂ O
2 \u00b5l 10x RT buffer
2 \u00b5l 10x RT Random Primers
0,8 \u00b5l 25x dNTP Mix (100 mM)
1 \u00b5l RNase inhibitor

Po rozmrazen\u00ed byl 1 \u00b5g izolovan\u00e9 RNA \u0159ed\u011bn na objem 10 \u00b5l „RNase free“ H₂O. Ke ka\u017e\u00e9mu vzorku bylo p\u0159id\u00e1no 10 \u00b5l „RT master mixu“ a n\u00e1sledn\u011b byly z ka\u017e\u00e9ho vzorku odebr\u00e1ny 2 \u00b5l jako negativn\u00ed kontrola. Po tomto kroku byla do v\u0161ech vzork\u0165, z kter\u00fdch byla odebr\u00e1na negativn\u00ed kontrola, pipetovan\u00e1 MultiScribeTM reverzn\u00ed transkriptasa (RT) po 1 \u00b5l. Vzorky byli sto\u00e7eny a p\u0159em\u00edst\u011bn\u00fd na PCR thermocycler, kter\u00fd byl nastaven na program pro reverzn\u00ed transkripce:

25 °C 10 minut (nasedání náhodných hexamerů)
37 °C 120 minut (prodlužování řetězců cDNA)
85 °C 5 minut (inaktivace RT)

Program byl ukončen chlazením při teplotě 4 °C. Po vyjmutí byly vzorky uskladněny ve vysokomrazícím boxu při teplotě -80 °C.

3.2.6 Real-Time PCR (qPCR)

Metodou PCR může být každá sekvence nukleové kyseliny přítomná v komplexním vzorku amplifikovaná v cyklickém procesu, při kterém se vytvoří velký počet identických kopií, které je možné snadno analyzovat⁵¹. qPCR slouží pro kvantifikaci DNA a transkripce. Je založená na klasické PCR metodě, avšak s využitím fluorescenční sondy, která v průběhu PCR slouží k průběžnému zaznamenávání množství amplifikované DNA. Jedná se o kombinaci amplifikace a její detekce v každém kroku, které je dosaženo použitím fluorescenčních látek. Koncentrace produktu PCR koreluje s intenzitou fluorescence.

qPCR se stala jednou z nejrozšířenějších metod kvantifikace genů, protože má velký dynamický rozsah, obrovskou senzitivitu, vysokou sekvenční specifitu a jen málo nebo žádné post-amplifikační zpracování⁵². Využívá se na detekci patogenů, analýzu genové exprese, chromozómových aberací nebo jednonukleotidového polymorfizmu (SNP)⁵¹. Jednu z možných variant průběhu qPCR představuje proces, kdy dochází ke štěpení TaqMan sondy za využití 5' nukleasové aktivity DNA polymerasy. Jedná se o hydrolyzační sondu, která obsahuje na svém 5' konci fluorescenční značku a na 3' konci zhášecí činidlo. V průběhu reakce dochází k zvyšování fluorescence, která je způsobená oddalováním fluorescenčního a zhášecího barbiva⁵³.

Na úvod bylo potřeba vzorky cDNA a jejich negativní kontroly 10x ředit „PCR Grade“ H₂O. Následně byl připraven premix obsahující složky z tabulky 3.

Tabulka 3: Složení premixu

	1 vzorek [μl]
Master Mix (2x)	10
Primer & Probe Assay (20x)	1
H ₂ O (PCR Grade)	4

qPCR primer & probe assay obsahuje neznačené páry specifických primerů a sondu nesoucí fluorescenční značku. Geny, které byly analyzovány pomocí výše uvedených dostupných primerů, byly β -aktin, který byl použit jako referenční gen, a CYP1A2. K 15 μ l premixu bylo pipetováno 5 μ l 10x ředěné cDNA a u slepého vzorku bylo místo cDNA přidáno 5 μ l „RNase free“ vody. Pro každý vzorek byly připraveny dvě paralelní stanovení. Takto připravené vzorky byly vloženy do Real-time PCR cycleru Rotor Gene 2000. Používal se rotor s 72 jamkami. Pomocí programu byly nastaveny tyto reakční podmínky:

95 °C 10 minut (aktivace DNA polymerasy)

Potom následovalo 50 cyklů s podmínkami:

95 °C 15 sekund (denaturace DNA řetězce)

60 °C 60 sekund (nasednutí primerů a sondy a syntéza nového řetězce DNA)

K vyhodnocení výsledků byl použit program Rotor Gene, díky kterému byly určeny hodnoty C_T značící číslo cyklu, ve kterém amplifikační křivka protíná linii „threshold“ se signifikantním nárůstem detekce signálu.

Z výsledků dvou paralelních měření pro každý vzorek cDNA byla vypočítána hodnota aritmetického průměru čísla cyklu C_T , vyjadřující relativní zastoupení genu pro β -aktin a CYP1A2 ve vzorku. Hodnota ΔC_T byla určena tak, že od C_T hodnoty cílového genu jsme odečetli hodnotu C_T genu referenčního. Míra indukce exprese genu CYP1A2 ve vzorcích dané tkáně izolované z potkanů premedikovaných benzo[*a*]pyrenem, 17 α -ethinylestradiolem, 17 β -estradiolem a jejich kombinacemi proti tkáni potkanů nepremedikovaných je vyjádřena pomocí hodnoty $2^{-\Delta\Delta C_T}$, která je počítána dle vzorce:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(\overline{\Delta C_T}(\text{premedikace}) - \overline{\Delta C_T}(\text{kontrola}))}$$

Statistické vyhodnocení získaných výsledků bylo provedeno pomocí programu REST 2009.

3.2.7 Diskontinuální elektroforéza SDS PAGE

Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) slouží k separaci proteinů na základě jejich rozdílné molekulové hmotnosti. Dodecylsulfát sodný (SDS) se váže na hydrofobní části proteinů stále ve stejném poměru (1,4 g SDS/g proteinu) a uděluje jim jednotný záporný náboj⁵⁴. Polymerace gelu probíhá radikálovým mechanismem, který iniciuje persíran amonný (APS) a N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED). Tyto látky napomáhají vzniku a

stabilizaci volných radikálů, pomocí nichž dochází k polymeraci akrylamidu s N,N'-metylen-bis-akrylamidem (BIS) za vzniku trojrozměrné sítě⁵⁵.

V první řadě si bylo potřeba k separaci proteinů připravit 10% separační gel. Na přípravu 4 gelů bylo potřeba: 7,9 ml dH₂O, 6,7 ml 30% (w/v) akrylamidu (29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) BIS), 5 ml pufru A (pH 8,8; 1,5 M Tris-HCl), 200 μl 10% (w/v) SDS, 8 μl TEMED, 200 μl 10% (w/v) APS. Mezi dvě čistá, odmaštěná skla s mezerou 1mm, uchycená v elektroforetické soustavě pro tuhnutí gelů (BIO-RAD), byl pipetován roztok pro přípravu separačního gelu přibližně do výšky 6 cm a převrstven 1 cm destilované vody, aby bylo zabráněno nerovnoměrnému tuhnutí gelu. Po 30 minutách byla voda slita a odsáta pomocí filtračního papíru. Následovalo nalití 4% zaostřovacího gelu, kterého složení pro 4 skla odpovídalo: 3,6 ml dH₂O, 667 μl 30% (w/v) akrylamidu (29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) BIS), 630 μl pufru B (pH 6,8; 1,0 M Tris-HCl), 50 μl 10% (w/v) SDS, 5 μl TEMED a 50 μl 10% (w/v) APS. Do zaostřovacího gelu byl umístěn desetijamkový hřeben. Znovu bylo potřeba počkat 30 minut, než došlo ke ztuhnutí gelu. Po uplynutí času byl hřeben opatrně odstraněn, skla byla zasunuta do elektroforetické aparatury, která byla naplněna elektrodovým puftrem (pH 8,3; 0,192 M glycín, 0,025 M Tris-HCl, 0,1% (w/v) SDS) tak, aby jamky byly pod hladinou.

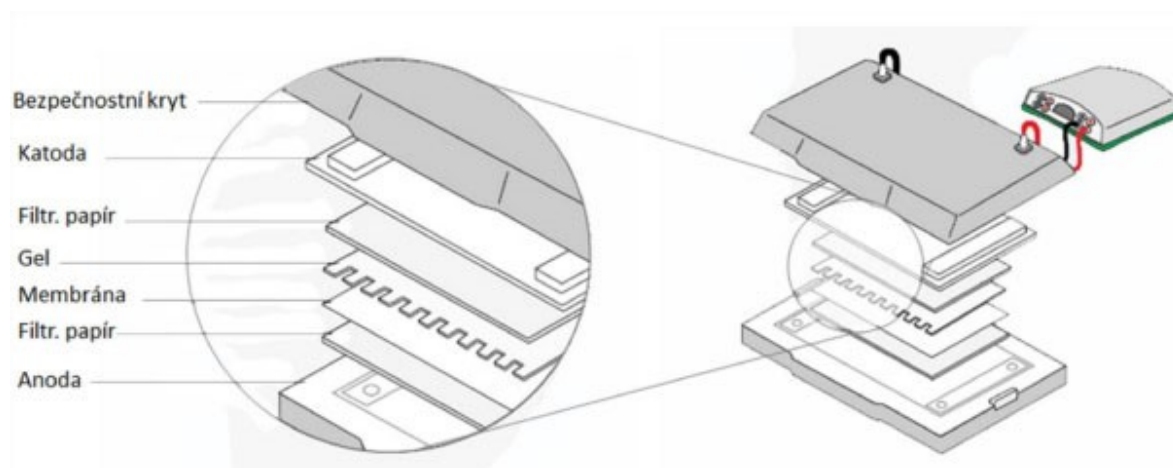
Vzorky mikrosomální frakce jater byly vhodně ředěny na koncentraci 50 μg proteinu na jamku destilovanou vodou a 4x koncentrovaným vzorkovým puftrem (pH 6,8; 0,63 M Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 5% (v/v) 2-merkapt ethanol, 0,003% (w/v) bromfenolová modř). Jako pozitivní kontrola bylo použito 0,5 pmol rekombinantního potkaního CYP1A1 a CYP1A2 v Supersomech™. Vzorky byly před nanášením vařeny 5 minut při 100 °C a pomocí mikrostříkačky Hamilton s tupou jehlou nanesené do jamek. Nejprve bylo pipetováno 8 μl markeru molekulových hmotností (Precision Plus Dual Color Standard). Nanesený objem mikrosomálních vzorků a standardů byl 20 μl. Elektroforéza probíhala 60 minut při 200 V.

Po skončení elektroforézy byl gel vložen do Petriho misky s barvicí lázní (0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 46% (v/v) ethanol, 9,2% (v/v) kyselina octová) na 1 hodinu a následně byl přenesen do odbarvovací lázně (25% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová), v které byl ponechán přes noc. Další den byl gel oskenován.

3.2.8 Přenos proteinů metodou „Western blot“ a imunodetekce CYP1A2

Metoda Western blot (Wb) patří mezi tzv. přenosové techniky a slouží k detekci velikosti či relativního množství určeného proteinu ve směsi proteinů. Metodě proteinového přenosu předchází SDS-PAGE, pomocí které jsou proteiny ve vzorku rozdělené podle svojí molekulové hmotnosti. Následuje přenos na např. PVDF membránu a tzv. blokace membrány. Hledané proteiny jsou následně označeny pomocí specifické primární protilátky, na kterou je v dalším kroku navázána sekundární protilátka nesoucí enzym umožňující vizualizaci⁵⁶. Jako kontrola správně naneseného množství všech vzorků se využívá protein, který je v analyzovaných vzorcích exprimován konstitutivně. Příkladem je glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa (GAPDH)⁵⁵, která byla použita i v našich experimentech.

Po skončení SDS-PAGE byl druhý gel na 30 minut vložen do přenosového pufru (*pH 8,3; 0,192 M glycin, 0,05 M Tris-HCl*). Potom bylo nastříháno 6 ks filtračního papíru Whatman a 1 ks PVDF membrány. Pinzetou byl opatrně odstraněn ochranný obal a membrána byla vložena nejprve do methanolu (30 sekund), potom do dH₂O (dokud se celá neponořila) a na závěr do přenosového pufru (5 minut). Aparatura na blotování byla sestavená podle obr. 7 a připojená k zdroji.



Obrázek 7: Aparatura pro přenos proteinů na membránu⁵⁷.

Podle velikosti plochy gelu byla určena hodnota elektrického proudu vycházející z předpisu:

$$I = 3 \text{ mA} / 1 \text{ cm}^2 \text{ gelu}$$

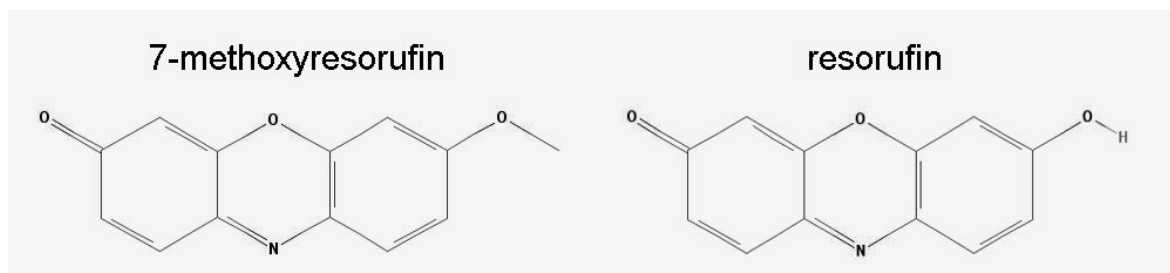
Celkový přenos proteinů trval 30 minut. Po skončení blotování byla membrána ponořena do Ponceau (*0,5% PONCEAU červen v 1% kyselině octové*) na 20 sekund pro kontrolu přenosu proteinů a následně byla omyta dH₂O ze stříčky. Poté byla vložena na 1 hodinu do 5%

blokovacího roztoku sušeného odtučněného mléka a pufru PBS Triton X-100 (*pH* 7,2; 1,8 mM Na_2HPO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 0,134 M NaCl ; 0,3% (w/v) TRITON X-100). Po blokování byla membrána rozstříhnutá v místě mezi molekulovými hmotnostmi 50 kD a 30 kD na dvě části. Vrchní část byla vložena do primární protilátky, kterou byla slepičí primární protilátka proti potkanímu CYP1A2 (ředení 1:2000) a spodní část byla ponořena do roztoku primární králičí protilátky proti GAPDH (ředení 1:5000). Inkubace obou protilátek probíhala v chladové místnosti přes noc na třepačce.

Druhý den byly obě membrány promyty 4x 5 minut v blokovacím roztoku a vloženy do roztoků sekundárních protilátek. Pro detekci CYP1A2 byla jako sekundární protilátka použita IgG-AP slepičí protilátka proti slepičí primární protilátce (ředení 1:1000) a pro detekci GAPDH IgG-AP králičí sekundární protilátka (ředení 1:10000). Inkubace probíhala 1 hodinu na třepačce při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly membrány promyty 2x 5 minut v blokovacím roztoku, 2x 5 minut v PBS-Triton a 5 minut v dH_2O . Posledním krokem této metody byla vizualizace proteinů roztokem na vyvíjení, který obsahoval: 5 ml pufru ALP (*pH* 9; 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 33 μl NBT (nitro blue tetrazolium chlorid v 70% N,N-dimethylformamidu) a 16,5 μl BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát ve 100% dimethylformamidu). Ihned po tom, co byly pozorovány jen nepatrné proužky, bylo vyvolávání zastaveno namočením membrány do dH_2O . Následně byly membrány osušeny mezi filtračními papíry, oskenovány a vyhodnoceny programem ImageJ.

3.2.9 O-demethylace 7-methoxyresorufinu (MROD)

MROD aktivita byla použita pro sledování aktivity enzymu CYP1A2. Tento enzym je hlavním enzymem, který katalyzuje demethylaci 7-methoxyresorufinu³⁹. Mechanismus zahrnuje oxidaci substrátu na alifatickém uhlíkovém atomu na éterovou vazbu, čímž se získá hemiacetal, který se spontánně disociuje za vzniku resorufinu. Ten vyzáří fluorescenční signál a toho využívá fluorescenční spektroskopie. Struktura resorufinu a 7-methoxyresorufinu je znázorněna na obrázku 8, str. 33. Ke stanovení O-demethylační aktivity byly použity jaterní mikrosomy.



Obrázek 8: Struktura methoxyresorufinu a resorufinu^{58,59}.

Složení inkubační směsi:

- 100mmol/l fosfátový pufr (pH 7,4)
- 2 $\mu\text{mol/l}$ 7-methoxyresorufin (zásobní roztok 0,2 mM v methanolu)
- 0,5 mmol/l NADPH (zásobní roztok 5 mM v pufru)
- Vhodně ředěné mikrosomy o různých koncentracích

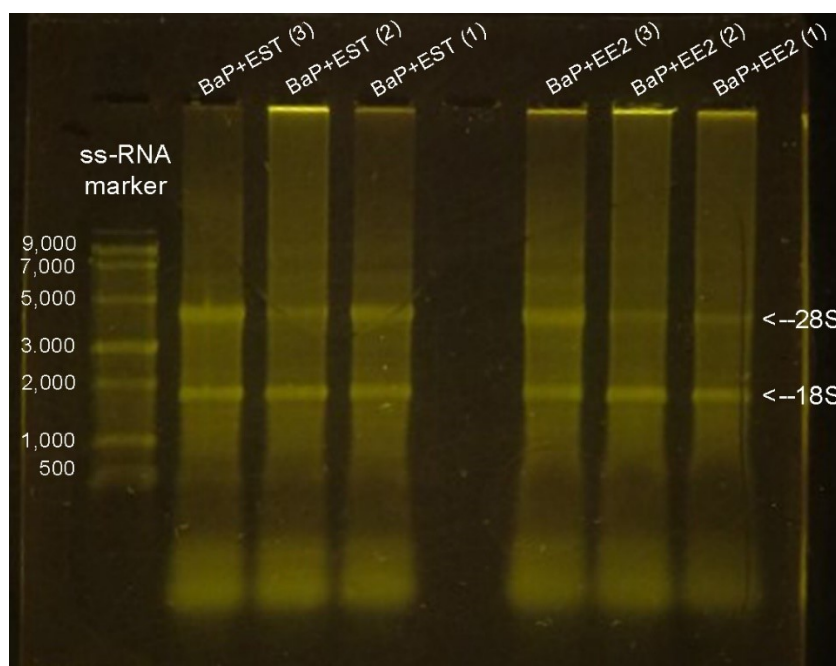
Mikrosomy byly ředěny pufrům tak, aby enzymová reakce probíhala kinetikou 0. řádu a nárůst fluorescence způsobený tvorbou produktu byl v čase lineární. Koncentrace proteinů kontrolních mikrosomů činila 0,5 mg/ml. Mikrosomální frakce z potkanů premedikovaných BaP a jeho kombinacemi musely být kvůli vysoké fluorescenci produktu ředěny na koncentraci 0,1 mg/ml. Ze vzorkového pufru, vhodně ředěných mikrosomů a 7-methoxyresorufinu byla nejprve připravena preinkubační směs pro tři paralelní měření na každý vzorek mikrosomální frakce. Směs byla po zamíchání ponechána 10 minut inkubovat při 37°C a poté rozpipetována po 180 μl do tří jamek mikrotitrační destičky. Ke každému vzorku bylo přidáno 20 μl 0,5mM NADPH. Ihned byla měřena fotoluminiscence resorufinu (Luminiscence Spectrometr Pelkin Elmer LS-55) po dobu 10 minut v jednodominutových intervalech při excitační a emisní vlnové délce 530 nm a 585 nm. Množství resorufinu bylo odečteno z kalibrační křivky naměřené pro kalibrační roztoky resorufinu (0, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 60, 80, 100, 120, 160 pmol/jamka) připravené z 10 μM zásobního roztoku resorufinu v methanolu ředěním vzorkovým pufrům.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Izolace RNA

K tomu, abychom určili obsah mRNA pro enzym CYP1A2, bylo nutné izolovat RNA. RNA byla získána ze tří orgánů (játra, ledviny, plíce) potkanů kontrolních, nepremedikovaných, a potkanů premedikovaných, kterým byly podávány endokrinní disruptory a jejich kombinace (BaP, EE2, EST, BaP+EE2, BaP+EST, EE2+EST). V rámci této bakalářské práce byla izolována RNA z plicní tkáně.

Při izolaci celkové RNA bylo využité činidlo TRIzol Reagent. Kvalitu izolované RNA jsme zjišťovali pomocí elektroforézy na agarosovém gelu. Po vizualizaci separovaných molekul RNA byly na gelu patrné dva proužky odpovídající 18S a 28S rRNA (obr. 9), které jsou důkazem nedegradované RNA



Obrázek 9: Ukázka elektroforézy izolované RNA na agarosovém gelu. Při této elektroforéze byly použity plicní vzorky potkanů premedikovaných kombinacemi BaP+EST a BaP+EE2.

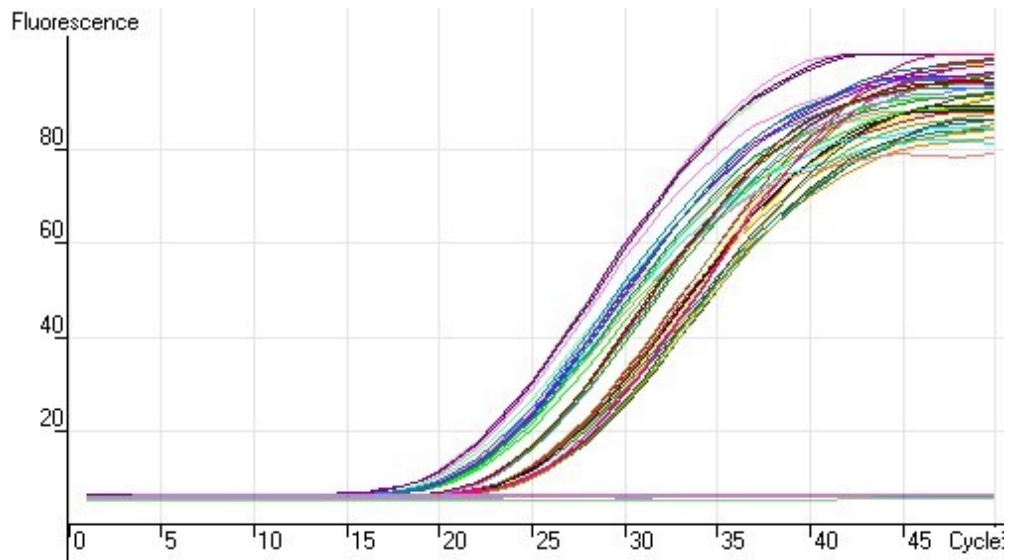
Z hlediska čistoty a výtěžku jsme izolovanou RNA hodnotili pomocí spektrofotometrického měření absorpčních spekter. Získané hodnoty čistoty a koncentrace jednotlivých vzorků RNA jsou uvedeny v tabulce 4 (str. 35).

Tabulka 4: Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace izolované plicní RNA

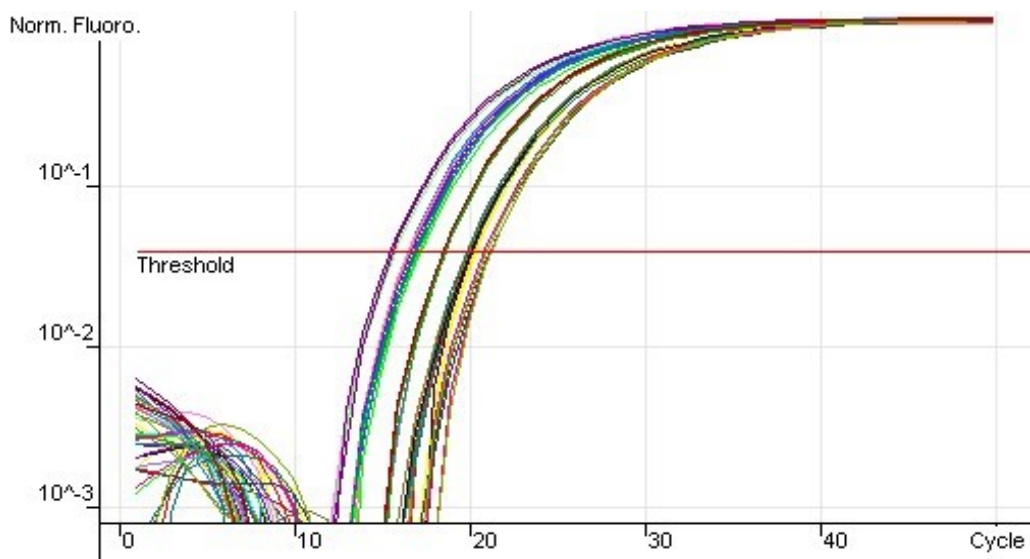
Premedikace	Čistota	c(RNA) [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
CTRL1	1,89	0,68
CTRL2	2,05	0,36
CTRL3	1,90	0,42
BaP1	1,75	1,75
BaP2	1,90	0,93
BaP3	1,76	0,96
EE2-1	1,83	0,60
EE2-2	1,82	0,43
EE2-3	2,00	0,60
EST1	1,76	0,76
EST2	1,97	0,44
EST3	1,84	0,72
BaP+EE2 (1)	1,71	0,56
BaP+EE2 (2)	1,74	0,51
BaP+EE2 (3)	1,83	0,53
BaP+EST (1)	1,86	0,52
BaP+EST (2)	1,94	0,61
BaP+EST (3)	1,89	0,44
EE2+EST (1)	1,82	0,76
EE2+EST (2)	1,79	0,71
EE2+EST (3)	1,83	0,42

4.2 Genová exprese CYP1A2

Dalším krokem bylo převedení RNA na cDNA metodou reverzní transkripce. Expres mRNA byla analyzována pomocí metody kvantitativní PCR s využitím komerčních sond. cDNA byla připravena z 1 μg izolované RNA. Pro analýzu genové exprese CYP1A2 v játrech a ledvinách byla použita již připravená cDNA. Vzorky byly pomocí kvantitativní PCR analyzované z hlediska exprese β -aktinu jako referenčního genu, který by měl být ve všech tkáních exprimován ve stejném množství, a genu pro CYP1A2. Analýza exprese genu CYP1A2 byla prováděna stejným způsobem jako u β -aktinu. Hodnoty C_T byly určeny z výsledných amplifikačních křivek, které jsou zobrazeny na obrázcích 10 a 11 (str. 36).



Obrázek 10: Amplifikační křivky vzorků jater pro gen CYP1A2 v lineárním zobrazení.



Obrázek 11: Amplifikační křivky vzorků jater pro gen CYP1A2 v logaritmicím uspořádání s označenou linií „threshold“.

Získaná data byla vyhodnocena a výsledky jsou zobrazené v tabulkách 5,6 a 7 (str. 37) a v grafech (obr. 12, str. 38). Míra genové exprese CYP1A2 v jednotlivých orgánech potkanů premedikovaných endokrinními disruptory a jejich kombinacemi byla porovnána s potkany nepremedikovanými.

Tabulka 5: Relativní kvantifikace genové exprese CYP1A2 v jaterních vzorcích.

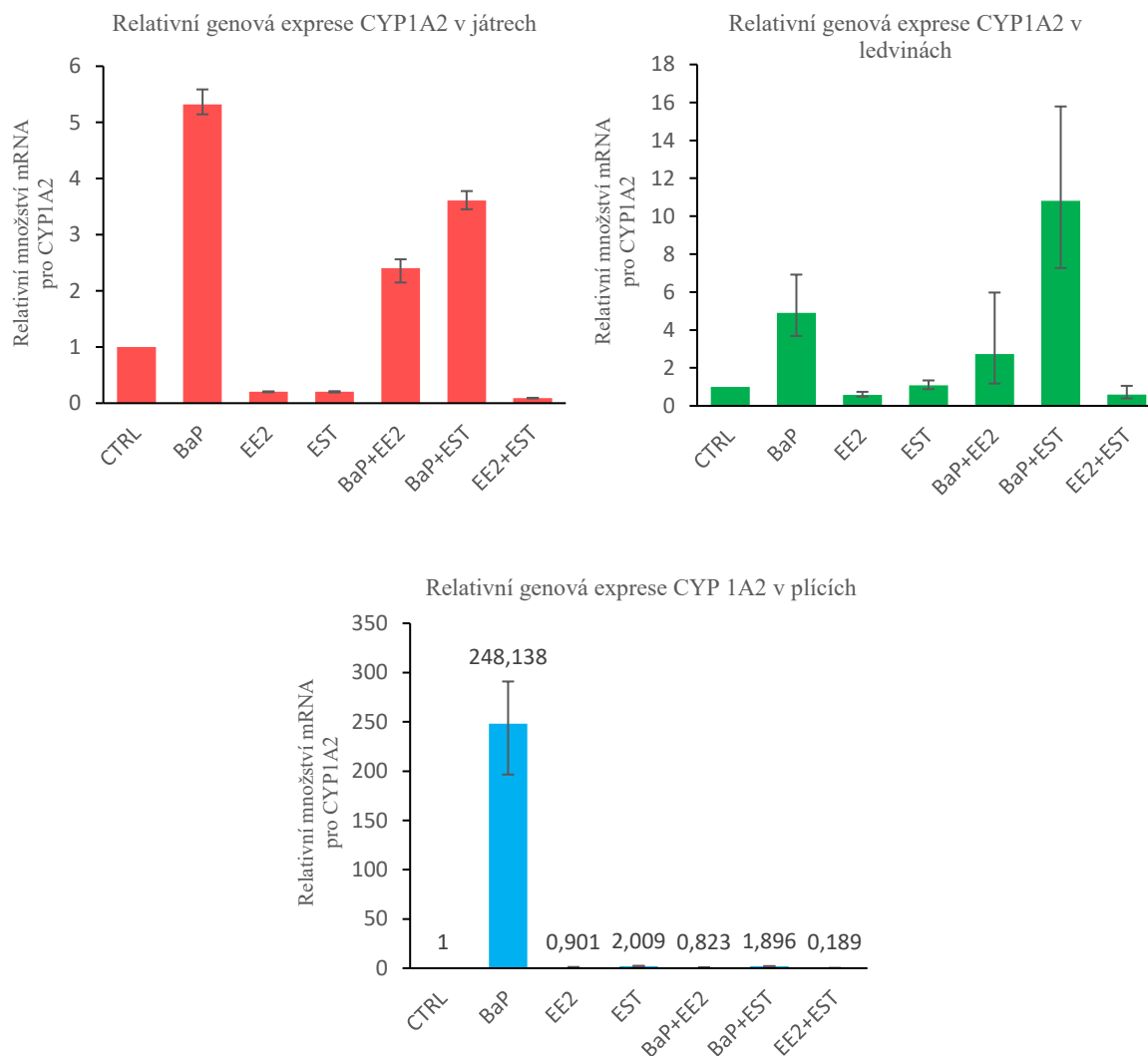
Játra	Rel. míra genové exprese CYP1A2 (ΔC_T)	Změna genové exprese CYP1A2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)	Statistická významnost
CTRL	-0,29 ± 0,245	1	
BaP	-2,85 ± 0,065	5,87	*** (P<0,001)
EE2	1,88 ± 0,059	0,22	*** (P<0,001)
EST	1,87 ± 0,088	0,22	*** (P<0,001)
BaP+EE2	-1,70 ± 0,143	2,65	*** (P<0,001)
BaP+EST	-2,29 ± 0,068	3,98	*** (P<0,001)
EE2+EST	3,05 ± 0,090	0,10	*** (P<0,001)

Tabulka 6: Relativní kvantifikace genové exprese CYP1A2 v ledvinních vzorcích.

Ledviny	Rel. míra genové exprese CYP1A2 (ΔC_T)	Změna genové exprese CYP1A2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)	Statistická významnost
CTRL	12,80 ± 0,338	1	
BaP	10,50 ± 0,474	4,91	** (P<0,01)
EE2	13,59 ± 0,243	0,58	*** (P<0,001)
EST	12,69 ± 0,168	1,08	-
BaP+EE2	11,35 ± 1,271	2,74	-
BaP+EST	9,36 ± 0,628	10,84	*** (P<0,001)
EE2+EST	13,54 ± 0,787	0,60	-

Tabulka 7: Relativní kvantifikace genové exprese CYP1A2 v plicních vzorcích.

Plíce	Rel. míra genové exprese CYP1A2 (ΔC_T)	Změna genové exprese CYP1A2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)	Statistická významnost
CTRL	16,98 ± 0,251	1	
BaP	9,02 ± 0,279	248,14	*** (P<0,001)
EE2	17,13 ± 0,567	0,90	-
EST	15,97 ± 0,166	2,01	*** (P<0,001)
BaP+EE2	17,26 ± 0,105	0,82	-
BaP+EST	16,05 ± 0,314	1,90	** (P<0,01)
EE2+EST	19,38 ± 0,258	0,19	*** (P<0,001)



Obrázek 12: Relativní genová exprese CYP1A2 v játrech, ledvinách a plicích potkanů kontrolních (CTRL) a premedikovaných benzo[*a*]pyrenem (BaP), 17 α -ethinylestradiolem (EE2), 17 β -estradiolem (EST) a jejich kombinacemi. Standardní chyba měření vyhodnocená programem REST 2009.

Pomocí metody kvantitativní PCR bylo kvantifikováno relativní množství mRNA pro CYP1A2 v játrech, ledvinách a plicích potkanů premedikovaných BaP, EE2, EST a jejich kombinacemi. Pouze premedikace obsahující BaP samostatně nebo v kombinaci s EE2 či EST vedly k indukci genové exprese CYP1A2 v játrech. Indukční vliv BaP nebyl v případě společného podání s estrogény však tak velký jako v případě samostatného podání BaP, oba estrogény snížily indukční potenciál BaP. Vystavení potkanů EE2 a EST způsobilo v játrech pokles genové exprese CYP1A2. Kombinované podání obou estrogenů vedlo k největšímu poklesu genové exprese oproti kontrolní skupině.

V ledvinách došlo k statisticky významné indukci genové exprese CYP1A2 pouze při podání samostatného BaP a jeho kombinace s EST. Opět byla snížena exprese CYP1A2 u vzorků premedikovaných syntetickým estrogenem, ať už samostatně nebo v kombinaci s EST. EE2 také výrazně snížil indukční potenciál BaP.

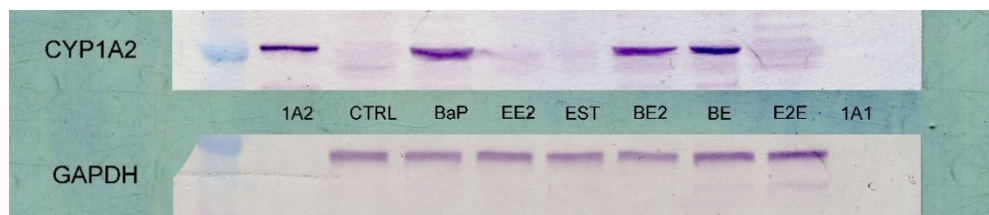
V plicích byla genová exprese CYP1A2 nejvíce zvýšená u vzorků potkanů premedikovaných samostatným BaP. Mírné zvýšení genové exprese bylo pozorováno i u EST a jeho kombinace s BaP. Je zjevné, že EE2 výrazně snižuje indukční efekt BaP ve všech orgánech. Naše výsledky souhlasí s tím, že estrogény ovlivňují expresi CYP1A1, která klesá, když se zvyšuje základní hladina estrogenů v organismu⁶⁰.

Z hlediska samostatně podávaných estrogenů odpovídají naše výsledky údajům pozorovaným u ryb, ve kterých se zvyšující základní hladinou estrogenů v organismu klesá genová exprese CYP1A^{60,61}.

4.3 Proteinová exprese CYP1A2

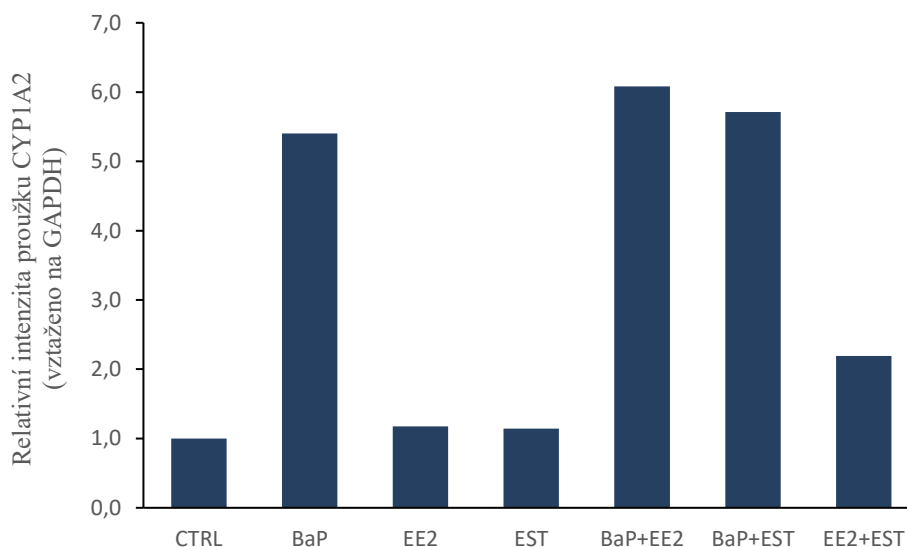
Pomocí metody Western blot (Wb) a následnou imunodetekcí byla analyzována míra exprese CYP1A2 u potkanů, kterým byly podávány příslušné endokrinní disruptory a jejich kombinace. Detekce byla uskutečněna pouze u jater. Pro kontrolu správně naneseného množství proteinu byla použita GAPDH, která je ve vzorcích exprimována konstitutivně. Po metodě Wb následovala imunodetekce polyklonální protilátkou proti CYP1A2, na základě které jsme zjistili zastoupení enzymu v játrech jednotlivých premedikačních skupin potkanů.

Na obrázku 13 (str. 40) je ukázka membrány po imunodetekci CYP1A2 ve vzorcích mikrosomální frakce jater potkanů premedikovaných ED a jejich kombinacemi. Z obrázku jasně vyplývá, že u vzorků mikrosomální frakce jater potkanů premedikovaných BaP a kombinacemi BaP s EE2 nebo EST dochází k silné indukci CYP1A2.



Obrázek 13: Imunodetekce CYP1A2 v jaterních mikrosomech potkanů kontrolních (CTRL) a premedikovaných benzo[*a*]pyrenem (BaP), 17 α -ethinylestradiolem (EE2), 17 β -estradiolem (EST) a jejich kombinacemi. Jako standardy byly použity supersomální CYP1A1 a 1A2. Jedna jamka obsahovala 50 μ g proteinu.

Intenzity proužků odpovídajících CYP1A2 a GAPDH byly vyhodnoceny pomocí programu ImageJ (obr. 14). Hodnoty intenzit byly vztaženy ke kontrolním vzorkům potkanů, kterým bylo přiřazeno zastoupení 100 %, což odpovídalo nalezenému množství CYP1A2 v těchto vzorcích.



Obrázek 14: Relativní množství CYP1A2 ve vzorcích mikrosomální frakce izolované z jater potkanů premedikovaných BaP, EE2, EST a jejich kombinacemi.

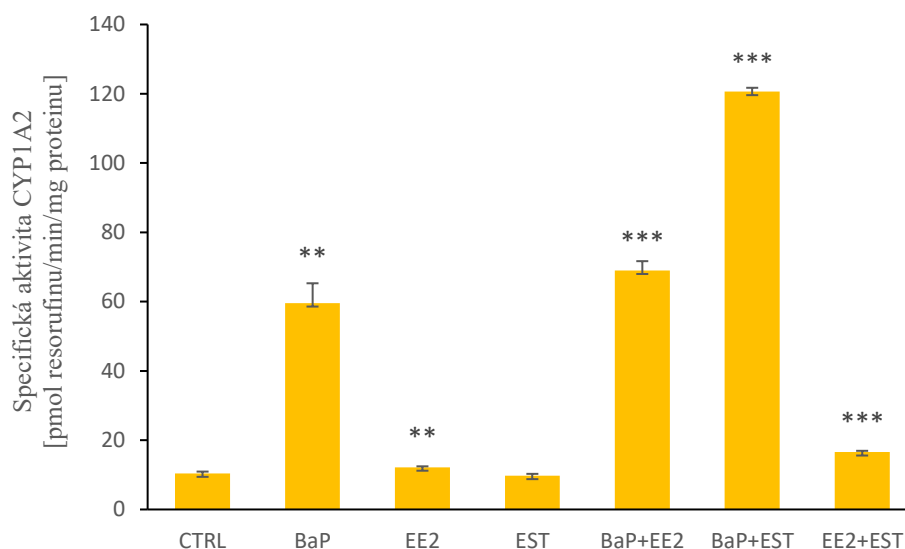
Z grafu vyplývá, že v mikrosomálních frakcích z jater potkanů premedikovaných BaP aplikovaným ať už samostatně nebo v kombinaci s estrogény došlo ke zvýšení hladiny CYP1A2 5-6x. Zvýšení exprese CYP1A2 je v těchto třech premedikačních skupinách přibližně stejné, z čehož vyplývá, že estrogény neměly na úrovni proteinu žádný vliv na

indukční efekt BaP. U vzorků mikrosomální frakce jater potkanů premedikovaných samotným EE2 nebo EST nedošlo ke změně exprese CYP1A2 oproti vzorkům mikrosomální frakce jater potkanů nepremedikovaných. K velmi mírnému zvýšení exprese CYP1A2 oproti kontrolní skupině došlo u vzorků mikrosomální frakce potkanů premedikovaných kombinací EE2+EST. Vzhledem k tomu, že nárůst byl mírný, nepovažujeme zvýšení exprese CYP1A2 za významné.

Analogické změny byly v rámci našeho projektu pozorovány při studiu vlivu BaP, EE2 a EST na expresi CYP1A1⁶², dalšího zástupce podrodiny 1A cytochromů P450, který je stejně jako izoforma CYP1A2 indukovatelný přes AhR. Porovnání množství CYP1A2 v jednotlivých mikrosomálních frakcích z jater potkanů vedlo k téměř stejným výsledkům jako při zkoumání CYP1A1. Na úrovni CYP1A1 vedlo samostatné i kombinované podání BaP spolu s estrogeny laboratorním potkanům ke zvýšení exprese, což je shodné s našimi výsledky při zkoumání CYP1A2 v mikrosomálních frakcích jater. U vzorků jater potkanů premedikovaných samotným EE2 nebo EST nedošlo ke změně exprese CYP1A1 ani CYP1A2 oproti vzorkům mikrosomální frakce jater potkanů nepremedikovaných. Stejný výsledek byl zaznamenán při kombinovaném podání estrogenů.

4.4 Stanovení aktivity CYP1A2

Specifická aktivita CYP1A2 byla stanovena měřením *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu. Daný enzym katalyzuje tuto reakci na fluorescenční produkt resorufin, který následně stanovujeme fluorescenční spektroskopii. Na stanovení specifické aktivity cytochromu byly použité pouze vzorky z mikrosomální frakce jater. Na obrázku 15 (str. 42) jsou zobrazeny aktivity CYP1A2 v jednotlivých mikrosomálních frakcích jater kontrolních a premedikovaných potkanů.



Obrázek 15: Specifická aktivita CYP1A2 v jaterních mikrosomech potkanů kontrolních (CTRL) a premedikovaných benzo[*a*]pyrenem (BaP), 17 α -ethinylestradiolem (EE2), 17 β -estradiolem (EST) a jejich kombinacemi. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty a standardní odchylky ze tří měření. Statistická významnost byla vyhodnocena pomocí T-testu (*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$).

Specifická aktivita CYP1A2 naměřená v jednotlivých mikrosomálních frakcích z jater potkanů téměř odpovídá výsledkům ze stanovení proteinové exprese CYP1A2 metodou Wb s následnou imunodetekcí. Výsledky naznačují, že ve srovnání s kontrolní skupinou byla *O*-demethylasová aktivita CYP1A2 signifikantně indukována v játrech potkanů premedikovaných benzo[*a*]pyrenem a jeho kombinacemi s estrogeny. K mírnému zvýšení aktivity došlo i v jaterních mikrosomech potkanů premedikovaných kombinací EE2 a EST, podobný nárůst byl pozorován i na úrovni množství detekovaného proteinu (obr. 14, str. 40), a u vzorků premedikovaných pouze EE2. V případě samostatného podání EST nedošlo k žádné změně v aktivitě CYP1A2.

Některé studie prováděné *in vitro* ukázaly inhibiční vliv estrogenů EE2 i EST na enzymovou aktivitu CYP1A v jaterních mikrosomech potkana a prasete⁶³. Oba estrogeny v nich vykazovaly silný inhibiční účinek na *O*-deethylaci 7-ethoxyresorufinu (EROD), reakci zprostředkovanou především CYP1A1 a 1A2. V rámci našeho projektu však nebyl *in vivo* tento vliv EE2 a EST prokázán ani pro CYP1A1⁴⁵ ani našimi výsledky z měření MROD. Výsledky bakalářské práce však potvrzují indukční vliv BaP na specifickou aktivitu CYP1A2⁶⁴.

Naše experimenty potvrdily, že endokrinní disruptor BaP, který je také lidským karcinogenem a mutagenem, má silný indukční vliv na nárůst exprese CYP1A2. BaP působí jako významný induktor podrodiny CYP1A na úrovni jak mRNA, tak proteinů v játrech, ledvinách a plicích potkanů³¹. Změny v expresi CYP1A jsou zprostředkovány vazbou BaP na AhR, který reguluje transkripci příslušných genů⁶⁴. Svým indukčním vlivem na CYP1A může BaP významně ovlivňovat svůj genotoxický potenciál³¹. Studované estrogení látky EE2 a EST snižovaly indukční potenciál BaP na úrovni genové exprese.

5 Závěr

V rámci této bakalářské práce byl studován vliv endokrinních disruptorů benzo[*a*]pyrenu (BaP), 17 α -ethinylestradiolu (EE2), 17 β -estradiolu (EST) a jejich kombinací na expresi a specifickou aktivitu CYP1A2.

Výsledky dosažené v této bakalářské práci lze shrnout následovně:

- ✓ Byla úspěšně izolována RNA z plic laboratorních potkanů nepremedikovaných a premedikovaných uvedenými endokrinními disruptory. Následně byla převedena metodou reverzní transkripce na cDNA a charakterizována z hlediska čistoty a výtěžku.
- ✓ Relativní zastoupení mRNA bylo kvantifikováno metodou kvantitativní PCR pro CYP1A2 a porováno s kontrolním genem β -aktinem. Byla zjištěna zvýšená genová exprese CYP1A2 v játrech, ledvinách a plicích při podání benzo[*a*]pyrenu a jeho kombinací s 17 α -ethinylestradiolem a 17 β -estradiolem.
- ✓ Metodou Western blot a následnou imunodetekcí byla stanovena míra exprese CYP1A2 v jaterných mikrosomálních vzorcích. Vystavení laboratorního potkana benzo[*a*]pyrenu nebo jeho kombinacím s 17 α -ethinylestradiolem případně 17 β -estradiolem vede ke zvýšení exprese CYP1A2 ve vzorcích mikrosomální frakce jater. Endogenní endokrinní disruptor 17 β -estradiol, exogenní endokrinní disruptor 17 α -ethinylestradiol, ani jejich kombinace nemají na expresi CYP1A2 téměř žádný vliv.
- ✓ Byla stanovena specifická aktivita CYP1A2 v játrech měřením *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu. Pouze premedikace s 17 β -estradiolem nevedla ke zvýšení aktivity CYP1A2 v játrech laboratorních potkanů.

6 Seznam literatury

1. Kotyza, J., Soudek, P., Kafka, Z. & Vaněk, T.: Léčiva – „Nový“ enviromentální polutant. *Chem Listy* **103**, 540–547 (2009).
2. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J., Martínek, V. & Páca, J.: Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem Listy* **98**, 876–890 (2004).
3. Aris, A. Z., Shamsuddin, A. S. & Praveena, S. M.: Occurrence of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environ. Int.* **69**, 104–119 (2014).
4. Blanchfield, P. J., Kidd, K. A., Docker, M. F., Palace, V. P., Park, B. J. & Postma, L. D.: Recovery of a wild fish population from whole-lake additions of a synthetic estrogen. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 3136–3144 (2015).
5. Caliman, F. A. & Gavrilescu, M.: Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment: a review. *CLEAN – Soil Air Water* **37**, 277–303 (2009).
6. Křesinová, Z., Svobodová, K. & Cajthaml, T.: Mikrobiální degradace endokrinně disruptivních látek. *Chem Listy* **103**, 200–207 (2009).
7. Hampl, R., Kubátová, J. & Stárka, L.: Steroids and endocrine disruptors – History, recent state of art and open questions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **155**, 217–223 (2016).
8. Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D. M., Sinks, T. & Tilson, H. A.: Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* **104**, 715–740 (1996).

9. Hecker, M. & Hollert, H.: Endocrine disruptor screening: regulatory perspectives and needs. *Environ. Sci. Eur.* **23**, 15 (2011).
10. Nash, J. P., Kime, D. E., Van der Ven, L. T. M., Wester, P. W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P. & Tyler, Ch. R.: Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ. Health Perspect.* **112**, 1725–1733 (2004).
11. D’Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M. & Samperi, R.: Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci. Total Environ.* **302**, 199–209 (2003).
12. Hanselman, T. A., Graetz, D. A. & Wilkie, A. C.: Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 5471–5478 (2003).
13. Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llompert, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M. & Ternes, T.: Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* **38**, 2918–2926 (2004).
14. Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., Sigler, K. & Řezanka, T.: Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol. *Environ. Pollut.* **157**, 3325–3335 (2009).
15. Combalbert, S. & Hernandez-Raquet, G.: Occurrence, fate and biodegradation of estrogens in the environment. **86**, 1671–1692 (2010).
16. Streck, G.: Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. *TrAC Trends Anal. Chem.* **28**, 635–652 (2009).

17. Stanczyk, F. Z., Archer, D. F. & Bhavnani, B. R.: Ethinylestradiol and 17 β -estradiol in combined oral contraceptives: pharmacokinetics, pharmacodynamics and risk assessment. *Contraception* **87**, 706–727 (2013).
18. Marino, M., Galluzzo, P. & Ascenzi, P.: Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr. Genomics* **7**, 497–508 (2006).
19. Safe, S. & Kim, K.: Nonclassical genomic ER/Sp and ER/AP-1 signaling pathways. *J. Mol. Endocrinol.* **41**, 263–275 (2008).
20. Legler, J., Jonas, A., Lahr, J., Vethaak A. D., Brouwer, A. & Murk, A. J.: Biological measurement of estrogenic activity in urine and bile conjugates with the in vitro ER-CALUX reporter gene assay. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**, 473–479 (2002).
21. Johnson, A. C. & Sumpter, J. P.: Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 4697–4703 (2001).
22. Sun, W., Li, S., Mai, J. & Ni, J.: Initial photocatalytic degradation intermediates/pathways of 17 α -ethinylestradiol: Effect of pH and methanol. *Chemosphere* **81**, 92–99 (2010).
23. Purba, H. S., Maggs, J. L., Orme, M. L., Back, D. J. & Park, B. K.: The metabolism of 17 α -ethinylestradiol by human liver microsomes: formation of catechol and chemically reactive metabolites. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **23**, 447–453 (1987).
24. Ebner, T., Remmel, R. P. & Burchell, B.: Human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase catalyzes the glucuronidation of ethinylestradiol. *Mol. Pharmacol.* **43**, 649–654 (1993).
25. Bořek-Dohalská, L., Valášková, P., Kubíčková, B., Šulc, M., Křesinová, Z., Cajthaml, T. & Stiborová, M.: A study on 17 α -ethinylestradiol metabolism in rat and *Pleurotus ostreatus*. *Neuro Endocrinol. Lett.* **36 Suppl 1**, 5–12 (2015).

26. Burczynski, M. E. & Penning, T. M.: Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res.* **60**, 908–915 (2000).
27. Benzo[a]pyrene, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk. *Vol 100F Lyon Fr.* 111–144 (2012).
28. Tomaniová, M., Kocourek, V. & Hajšlová, J.: Polycyklické aromatické uhlovodíky v potravinách. *Chem Listy* **91**, 357–366 (1997).
29. Zhao, W., Wu, M., Lai, Y., Deng, W., Liu, Y. & Zhang, Z.: Involvement of DNA polymerase beta overexpression in the malignant transformation induced by benzo[a]pyrene. *Toxicology* **309**, 73–80 (2013).
30. Stiborová, M., Moserová, M., Černá, V., Indra, R., Dračínský, M., Šulc, M., Henderson, C. J., Wolf, C. R., Schmeiser, H. H., Phillips, D. H., Frei, E. & Arlt, V. M.: Cytochrome b5 and epoxide hydrolase contribute to benzo[a]pyrene-DNA adduct formation catalyzed by cytochrome P450 1A1 under low NADPH:P450 oxidoreductase conditions. *Toxicology* **318**, 1–12 (2014).
31. Barhoumi, R., Mouneimne, Y., Ramos, E., Morisseau, Ch., Hammock, B. D., Safe, S., Parrish, A. R. & Burghardt, R. C.: Multiphoton spectral analysis of benzo[a]pyrene uptake and metabolism in a rat liver cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **253**, 45–56 (2011).
32. Bořek-Dohalská, L., Valášková, P., Černá, V. & Stiborová, M.: Role of rat cytochromes P450 in the oxidation of 17 α -ethinylestradiol. *Env. Toxicol Pharmacol* **38**, 852–860 (2014).
33. Guengerich, F. P.: Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 611–650 (2001).

34. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P. & Frei, E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem Listy* **93**, 229–237 (1999).
35. Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C. & Nebert, D. W.: P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1–42 (1996).
36. Hu, B., Sun, C., Xu, S. & Zhou, W.: Synthesis of metallo-deuteroporphyrin derivatives and the study of their biomimetic catalytic properties. *Biomim.* **8**, 163–195 (2011).
37. Sachse, C., Brockmöller, J., Bauer, S. & Roots, I.: Functional significance of a C→A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **47**, 445–449 (1999).
38. Go, R.-E., Hwang, K.-A. & Choi, K.-C.: Cytochrome P450 1 family and cancers. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **147**, 24–30 (2015).
39. Chen, J. J., Chen, G. S. & Bunce, N. J.: Inhibition of CYP 1A2–dependent MROD activity in rat liver microsomes: An explanation of the hepatic sequestration of a limited subset of halogenated aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol.* **18**, 115–119 (2003).
40. Ueng, Y.-F., Jan, W.-Ch., Lin, L.-Ch., Chen, T.-L., Guengerich, F. P. & Chen, Ch.-F.: The alkaloid Rutaecarpine is a selective inhibitor of cytochrome P450 1A in mouse and human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 349–353 (2002).
41. Monostory, K., Pascussi, J.-M., Kóbori, L. & Dvorak, Z.: Hormonal regulation of CYP1A expression. *Drug Metab. Rev.* **41**, 547–572 (2009).

42. Ma, Q. & Lu, A. Y. H.: CYP1A induction and human risk assessment: An evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **35**, 1009–1016 (2007).
43. Chang, S.-Y., Chen, C., Yang, Z. & Rodrigues, A. D.: Further assessment of 17 α -ethinylestradiol as an inhibitor of different human cytochrome P450 forms in vitro. *Drug Metab. Dispos.* **37**, 1667–1675 (2009).
44. Zhai, S., Dai, R., Friedman, F. K. & Vestal, R. E.: Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metab. Dispos.* **26**, 989–992 (1998).
45. Bořek-Dohalská, L., Klusoňová, Z., Holecová, J., Martínková, M., Bárta, F., Dračínská, H., Cajthaml, T. & Stiborová, M.: Exposure of rats to exogenous endocrine disruptors 17 α -ethinylestradiol and benzo[a]pyrene and an estrogenic hormone estradiol induces expression of cytochromes P450 involved in their metabolism. *Neuro Endocrinol. Lett.* **37**, 84–94 (2016).
46. Pollenz, R. S. & Barbour, E. R.: Analysis of the complex relationship between nuclear export and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6095–6104 (2000).
47. Barouki, R., Coumoul, X. & Fernandez-Salguero, P. M.: The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett.* **581**, 3608–3615 (2007).
48. Cheng, Z. N., Shu, Y., Liu, Z. Q., Wang, L. S., Ou-Yang, D. S. & Zhou, H. H.: Role of cytochrome P450 in estradiol metabolism in vitro. *Acta Pharmacol. Sin.* **22**, 148–154 (2001).
49. Yamazaki, H., Shaw, P. M., Guengerich, F. P. & Shimada, T.: Roles of cytochromes P450 1A2 and 3A4 in the oxidation of estradiol and estrone in human liver microsomes. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 659–665 (1998).

50. Syntéza cDNA | LabGuide.cz – Průvodce laboratoří. Dostupné z:
<http://labguide.cz/metody/synteza-cdna/>. (Staženo: 29.4.2017)
51. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A. & Zoric, N.: The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* **27**, 95–125 (2006).
52. Wong, M. L. & Medrano, J. F.: Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* **39**, 75–85 (2005).
53. Life Technologies: TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol, [online].
Dostupné z: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_039284.pdf.
(Staženo: 30.4.2017)
54. Schägger, H.: Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **1**, 16–22 (2006).
55. Welinder, C. & Ekblad, L.: Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J. Proteome Res.* **10**, 1416–1419 (2011).
56. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. & Rodwell, V. W.: Harperova biochemie, (překlad z anglického originálu). (2002).
57. Dostupné z: <http://genetika.upol.cz/download.aspx?id=231&t=0>. (Staženo: 30.4.2017)
58. Pubchem. Resorufin | C₁₂H₇NO₃ - PubChem. Dostupné z:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resorufin>. (Staženo: 23.6.2017)
59. Pubchem. 7-Methoxy-3H-phenoxazin-3-one | C₁₃H₉NO₃ - PubChem. Dostupné z:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7-Methoxy-3H-phenoxazin-3-one>.
(Staženo: 23.6.2017)

60. Navas, J. M. & Segner, H.: Modulation of trout 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity by estradiol and octylphenol. *Mar. Environ. Res.* **50**, 157–162 (2000).
61. Mortensen, A. S. & Arukwe, A.: Effects of 17 α -ethinylestradiol on hormonal responses and xenobiotic biotransformation system of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* **85**, 113–123 (2007).
62. Klusoňová, Z.: Vliv vybraných endokrinních disruptorů na cytochromy P450 1A1 a 2C. (PřF UK, 2016).
63. Zamaratskaia, G., Rasmussen, M., Herbin, I., Ekstrand, B. & Zlabek, V.: In vitro inhibition of porcine cytochrome P450 by 17 β -estradiol and 17 α -estradiol. *Interdiscip. Toxicol.* **4**, 78–84 (2011).
64. Nebert, D. W., Dalton, T. P., Okey, A. B. & Gonzalez, F. J.: Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J. Biol. Chem.* **279**, 23847–23850 (2004).

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka