

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Biochemie



Vliv vybraných endokrinních disruptorů na cytochromy P450 1B1 a 3A1/2

The effect of selected endocrine disruptors on cytochromes P450 1B1 and 3A1/2

Diplomová práce

Bc. Jana Holecová

Vedoucí práce: RNDr. Lucie Bořek Dohalská, Ph. D.

Praha, 2017

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky **RNDr. Lucie Bořek Dohalské, Ph.D.** a veškerou použitou literaturu jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lucii Bořek Dohalské, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady při vypracování této diplomové práce, čas, který mi během práce na tomto projektu věnovala a především za její ochotu, vstřícnost a milý přístup ke studentům.

Mé velké díky patří také RNDr. Heleně Dračínské Ph.D. za její trpělivost a ochotu, se kterou mě uvedla do problematiky izolace RNA. Dále děkuji Ivetě Mrízové Ph.D., která mi vysvětlila základy práce s HPLC aparaturou a v neposlední řadě také Bc. Zuzaně Klusoňové, se kterou jsme na tomto projektu spolupracovaly.

Abstrakt

Mnoho látek exogenního nebo endogenního původu působí jako endokrinní disruptory (EDC), tedy interferují s přirozenou tvorbou, signalizací nebo metabolismem hormonů v organismu. Mezi rozšířené endokrinní disruptory exogenního původu patří benzo(a)pyren (BaP) a 17 α -ethinylestradiol (EE2), hojně se v prostředí vyskytuje také endogenní endokrinní disruptor 17 β -estradiol (E2).

V rámci této diplomové práce byl studován vliv uvedených EDC a jejich kombinací na genovou a proteinovou expresi CYP1B1, 3A1 a 3A2 v játrech, ledvinách a plicích potkanů *in vivo*. Proteinová exprese byla sledována za použití metody Western blot a specifických protilátek, genová exprese byla sledována pomocí kvantitativní PCR. Dále byl sledován vliv těchto látek na metabolismus benzo(a)pyrenu a na specifickou aktivitu CYP3A (stanovenou jako rychlost tvorby 6 β -hydroxytestosteronu) v mikrosomální frakci izolované z jater potkanů.

Bylo potvrzeno, že BaP výrazně indukuje expresi CYP1B1 v játrech a plicích jak samostatně, tak v kombinaci s EE2 nebo E2. Premedikace potkanů estradiolem spolu s BaP indukci CYP1B1 BaP ještě posiluje. Naopak premedikace potkanů EE2, E2 nebo jejich kombinací genovou expresi tohoto enzymu snižuje. U potkanů premedikovaných BaP nebo jeho kombinacemi dochází ke zvýšené tvorbě metabolitů BaP v jaterní mikrosomální frakci. V případě CYP3A1 a 3A2 dochází v játrech potkanů premedikovaných E2, EE2 a jejich kombinacemi ke snížení jejich exprese. To koresponduje se snížením specifické aktivity CYP3A v mikrosomální frakci izolované z jater potkanů premedikovaných EE2, E2 i jejich kombinacemi s BaP. V ledvinách způsobilo podání E2 naopak zvýšení exprese obou isoform CYP3A. V plicích dochází po premedikaci potkanů BaP k výraznému zvýšení genové exprese CYP3A1 a 3A2. Samotný EE2 nebo E2 expresi CYP3A1 a 3A2 také mírně zvyšují, avšak kombinace uvedených EDC expresi těchto isoform v plicích naopak výrazně snižují. Příčiny tohoto jevu musí být ještě objasněny.

Změny exprese CYP1B1, 3A1 a 3A2 způsobené studovanými EDC mohou vést k modifikaci jejich metabolismu, genotoxického působení v organismu a tím následně ovlivnit také jejich vliv na životní prostředí.

Klíčová slova: endokrinní disruptory, benzo(a)pyren, 17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol, cytochrom P450, exprese

Abstract

Many exogenous and endogenous compounds are referred to as endocrine disruptors (EDCs), as they interfere with natural synthesis, signaling and metabolism of endogenous hormones. Common exogenous endocrine disruptors are benzo(a)pyrene (BaP) and 17 α -ethinylestradiol (EE2). Endogenous endocrine disruptor 17 β -estradiol (E2) is frequently present in the environment as well.

In this thesis, the effect of the mentioned EDCs and their combinations on gene and protein expression of CYP1B1, 3A1 and 3A2 in rat liver, kidney and lung was determined. Protein expression was studied using Western blot method and specific antibodies; gene expression was assessed by quantitative PCR. Moreover, the effect of tested EDCs and their combinations on BaP metabolism and CYP3A specific activity (measured as testosterone 6 β -hydroxylation) were studied in liver microsomal samples.

It was confirmed, that BaP significantly increases CYP1B1 expression in rat liver and lung both alone and together with EE2 or E2. Pretreatment of rat with E2 and BaP increases the ability of BaP to induce CYP1B1 expression. On the contrary, EE2, E2 and their combination decrease the CYP1B1 gene expression. The rate of BaP metabolites formed in liver microsomal samples increases in rats pretreated with BaP and its combinations. In liver, there was a decrease in expression of CYP3A1 and 3A2 in rats pretreated with EE2, E2 and its combinations. This corresponds with specific activity of CYP3A, which decreased after pretreatment of rat with EE2, E2 and its combination with BaP. On the contrary, pretreatment of rat with E2 caused an increase in CYP3A1 and 3A2 expression in kidney. In lung, BaP significantly increases the gene expression of CYP3A1 and 3A2. EE2 and E2 alone slightly increase the gene expression of CYP3A1 and 3A2 as well. Combinations of these EDCs significantly decrease CYP3A expression, the cause of this phenomenon waits to be further elucidated.

The changes in CYP1B1, 3A1 and 3A2 expression caused by studied EDCs can influence their metabolism and genotoxic effects in organism and subsequently affect their impact on environment as well.

(In Czech)

Keywords: endocrine disruptors, benzo(a)pyrene, 17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol, cytochrome P450, expression

1 Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	6
Seznam použitých zkratk.....	10
2 Úvod a přehled literatury	12
2.1 Endokrinní disruptory	12
2.1.1 Estrogeny jako endogenní endokrinní disruptory	15
2.1.1.1 Estradiol.....	16
2.1.2 Exogenní endokrinní disruptory.....	19
2.1.2.1 Ethinylestradiol.....	20
2.1.2.2 Benzo(a)pyren.....	23
2.2 Cytochromy P450	28
2.2.1 Cytochromy P450 1B1, 3A1 a 3A2.....	29
3 Cíl práce	32
4 Materiál a metody.....	33
4.1 Materiál.....	33
4.1.1 Materiál a chemikálie.....	33
4.1.2 Použité přístroje	35
4.2 Metody.....	36
4.2.1 Premedikace potkanů.....	36
4.2.2 Stanovení koncentrace proteinů v mikrosomální frakci.....	37
4.2.3 Stanovení koncentrace cytochromů P450.....	37
4.2.4 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE).....	38
4.2.5 Western blot s imunodetekcí.....	40
4.2.6 Izolace RNA.....	41
4.2.7 Detekce přítomnosti RNA pomocí agarosové elektroforézy	43
4.2.8 Stanovení koncentrace a čistoty RNA.....	43
4.2.9 Syntéza cDNA – reverzní transkripce.....	44
4.2.10 Kvantitativní PCR	45
4.2.11 Studium metabolismu benzo(a)pyrenu	45

4.2.11.1	Separace metabolitů benzo(a)pyrenu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)	46
4.2.12	Stanovení specifické aktivity CYP3A: 6β-hydroxylace testosteronu.....	47
4.2.12.1	Separace metabolitů testosteronu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)	48
5	Výsledky	49
5.1	Charakterizace mikrosomální frakce	49
5.2	Charakterizace izolované RNA.....	50
5.3	Studium vlivu BaP, EE2, E2 a jejich kombinací na míru exprese CYP1B1 u potkana <i>in vivo</i>	51
5.4	Studium vlivu BaP, EE2, E2 a jejich kombinací na míru exprese CYP3A1 a CYP3A2 u potkana <i>in vivo</i>	54
5.5	Stanovení specifické aktivity CYP3A: 6β-hydroxylace testosteronu	60
5.6	Studium metabolismu benzo(a)pyrenu v játrech potkanů premedikovaných BaP, EE2, E2 a jejich kombinacemi	61
6	Diskuze.....	63
7	Závěr	67
8	Seznam literatury.....	69

Seznam použitých zkratek

17 β -HSD	17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa
6 β -OH TST	6 β -hydroxytestosteron
AhR	aryluhlovodíkový receptor
APS	persíran amonný
BaP	benzo(a)pyren
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
BPDE	benzo(a)pyrendioleoxid
BSA	bovinní sérový albumin
CAR	konstitutivní androstanový receptor
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
COMT	katechol-O-methyltransferasa
CYP	cytochrom P450
DDT	dichlordifenyltrichlotethan
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E1	estron
E2	estradiol
E3	estriol
EDC	endokrinní disruptory
EE2	ethinylestradiol
ER	estrogenový receptor
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
GAPDH	glyceraldehydfosfátdehydrogenasa
GS	NADPH generující systém
HAH	halogenované polycyklické uhlovodíku
mEH	mikrosomální epoxid hydrolasa
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NADPH	nikotinaminadenindinukleotid fosfát

NBT	nitrobluetatrazolium
NER	oprava nukleotidu excizí
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCR	polymerázová řetězová reakce
PVDF	polyvinylidenfluorid
PXR	pregnanový receptor X
qPCR	kvantitativní PCR
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	otáčky za minutu (z angl. "revolutions per minute")
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkripce
RXR	retinoidní receptor X
SDS	dodecylsulfátu sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
TEMED	tetramethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TST	testosteron
v/v	objem/objem
w/w	hmotnost/hmotnost
WB	Western blot

2 Úvod a přehled literatury

V průběhu posledních padesáti let mnoho cizorodých látek vzbudilo pozornost odborníků díky své schopnosti ovlivňovat endokrinní systém lidí i zvířat. Hormonální aktivita těchto látek vyšla najevo často až dlouho poté, co byly dané sloučeniny uvolňovány do životního prostředí. První známky podobných vlivů na lidské zdraví byly pozorovány u lidí pracujících s dichlordifenyltrichlorethanem (DDT) a dalšími pesticidy, u nichž docházelo ke snížení počtu spermií, poklesu libida a k impotenci. Záhy se podařilo potvrdit estrogenovou aktivitu různých látek také v laboratorních podmínkách. Například některé látky používané při výrobě plastových hmot (mj. používaných také pro výrobu laboratorních materiálů) ovlivňovaly výsledky studií zaměřených na přírodní estrogény. Od té doby bylo objeveno mnoho látek s obdobnými účinky [1].

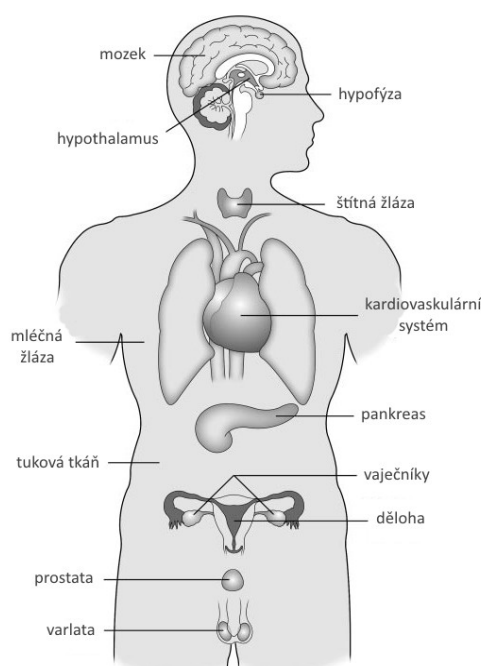
2.1 Endokrinní disruptory

Tyto látky byly označeny pojmem endokrinní disruptory (EDC, z angl. “endocrine disrupting chemicals”) a Agentura pro ochranu životního prostředí je definuje jako exogenní agens interferující se syntézou, sekrecí, transportem, metabolismem, vazbou nebo eliminací hormonů tělu vlastních, které jsou v organismu zodpovědné za homeostazi, reprodukci a vývojové procesy. Z fyziologické perspektivy se však jedná spíše o látky buď přírodní, nebo syntetické, které svým působením ovlivňují hormonální a homeostatické systémy organismu [2].

Mechanismus účinku EDC je velmi různorodý, kromě působení na jaderné hormonální receptory (estrogenové (ER), androgenové, progesteronové, thyroidní či retinoidní) interagují také s nejadernými receptory pro steroidní hormony (membránové ER), nesteroidními receptory (např. receptory pro neurotransmitery jako je serotoninový, dopaminový nebo norepinefrinový), orfánovými receptory (např. aryluhlovodíkový receptor (AhR, z angl. “aryl hydrocarbon receptor“)), s enzymatickými dráhami které jsou součástí biosyntézy a/nebo metabolismu steroidů a mnoha jinými mechanismy, které směřují k endokrinnímu a reprodukčnímu systému. [2].

Mezi endokrinní disruptory patří některá léčiva, dioxin a jemu podobné sloučeniny, polychlorované bifenyly, DDT a jiné pesticidy, a také látky používané při výrobě plastů jako je bisfenol A. Endokrinní disruptory tak lze nalézt v předmětech běžné potřeby včetně plastových lahví, kovových plechovek na potraviny, detergentů, hasicích přístrojů, jídla, hraček a kosmetiky [3]. Dalším z endokrinních disruptorů, jehož vliv pro hojný výskyt v lidské potravě nelze zanedbat, jsou fytoestrogeny [1].

Látky působící jako EDC jsou velmi různorodé a je proto těžké jejich hormonálně disruptivním efekt předvídat. Některé EDC byly přímo navrženy takovým způsobem, aby měly dlouhý poločas rozpadu, což však dříve představovalo výhodu pro průmyslové využití, je dnes špatnou zprávou pro životní prostředí a pro člověka. Tyto stabilní sloučeniny nemusí být v organismech metabolizovány vůbec, nebo mohou být metabolizovány na sloučeniny ještě toxičtější. I látky, jejichž používání bylo omezeno před desítkami let, zůstávají v životním prostředí ve vysokých koncentracích a mohou být detekovány v těle téměř každého testovaného člověka či zvířete. Obecně mají odolné EDC nízkou rozpustnost ve vodě a vysokou rozpustnost v tucích, což vede k jejich akumulaci v tukové tkáni. Žádná část endokrinního systému není vůči působení EDC zcela imunní (viz Obr. 1) [2].



Obrázek 1 Endokrinní systémy ovlivňované endokrinními disruptory (EDC), každý hormonálně senzitivní systém našeho organismu může být působením EDC ovlivněn (převzato a upraveno z [2])

Při zkoumání vlivu EDC na organismus je nutné vzít v úvahu mnoho různých faktorů [4]. Zcela zásadním faktorem je stáří jedince vystaveného působení EDC, neboť vyvíjející se organismy jsou k disruptivním efektům na endokrinní systém výrazně citlivější [5]. Vývojové procesy během organogeneze jsou ovlivněny steroidními hormony, které regulují geny klíčové pro vývoj plodu [6]. Velký vliv EDC v prenatálním stadiu vývoje je také umožněn tím, že estrogeny i testosteron jsou přímo schopné vyvolávat aktivitu v mozku a napomáhat jeho vývoji a vzniku sexuálního dimorfismu, tedy vývoji mozku typicky mužským nebo ženským způsobem. Také ostatní životní přeměny jako je puberta nebo reprodukční stárnutí (menopauza) jsou citlivým obdobím [5].

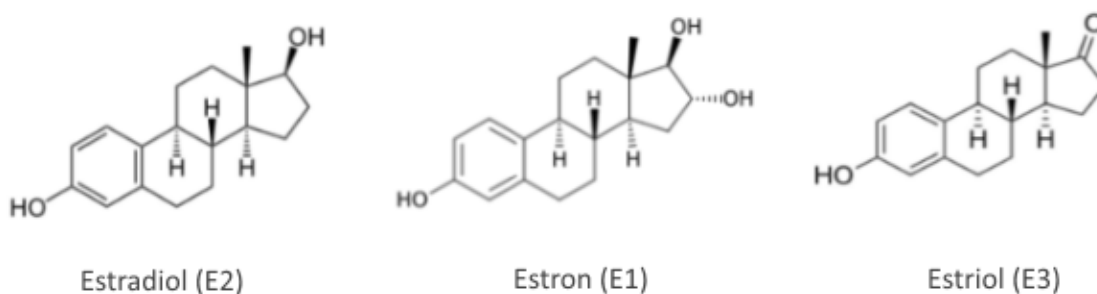
Vlivy EDC se mohou přenášet na následující generace vlivem epigenetických modifikací [6]. Epigenetika je molekulární jev umožňující regulaci exprese genů bez změny sekvence genomové DNA. Tato regulace je zprostředkována modifikacemi, jako je metylace DNA, post-translační modifikace histonů (acetylace, metylace, fosforylace) a změna ve struktuře chromatinu. Většina epigenetických studií prokázala, že životní prostředí hraje v tomto procesu důležitou roli a u mnoha chemikálií byla zároveň prokázána schopnost měnit vzorce metylace DNA a tím i epigenetické fenotypy [7].

Zásadní komplikací výzkumu EDC zůstává dlouhé období mezi expozicí a následnou manifestací klinických poruch. U lidí může být tato perioda dlouhá desítky let. Porucha reprodukce nemůže být odhalena, dokud jedinec nedosáhne určitého věku. Zpožděná puberta také nemůže být odhalena, dokud jedinec této fáze vývoje nedosáhne [2].

Vzhledem k tomu, že v prostředí nejsme nikdy vystaveni pouze jednomu konkrétnímu polutantu, musíme vzít v úvahu také kombinace těchto látek a jejich případný aditivní nebo synergický efekt [8].

2.1.1 Estrogeny jako endogenní endokrinní disruptory

Estrogeny jsou steroidní látky důležité především pro správný vývoj a funkci ženského reprodukčního ústrojí [9]. V organismech lidí a zvířat jsou syntetizovány primárně ve vaječnících, ale k jejich vzniku dochází také v dalších orgánech, například ve varlatech, hypotalamu, tukové tkáni nebo placentě. Estrogenové hormony jsou odvozeny z cholesterolu a pregnenolonu, jejich přímými prekurzory jsou androstendion a testosteron. Tři hlavní estrogeny vyskytující se v našem organismu se nazývají estradiol (E2), estron (E1) a estriol (E3) (viz Obr. 2). Aktivitu podobnou estrogenu nevykazují jen přírodní hormony produkované lidmi a zvířaty, ale také fytoestrogeny produkované rostlinami (isoflavony, lignany nebo kumestany) či mykoestrogeny syntetizované plísněmi. Estrogenicita byla zároveň pozorována u některých syntetických látek, tzv. xenoestrogenů, které jsou schopné efekt endogenních hormonů napodobovat. Přírodní hormony však ve srovnání s xenoestrogeny vykazují výrazně vyšší afinitu k vazbě estrogenových receptorů a mají tedy největší estrogenový potenciál. Výjimku tvoří farmaceutické hormony specificky navržené pro interakci s endokrinním systémem (např. ethinylestradiol, diethylstilbestrol a mestranol, používané pro kontrolu plodnosti a léčbu hormonálních poruch) [10]. Přírodní estrogeny jsou snadno odbouratelné biologickými reakcemi a během čištění odpadních vod běžně dochází k jejich degradaci pomocí bakterií a mikroorganismů za aerobních nebo anaerobních podmínek [11].



Obrázek 2 Struktura nejrozšířenějších lidských endogenních estrogenů estradiolu, estronu a estriolu
(převzato a upraveno z [12], [13])

2.1.1.1 Estradiol

Estradiol (17 β -estradiol, E2) je přírodní steroidní hormon, často se však vyskytuje jako součást terapeutických přípravků používaných pro postmenopauzální estrogenovou terapii či léčbu Alzheimerovy choroby. Naneštěstí se také stal jedním z nejrozšířenějších endokrinních disruptorů, se kterými se v našem okolí můžeme setkat [14]. Při katabolismu estrogenů v organismu dochází k jejich substitučním reakcím na hydroxylových skupinách a k následné konjugaci se sulfátem, glukuronidy nebo sulfoglukuronidy. Konjugované estrogены vykazují velmi nízkou estrogenovou aktivitu ve srovnání s nekonjugovanou formou. Tyto substituce navíc zvyšují rozpustnost estrogenů a usnadňují jejich eliminaci močí. Určitá část estrogenů je vyloučena trávicí soustavou v jejich nekonjugované volné formě, neboť ve střevě dochází k rozkladu konjugovaných forem vlivem mikroorganismů [10].

Vysoká estrogenová aktivita, která je přírodním hormonům přikládána, zdůrazňuje význam jejich možného negativního působení na životní prostředí. Díky velké afinitě k estrogenovým receptorům může přítomnost i nízkých koncentrací estrogenů v přírodě narušovat endokrinní systém mnoha divoce žijících organismů. Hlavním zdrojem estrogenů je lidská populace a hospodářská zvířata. Množství estrogenů vylučované lidmi a zvířaty se liší v závislosti na pohlaví, fyziologickém stavu, vývojovém stádiu a u zvířat také podle druhu. Lidé vylučují denně velké množství E1, E2 i E3 ve formě konjugátů s glukuronidy nebo sulfátem a to především močí (95%). Nejvyšší množství estrogenů vylučují ženy v průběhu těhotenství [10].

Biosyntéza estrogenů z cholesterolu zahrnuje několik enzymatických kroků, na nichž se zásadním způsobem mimo jiné podílí různé isoformy cytochromu P450 (CYP). Vznik pregnenolonu z cholesterolu je katalyzován CYP11A, vznik androstendionu z pregnenolonu pak umožňuje CYP17, následný vznik estrogenů katalyzuje CYP19. Účinný estradiol vzniká z estronu působením 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (17 β -HSD) (viz Obr. 3, str. 18) [15].

V systémech *in vivo* a *in vitro* bylo detekováno velké množství hydroxylovaných metabolitů estradiolu vznikajících za pomoci mnoha isoform CYP [16], [17]. Nejvýznamněji se na metabolismu estradiolu podílejí u lidí CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 a CYP3A4 [18]. Tyto metabolické dráhy jsou lokalizovány jak v játrech, tak v extrahepatálních tkáních. Vzhledem k hojné expresi většiny

isoforem CYP v játrech, však metabolismus estrogenů probíhá v největší míře právě zde [19].

V játrech je přibližně 80% estradiolu transformováno na 2-hydroxyestradiol a zbylých 20% na 4-hydroxyestradiol [19]. CYP1A1, CYP1A2 a CYP3A4 vykazují katalytickou aktivitu především směrem k 2-hydroxylaci estradiolu, oproti tomu CYP1B1 specificky katalyzuje 4-hydroxylaci estradiolu [20]. Vzhledem k tomu, že CYP1A1 není v játrech exprimován, 2-hydroxylace je zde katalyzována především isoformami CYP1A2 a CYP3A4 [21–23]. V extrahepatálních tkáních byl detekován 2-hydroxyestradiol vznikající za katalýzy CYP1A1 a CYP3A4 v prsech, děloze, placentě, mozku a hypofýze [24–26]. Vzhledem k vysokému výskytu CYP1B1 v lidských prsech a děloze, představuje v těchto tkáních 4-hydroxylace dominantní biotransformační dráhu pro estradiol [24, 27]. Mimo těchto metabolitů také vzniká velké množství minoritních hydroxylovaných metabolitů estradiolu (6 α -, 6 β -, 7 α -, 12 β -, 15 α -, 15 β -, 16 α - a 16 β -hydroxyestradiol) [16, 17] katalyzovaných různými isoformami CYP (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2C8, CYP3A4, CYP3A5 a CYP3A7) [20].

Zvýšené hladiny cirkulujících estrogenů zvyšují u člověka a u zvířat riziko vzniku nádoru prsu nebo endometria [18]. Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno, že estradiol tvoří nekovalentní komplexy s DNA, což vede ke snížení teploty tání šroubovice a tyto interakce mohou vyvolat mutace vedoucí k nežádoucím vedlejším účinků [28].

Bylo prokázáno, že podávání 4-hydroxyestradiolu může indukovat vznik tumorů a v několika typech nádorů se také podařilo tuto látku detekovat ve zvýšeném množství. 4-hydroxyestradiol vzniká především působením CYP1B1, jehož přítomnost byla také potvrzena v mnoha typech nádorů. Specifická a lokální tvorba 4-hydroxyestradiolu má pravděpodobně význam pro karcinogenezi prsu a endometria a stejně tak CYP1B1 hraje v tomto procesu klíčovou úlohu [18]. Na rozdíl od 4-hydroxyestradiolu, 2-hydroxyestradiol karcinogenní není. Může sice podléhat přeměně na semichinonové a chinonové deriváty, které se pojí se vznikem volných radikálů, v organismu je však rychleji methylován pomocí katechol-O-methyltransferasy (COMT) a volné radikály z něho nevznikají tak snadno. Vznikající 2-methoxyestradiol je navíc schopen proliferaci inhibovat [18] (viz Obr. 3, str. 18).

2.1.2 Exogenní endokrinní disruptory

Jak již bylo zmíněno, původně byly jako endokrinní disruptory vnímány především látky exogenního původu [29]. Mnoho EDC exogenního původu vykazuje estrogenovou aktivitu a je tak schopno interferovat s přirozenými signálními dráhami zprostředkovanými dvěma estrogenovými receptory ($ER\alpha$ a $ER\beta$) [30].

EDC interferující se signalizací estrogenových receptorů mohou modifikovat jejich aktivitu buď přímou interakcí s ER, modulací enzymů, které jsou zásadní pro fyziologickou syntézu estrogenu a jeho metabolismus, nebo nepřímo pomocí aryluhlovodíkového receptoru (AhR) [31].

Estrogenové receptory mají poměrně velké kapsy pro vazbu ligandů a jsou tak relativně promiskuitní, co se týče vazby exogenních látek. Mnoho exogenních látek tedy může ovlivňovat endokrinní systém přímou vazbou na estrogenové receptory, kompetovat s endogenními estrogeny a způsobovat tak aktivaci ER ve fyziologicky nevhodných situacích. EDC schopné vazby na ER obvykle vykazují určitou strukturní podobnost s estradiolem, mezi takto přímo působící EDC patří některé farmaceutické přípravky, bisfenoly, fytoestrogeny a organochlorinové pesticidy včetně DDT [30]. Ačkoliv $ER\alpha$ a $ER\beta$ váží estradiol s podobnou afinitou, mnoho exogenních ligandů mezi nimi vykazuje určitou selektivitu [31].

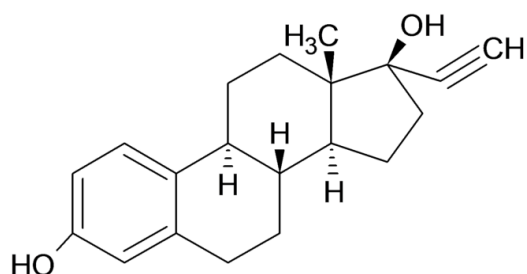
Další možnost jak ovlivňovat signalizaci ER představuje AhR, jehož signalizační mechanismus sdílí mnoho podobností se signalizací ER [32]. Většina známých ligandů AhR je exogenního původu a jeho endogenní ligand se dosud identifikovat nepodařilo. Aryluhlovodíkový receptor je aktivován širokým spektrem hydrofobních látek, zejména polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAH, z angl. "polycyclic aromatic hydrocarbon") a halogenovanými aromatickými uhlovodíky (HAH, z angl. "halogenated aromatic hydrocarbon") [33, 34]. Tyto ligandy obvykle působí jako antiestrogeny, ale mohou vykazovat i slabou aktivitu estrogenovou. Ačkoli skupiny ligandů AhR a ER se částečně překrývají a přispívají k jejich vzájemnému ovlivňování, pravděpodobně to není jediný důvod interference. Prvním vysvětlením je, že aktivace AhR receptorů indukuje expresi některých CYP, které jsou schopné urychlit metabolismus estradiolu a tedy redukovat jeho odezvu v organismu. Jako alternativní mechanismus by AhR mohl narušovat transkripci zprostředkovanou ER přímou vazbou na promotor cílového genu ER. Třetím možným mechanismem může být

kompetice mezi aktivovaným AhR a ER o dostupné kofaktory a tedy inhibice transkripčního potenciálu ER. Tato kompetice by závisela na množství a typech kofaktorů exprimovaných v konkrétní buňce a byla by značně závislá na okolí buněk a na konkrétních tkáních [30].

Jednotlivé EDC často působí pomocí několika mechanismů, včetně nepřímého ovlivňování pomocí aktivace jiných transkripčních faktorů, nebo modifikací metabolismu estrogenů [30].

2.1.2.1 Ethinylestradiol

Ethinylestradiol (také 17 α -ethinylestradiol, EE2, viz Obr. 4) je syntetický derivát estradiolu, který je často používán jako estrogenová složka v orálních antikoncepčních přípravcích [35]. V lékařství se však používá také při léčbě problémů spojených s menopauzou nebo při terapii rakoviny prostaty a prsu [11]. Kromě vazby na estrogenový receptor a změn s tím spojených, je EE2 schopen inhibovat 5 α -reduktasu v tkáni nadvarlat, snižovat hladinu testosteronu a zpomalovat tak progresi rakoviny prostaty. Svou úlohu hraje také při léčbě osteoporosy [35].



Obrázek 4 Struktura 17 α -ethinylestradiolu

Při chovu hospodářských zvířat se EE2 používá k navýšení produktivity, konkrétně k podpoře růstu a k prevenci a léčbě reprodukčních poruch. V akvaristice se pak sloučeniny EE2 využívají pro vývoj jednopohlavních populací rybiček pro optimalizaci růstu [11].

Ačkoli má podobnou strukturu jako estradiol, díky zavedení ethinylové skupiny do pozice 17 vykazuje EE2 nepolární chování a je tedy velmi těžké ho za běžných podmínek degradovat [11]. Právě tato odolnost vůči degradaci a také

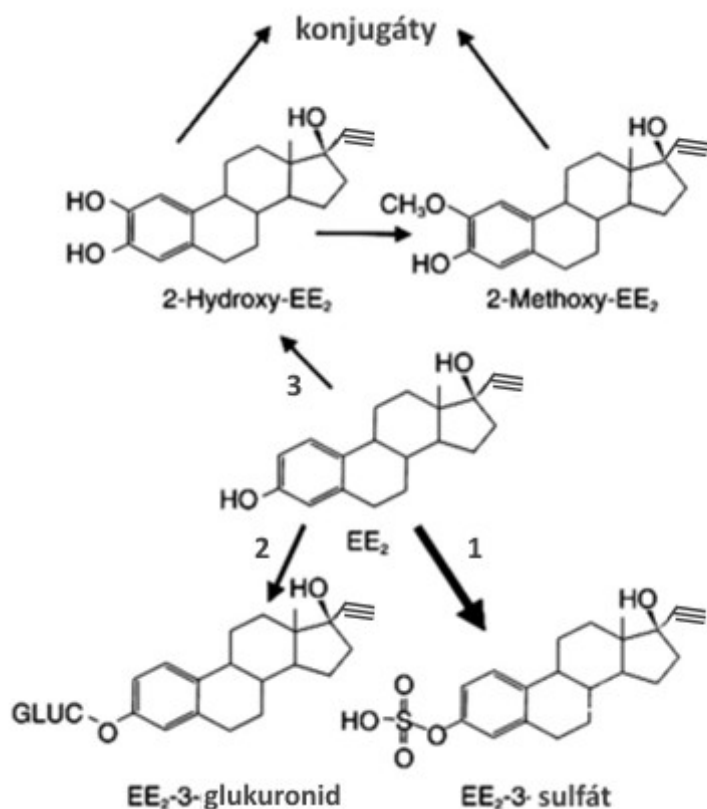
velká biologická dostupnost po orálním podání patří k vlastnostem, díky kterým je tato látka natolik užitečná pro terapeutické účely [11].

V lidském organismu je ethinylestradiol metabolizován oxidací, a také konjugací se sulfátem nebo glukuronidy. Sulfátové konjugáty jsou hlavními cirkulujícími metabolity, zatímco glukuronidy převažují v moči [36].

EE2 podléhá oxidaci v pozicích 2-, 4-, 6- a 16 α -, přičemž nejvýznamnější je 2-hydroxylace [37] katalyzovaná CYP3A4 [36]. 2-hydroxyethinylestradiol může být následně *in vivo* methylován za vzniku 2-methoxyethinylestradiolu. Oxidace však představuje pouze malý zlomek z biotransformačních reakcí, kterým EE2 podléhá (viz Obr. 5, str. 22). Dále může docházet ke glukuronidaci v pozicích 17 a 3 katalyzované uridindifosfátglukuronosyltransferasou 1A1 či k sulfataci nebo methylaci v pozici 3 za přispění sulfotransferasy 1E1. Dalším z možných způsobů biotransformace EE2 je odstranění ethinylové skupiny, probíhající v několika krocích [38].

Oxidativního metabolismu EE2 se účastní několik isoformů cytochromů P450, nejvýznamnější roli mezi nimi hrají CYP3A4 a CYP2C9, zatímco CYP2C8, CYP2C19 a CYP1A2 přispívají menší měrou. Některé studie ukázaly, že CYP1A1 vykazuje vyšší katalytickou aktivitu pro 2-hydroxylaci EE2 než CYP3A4. Jeho úloha v metabolismu EE2 je však nejasná vzhledem k obrovským interindividuálním rozdílům v jeho expresi u lidí. CYP1A1 je navíc indukovatelný omeprazolem a tabákovým kouřem, u uživatelů omeprazolu a kuřáček se však zrychlenou eliminací EE2 a snížením farmakologického efektu potvrdit nepodařilo [37].

Z EE2 se stal velmi rozšířený polutant vod právě díky jeho vysoké rezistenci k procesům biodegradace, tendenci sorbovat se na organické látky, akumulovat v sedimentech a koncentrovat se v živých organismech [11]. V současné době se nachází ve vysokých koncentracích v odpadních vodách a říčních ekosystémech, kde působí na endokrinní systém volně žijících organismů ve smyslu ovlivňování sexuální determinace, zpožděné pohlavní zralosti a sníženého vývoje sekundárních pohlavních znaků [11].



Obrázek 5 Biotransformace ethinylestradiolu v lidském organismu katalyzovaná enzymy sulfotransferasa 1E1 (1), uridindifosfátglukuronosyltransferasa 1A1 (2) a CYP3A4 (3) (převzato a upraveno z [11])

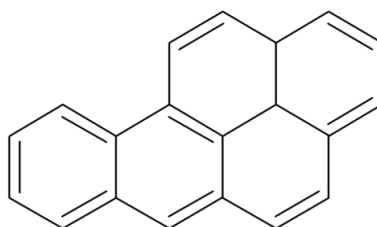
Za hlavní zdroj EE₂ v životním prostředí je považována lidská moč. Před vyloučením močí je EE₂ v těle metabolizován na biologicky neaktivní formu. Naproti tomu při vyloučení pomocí trávicí soustavy odchází z organismu především v původní aktivní formě (stejně jako estradiol), střeva totiž obsahují rozsáhlou populaci bakterie *Escherichia coli*, která má β -glukuronidasovou a sulfatasovou aktivitu a je schopná konjugáty EE₂ rozkládat [11].

Nedávné studie biologické degradace estrogenových sloučenin prováděné za použití různých druhů bakterií a mikroorganismů izolovaných z aktivovaného kalu odhalily, že je možné odstranit téměř všechny estradiol a ethinylestradiol za použití kombinované směsi mikrobů (*Achromobacter xylosoxidans* a *Ralstonia pickettii*) [11].

Ačkoli může EE₂ sorbovaný na sedimenty přetrvávat v životním prostředí po dlouhou dobu, očekává se, že právě schopnost sorbovat se na zeminy nebo sedimenty bude významným faktorem pro snižování koncentrace EE₂ ve vodním prostředí [11].

2.1.2.2 Benzo(a)pyren

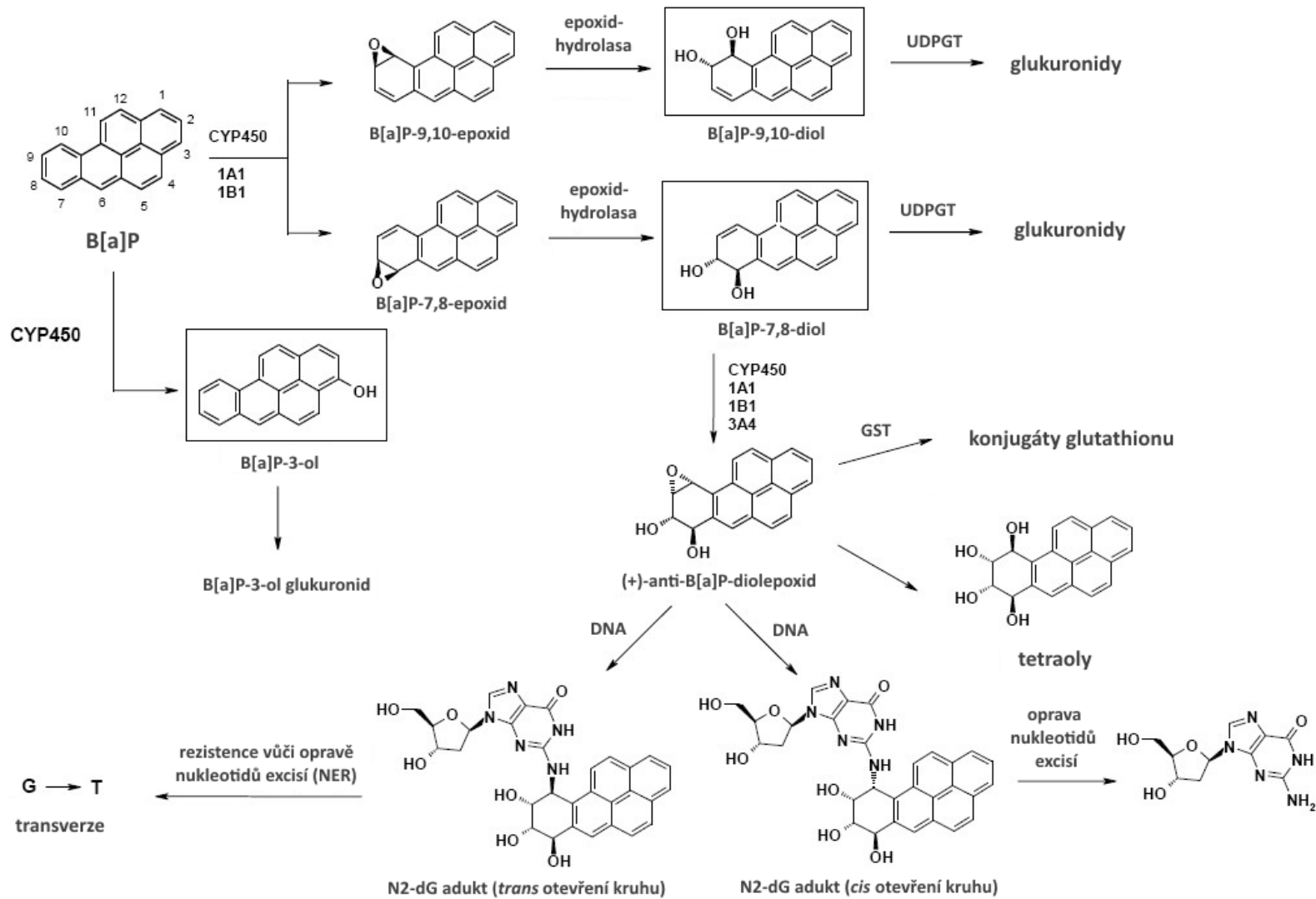
Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou produkovány především nedokonalým spalováním a pyrolýzou organických materiálů. V životním prostředí jsou téměř všudypřítomné. Kromě vdechování znečištěného vzduchu jsou jejich hlavními zdroji pro člověka tabákový kouř, strava a zpracovávání uhlí, dehtu nebo koksů. Typickým zástupcem této skupiny látek je benzo(a)pyren (BaP) (viz Obr. 6) [39]. Tato sloučenina má prokazatelný cytotoxický, teratogenní, genotoxický, mutagenní a karcinogenní efekt na velké množství různých buněk, tkání a organismů [39]. Zároveň je schopna chovat se jako endokrinní disruptor díky své interakci s AhR [30].



Obrázek 6 Struktura polycyklického aromatického uhlovodíku benzo(a)pyrenu

Hlavní CYP zahrnuté v metabolismu a bioaktivaci BaP jsou CYP1A1 a CYP1B1. Cytochromy P450 detoxifikují velké množství xenobiotik a kontaminantů životního prostředí, v některých případech jsou však schopné aktivovat prokarcinogeny jako je BaP na reaktivní formy interagující s DNA. BaP je navíc schopen indukovat expresi CYP1A1 a 1B1 prostřednictvím AhR receptoru. K indukci těchto cytochromů P450 dochází výrazněji v plicích než v játrech, což by mohlo vysvětlovat tkáňově specifickou karcinogenezi BaP [40].

Za katalýzy cytochromy P450 je benzo(a)pyren nejprve přeměňován na epoxidové metabolity jako B(a)P-2,3-epoxid, B(a)P-7,8-epoxid a B(a)P-9,10-epoxid. Tyto epoxidy mohou být následně metabolizovány opět za katalýzy CYP na fenolové metabolity B(a)P-3-ol, B(a)P-7-ol a B(a)P-9-ol nebo z nich mohou působením mikrosomální epoxid hydrolasy (mEH) vznikat dihydrodiolové metabolity B(a)P-7,8-diol a B(a)P-9,10-diol. Byly identifikovány také metabolity chinonové, konkrétně B(a)P-1,6-dion, B(a)P-3,6-dion a B(a)P-6,12-dion [41].

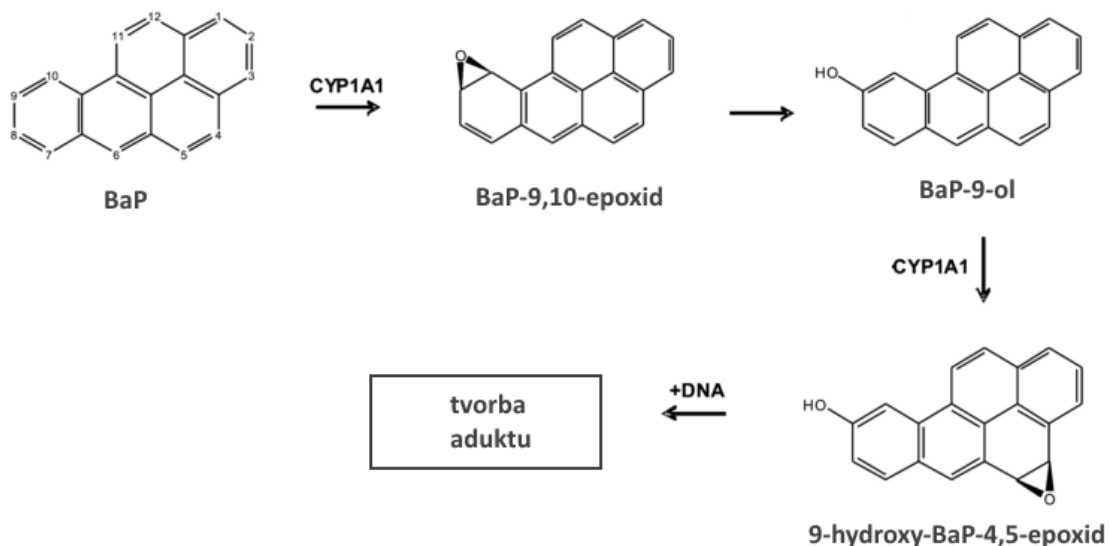


Obrázek 7 Biotransformace benzo(a)pyrenu v lidském organismu (převzato a upraveno z [42])

V organismech je BaP přeměňován na velké množství různých metabolitů jak detoxikačních, tak aktivačních. Nejběžnějším detoxikačním metabolitem je 3-hydroxybenzo(a)pyren (BaP-3-ol). Významnými aktivačními metabolity jsou BaP-7,8-diol a BaP-tetraol (viz Obr. 7, str. 24). Zatímco na vzniku BaP-7,8-diolu se podílí stejnou měrou CYP1A1 i CYP1B1, na vzniku BaP-tetraolu se podílí především CYP1A1 [43]. BaP-7,8-diol je dále za katalýzy CYP přeměňován na BaP-diolepoxid (BPDE), právě tento metabolit je hlavním karcinogenem vznikajícím z BaP, který se váže na DNA. Je však příliš reaktivní a není tedy možné ho identifikovat v inkubačních směsích. K detekci vzniku BPDE ve směsi se používá BaP-tetraol [42] (tedy hydrolyzovaná forma BPDE) [43].

BPDE je zodpovědný za tvorbu DNA aduktů, které mohou způsobovat mutace důležitých genů včetně tumor supresorových genů a onkogenů, jejichž deregulace může vést ke vzniku nádorů [44]. Z BPDE mohou vznikat dva typy aduktů s DNA, podle toho jakým způsobem dojde k otevření epoxidového kruhu. Při *trans* otevření a vzniku aduktu vzniká snadno opravitelné poškození DNA [42], tvoří se totiž termodynamicky destabilizovaná struktura, která je vhodným substrátem pro opravu nukleotidů excizí (NER, z angl. "nucleotide excision repair") [45]. Téměř identický produkt vzniklý *trans* otevřením epoxidu naopak termodynamickou stabilitu duplexu dramaticky zvyšuje a činí ji tak vůči NER zcela odolnou. Simulace ukazují, že destabilizace způsobená vnesením BaP je kompenzována stabilizováním patrových interakcí mezi aromatickými jádry a dusíkatými bázemi. Patrové interakce mezi karcinogenem a bází zvyšují lokální stabilitu a brání úspěšné opravě poškozeného vlákna DNA [45]. Patrové interakce (také nazývané π - π interakce) hrají důležitou roli při stabilizaci dvoušroubovice DNA, jejich podstatou je vzájemná interakce π -elektronových systémů lokalizovaných nad a pod rovinou aromatických kruhů [46].

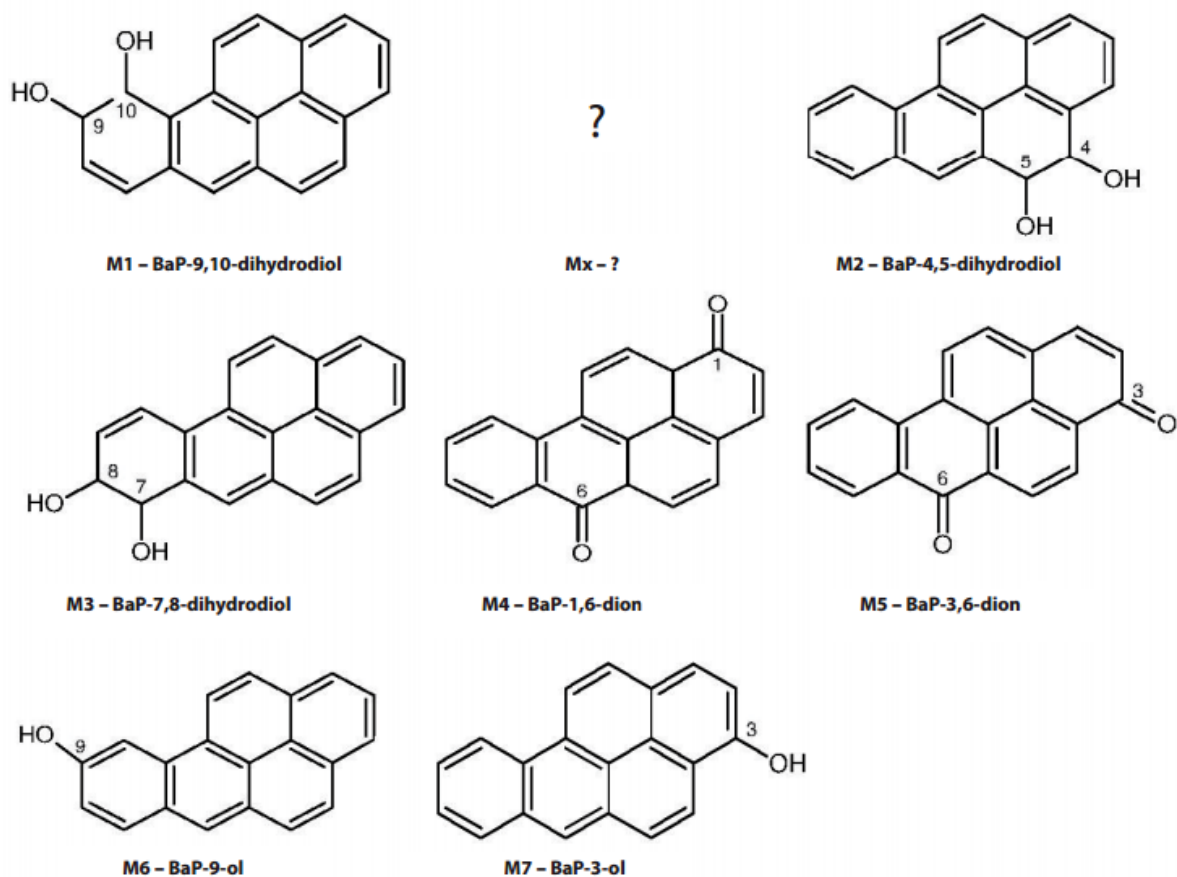
Ačkoliv vznik fenolových a chinonových derivátů je obvykle považován za krok směrem ke konjugačním a detoxikačním reakcím [41], také BaP-9-ol může prokazatelně vést k tvorbě aduktů s DNA, pokud dojde vlivem katalýzy CYP k jeho přeměně na 9-hydroxy-BaP-4,5-epoxid (viz Obr. 8, str. 26) [47].



Obrázek 8 Alternativní možnost tvorby DNA aduktu působením benzo(a)pyrenu (převzato a upraveno z [48])

Vyšší retence BaP a větší indukce enzymů CYP1A1 a CYP1B1 v plicích může vysvětlovat, proč kontakt s BaP poškozují především plíce, ačkoli játra představují hlavní detoxikační orgán v lidském organismu. Několik studií prokázalo, že expozice benzo(a)pyrenu nebo jeho metabolitům *in vitro* způsobuje změny v expresi genů zahrnutých nejen do metabolismu xenobiotik a odpovědi na AhR, ale také drah zahrnutých do regulace buněčného cyklu a odpovědi na p53 a apoptotické signály [49].

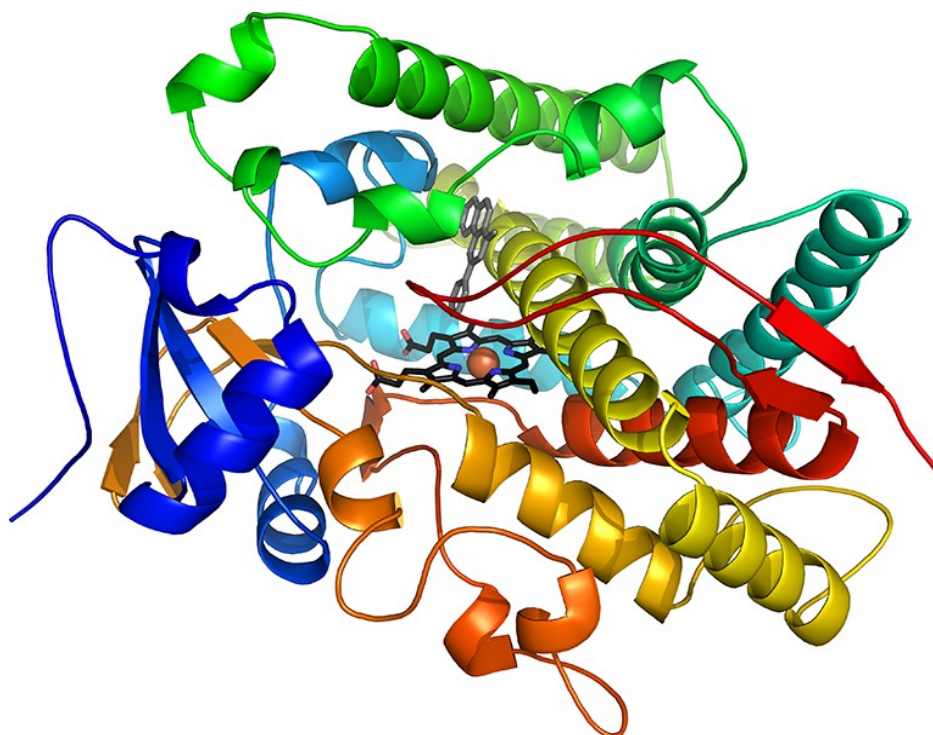
Ačkoli při biotransformaci BaP vzniká velké množství různých aktivačních a detoxikačních metabolitů (viz Obr. 9, str. 27), hlavním produktem je BaP-3-ol, tedy metabolit detoxikační [50].



Obrázek 9 Metabolity BaP vznikající za katalýzy lidského a potkaního jaterního mikrosomálního CYP1A1. Metabolity BaP-9,10-dihydrodiol (M1), BaP-4,5-dihydrodiol (M2), BaP-7,8-dihydrodiol (M3), BaP-1,6-dion (M4), BaP-3,6-dion (M5) a BaP-3-ol (M7) vznikají působením lidských jaterních mikrosomů, při použití potkaních jaterních mikrosomů, ve kterých byla pomocí Sudanu I indukována exprese CYP1A1 byly navíc identifikovány také metabolity BaP-9-ol (M6) a Mx, struktura metabolitu Mx zatím nebyla identifikována (převzato a upraveno z [50])

2.2 Cytochromy P450

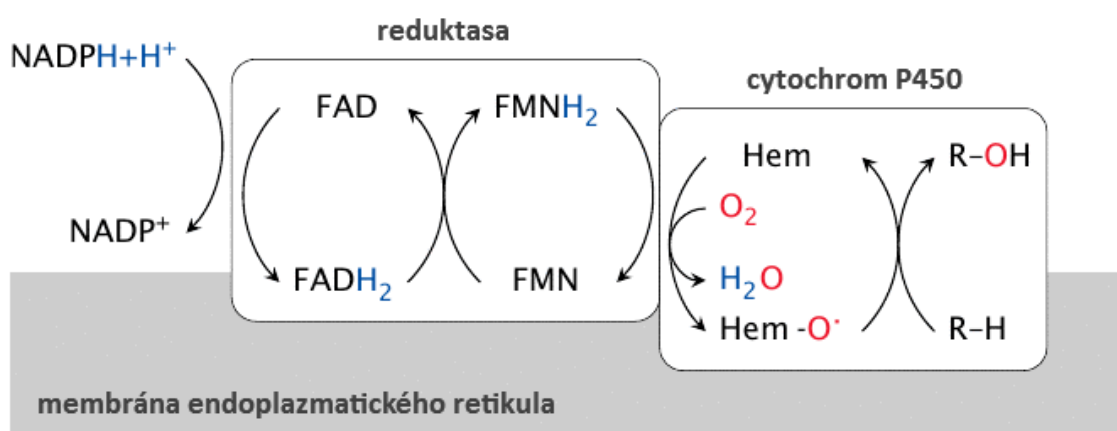
Cytochromy P450 (CYP) jsou rodinou enzymů schopných metabolizovat léčiva a endogenní látky (např. CYP1A1 metabolizující α -naftoflavon viz Obr. 10). Jedná se o hlavní enzymatický systém pro metabolismus cizorodých látek, který hraje primární roli v ochraně organismu proti potenciálně škodlivým látkám z okolí (polutanty, pesticidy ...). Regulace CYP probíhá především na transkripční úrovni, klíčovým mediátorem enzymů metabolizujících léčiva jsou jaderné receptory. Jejich ligandy jsou exogenní i endogenní látky, které mohou indukovat nebo naopak potlačovat jejich transkripci. Léčba látkami nebo xenobiotiky, které jsou agonisty nebo antagonisty jaderných receptorů, může vést k závažné toxicitě, ztrátě terapeutického efektu nebo k poruše metabolismu endogenních látek. Genetické polymorfismy těchto enzymů hrají důležitou roli v jejich aktivitě a musí na ně být brán zřetel v průběhu distribuce léčiv. Aktivita CYP závisí kromě genotypu také na prostředí. Tento fakt se využívá jako způsob identifikace polutantů, kterým byli skupiny organismů ve svém okolí vystaveny a také k předvídání predispozic k některým patologickým stavům [51].



Obrázek 10 Struktura lidského CYP1A1 s navázanou molekulou α -naftoflavonu, součástí molekuly CYP je kromě proteinové části také porfyrinový skelet s navázaným iontem železa (převzato a upraveno z [52])

Cytochromy P450 získaly svůj název podle charakteristického absorpčního pásu ve viditelném spektru kolem 450 nm, které vykazují v komplexu s oxidem uhelnatým. Toto spektrum se označuje jako tzv. Soretův pás. Ačkoli je popsáno mnoho různých hemoproteinů, ve většině z nich je iont železa vázán na protein přes aminokyselinu histidin, pouze v omezeném počtu molekul je iont železa vázán přes aminokyselinu cystein, jako je tomu u cytochromů P450. Někdy jsou proto označovány jako tzv. hem-thiolátové proteiny [53].

Cytochromy P450 spolupracují s dalším enzymem lokalizovaným v membráně endoplazmatického retikula NADPH:cytochrom P450 reduktasou (nebo jiným mitochondriálním enzymem) (viz Obr. 11). Reakce katalyzovaná CYP začíná přenosem elektronů z $\text{NADPH} + \text{H}^+$ na NADPH:cytochrom P450 reduktasu a dále na vlastní cytochrom P450. Redukovaný CYP je následně schopen aktivovat molekulu kyslíku, z jednoho atomu kyslíku vznikne molekula vody, zatímco druhý atom je inkorporován do substrátu. Jako donor atomu kyslíku může sloužit nejen molekula kyslíku, ale také peroxid či peroxokyselina [54].



Obrázek 11 Schéma reakčního mechanismu oxygenace substrátu katalyzované cytochromem P450 a NADPH:cytochrom P450 reduktasou (převzato a upraveno z [55])

2.2.1 Cytochromy P450 1B1, 3A1 a 3A2

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (isoformách, isoenzymech), které jsou dle míry homologie své primární struktury řazeny do genetických rodin. V současné době je známo téměř 500 isoform CYP. Cytochromy P450 sdílející více než 40% homologie aminokyselinové sekvence jsou řazeny do stejné rodiny,

pro příslušnost ke stejné podrodině musí CYP sdílet podobnost dokonce ve více než 60% aminokyselinové sekvence. Jednotlivé rodiny CYP jsou označovány prvním číslem za zkratkou CYP, následující velké písmeno označuje podrodinu, poslední číslo slouží k identifikaci konkrétních isoenzymů [54].

O některých mikrosomálních cytochromech P450 patřících do rodin 1 až 3 je známo, že jsou schopné v různých pozicích oxidovat jak endogenní, tak exogenní steroidní hormony. Míra exprese těchto proteinů se mezi jednotlivými tkáněmi značně liší. Mezi konkrétní isoformy CYP katalyzující metabolismus steroidů patří proteiny náležející k podrodinám CYP1A, 1B, 2B, 2C a 3A [56]. V rámci této diplomové práce byl studován vliv endokrinních disruptorů na isoformy CYP1B1, CYP3A1 a CYP3A2, tyto cytochromy P450 jsou zde tedy popsány detailněji.

Substrátová specifita CYP1B1 se kvalitativně podobá substrátovým specifitám CYP1A1 a CYP1A2, liší se však po stránce kvantitativní. Příkladem je metabolismus estradiolu, během něhož sice všechny isoformy katalyzují vznik obou majoritních produktů, CYP1A1 a CYP1A2 však katalyzují především vznik 2-hydroxyestradiolu, zatímco za katalýzy CYP1B1 dochází ke vzniku 4-hydroxyestradiolu a 2-hydroxyestradiolu v poměru 5:1 [27, 57]. Není známo, že by CYP1B1 katalyzoval přeměnu v rámci některé z hlavních metabolických drah. Jeho nejcharakterističtější aktivitou je právě vznik 4-hydroxyestradiolu [57].

Některé dřívější výzkumy naznačovaly, že ačkoli je messengerová ribonukleová kyselina (mRNA) pro CYP1B1 detekovatelná v mnoha tkáních napříč organismem, k translaci a vzniku proteinu dochází pouze u buněk nádorových [58]. Protein CYP1B1 sice opravdu vzniká v mnoha nádorových tkáních ve zvýšeném množství, ale dnes již víme, že je konstitutivně exprimován v mnoha tkáních jako jsou ledviny, mléčné žlázy, prostata, mozek, děloha, vaječníky a lymfatické uzliny [59]. Vzhledem k tomu, že ve zdravých játrech nepremedikovaných organismů bylo opakovaně detekováno pouze minimální množství mRNA a proteinu CYP1B1 a v dalších studiích se jejich přítomnost nepodařilo detekovat vůbec, je CYP1B1 považován za isoformu exprimovanou především extrahepatálně [59]. Je však možné jeho expresi v játrech indukovat a také k tomu hojně dochází [60].

O cytochromech P450 rodiny 1 je známo, že jsou indukovatelné polycyklickými aromatickými uhlovodíky aktivací aryluhlovodíkového receptoru

[41]. Pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) bylo dále prokázáno, že expresi CYP1B1 ovlivňuje také podávání estradiolu, existují tedy důkazy, že exprese CYP1B1 je regulovatelná interakcemi jak estrogenových, tak aryluhlovodíkových receptorů [18].

Stejně jako jiné isoformy je CYP1B1 schopen metabolicky aktivovat prokarcinogeny na karcinogenní formy, což vede k mutagenезi a vzniku nádorů [61]. Z těchto důvodů by regulátory exprese a katalytické aktivity CYP1B1 mohly hrát důležitou roli v prevenci rakoviny, zejména v raném stádiu vzniku nádorů. Bylo sledováno, že CYP1B1 je schopen generovat reaktivní kyslíkaté sloučeniny způsobující hypertenzi, což naznačuje, že inhibitory CYP1B1 by mohly být užitečné v léčbě hypertenze a s ní spojených kardiovaskulárních poruch [62].

Cytochromy P450 3A tvoří téměř 30% celkového množství CYP v lidských játrech a podílejí se na metabolismu více než 50% známých léčivých přípravků [63]. Mimo jiné se CYP3A podílí také na metabolismu steroidních látek včetně ethinylestradiolu a estradiolu [18, 37]. Byl sledován také jejich minoritní příspěvek k metabolismu benzo(a)pyrenu [64].

Extrahepatálně jsou CYP3A exprimovány také v ledvinách, děloze, gastrointestinálním traktu, plodu a placentě [54]. Expresi CYP3A může být indukována nebo inhibována mnoha různými látkami, což může ovlivňovat eliminaci zároveň užívaných léčiv a vést k neúspěšné léčbě nebo nežádoucí toxicitě [63].

Je známo, že indukce isoform CYP3A je zprostředkována jadernými receptory jako je pregnanový X receptor (PXR, z angl. "pregnane X receptor") a konstitutivní androstanový receptor (CAR, z angl. "constitutive androstane receptor") a dochází k ní pomocí dimerizace s retinoidním X receptorem (RXR, z angl. "retinoid X receptor"). Studie ukazují, že množství CYP3A mRNA v játrech je nižší u žen než u mužů, což by mohlo naznačovat vliv estrogenů na expresi těchto isoform CYP [18]. Vzhledem k tomu, že CYP3A1 a CYP3A2 sdílejí 89% podobnost sekvence aminokyselin, není lehké je odlišit pomocí vysoce specifických protilátek [65].

3 Cíl práce

Cílem předkládané diplomové práce je studium vlivu endokrinních disruptorů benzo(a)pyrenu, ethinylestradiolu, estradiolu a jejich kombinací na expresi a aktivitu cytochromů P450 1B1, 3A1 a 3A2 u potkanů *in vivo*.

Tato práce je součástí rozsáhlejší studie řešené v rámci grantového projektu: „Organismy a mechanismy určující osud endokrinních disruptorů v životním prostředí.“

Hlavními úkoly práce bylo:

- stanovit množství proteinů CYP1B1 a 3A1/2 v mikrosomální frakci jater, ledvin a plic potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem, ethinylestradiolem, estradiolem a jejich kombinacemi pomocí metody Western blot
- izolovat RNA z tkání premedikovaných potkanů a kontrolní skupiny
- stanovit relativní míru genové exprese CYP1B1, 3A1 a 3A2 v játrech, plicích a ledvinách premedikovaných potkanů a kontrolní skupiny pomocí reverzní transkripce a kvantitativní PCR
- studovat vliv endokrinních disruptorů benzo(a)pyrenu, ethinylestradiolu, estradiolu a jejich kombinací na metabolismus benzo(a)pyrenu v mikrosomální frakci jater premedikovaných potkanů a kontrolní skupiny
- stanovit specifickou aktivitu CYP3A v mikrosomální frakci jater premedikovaných potkanů a nepremedikované kontrolní skupiny

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Materiál a chemikálie

2-merkaptoethanol	Fluka, Švýcarsko
6 β -hydroxytestosteron	Cayman Chemical, USA
acetonitril (pro HPLC)	J.T. Baker, USA
agarosa	Invitrogen, UK
akrylamid	Fluka, Švýcarsko
anti-CYP1B1 králíčí	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-CYP3A1/2 králíčí	Sigma-Aldrich, USA
anti-GAPDH králíčí	Sigma-Aldrich, USA
anti-rabbit s alkalickou fosfatasou	Sigma-Aldrich, USA
APS	BIO-RAD, USA
BCIP	Promega Corporation, USA
benzo(a)pyren	Fluka, Švýcarsko
bis-akrylamid	Fluka, Švýcarsko
bromfenolová modř	Lach:Ner, ČR
Coomassie brilliant blue R-250	Serva, Německo
dihydrogenfosforečnan draselný	Lach:Ner, ČR
dithioničitan sodný	Lach:Ner, ČR
etanol	Lach:Ner, ČR
ethylacetát	Lach:Ner, ČR
FastStart Essential DNA Probes Master	Roche, Švýcarsko
fenacetin	Sigma-Aldrich, USA
Gel Loading Dye (6x)	New England BioLabs, USA
GENEzol™	Geneaid, Taiwan
glukosa-6-fosfát	Sigma-Aldrich, USA
glukosa-6-fosfátdehydrogenasa	Sigma-Aldrich, USA
glycerol	Lach:Ner, ČR
glycin	Lach:Ner, ČR

hexahydrát chloridu hořečnatého	Lach:Ner, ČR
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Scientific, USA
chlorid sodný	Lach:Ner, ČR
chloroform	Lach:Ner, ČR
kapalný dusík	Linde, Česká republika
kyselina octová	Lach:Ner, ČR
methanol (pro HPLC)	J.T. Baker, USA
methanol	Lach:Ner, ČR
Microplate BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, USA
NADP+	Sigma-Aldrich, USA
NADPH	Sigma-Aldrich, USA
NBT	Promega Corporation, USA
oxid uhelnatý	Linde, Česká republika
Ponceau barva	Loba-Chemie, Indie
potkaní CYP1B1 (supersomy)	BD Gentest™, USA
potkaní CYP3A1 (supersomy)	BD Gentest™, USA
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Sigma-Aldrich, USA
Precision Plus Protein Western C	Sigma-Aldrich, USA
PVDF membrána	Thermo Scientific, USA
RNA Loading Dye (2x)	New England BioLabs, USA
SDS	Sigma-Aldrich, USA
ss RNA Ladder	New England BioLabs, USA
sušené mléko	Laktino, ČR
SYBR™ green II	Thermo Scientific, USA
TaqMan sondy pro CYP 1B1, 3A1, 3A2 a β -aktin	Thermo Scientific, USA
TEMED	BIO-RAD, USA
testosteron	Fluka, Švýcarsko
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, USA
Triton X-100 24	Serva, Německo
uhličitan sodný	Lach:Ner, ČR

4.1.2 Použité přístroje

aparatura Fastblot B43	Biometra, Německo
automatické pipety Eppendorf	Eppendorf, Německo
automatické pipety Nichiryo	Nichipet EX, Japonsko
centrifuga Eppendorf 5415R	Eppendorf, Německo
centrifuga Eppendorf 5418	Eppendorf, Německo
CentriVap DNA Concentrator	Labconco, USA
cycler termální	Techne, UK
cycler Rotor Gene 2000	Corbett research, UK
elektrický zdroj pro elektroforézu EPS 301	Amersham Biosciences, UK
elektroforetická aparatura (vertikální)	BIO-RAD, USA
elektroforetická aparatura (horizontální)	Cleaver Scientific, UK
FLOWbox	Labox, ČR
HPLC systém Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies, USA
inkubátor IR 1500 Automatic CO ₂ Incubator	Flow Laboratories, Německo
inkubátor mini Dry Bath MiniB-100	MIULAB, Čína
magnetická míchačka Variomag	Monotherm, Německo
minicentrifuga Spectrafuge™	Labnet, USA
předvážky 440-35N	Kern, Německo
spektrofotomer Specord 250 plus Analytik	Jena, Německo
spektrofotometr na mikroobjemy	DeNovix, USA
spektrofotometr Tecan Sunrise Microplate reader	Tecan, Švýcarsko
termoblok	VLM, Německo
Thermomixer Compact	Eppendorf, Německo
transluminátor	Clare Chemical Research, USA
třepačka	ČSAV vývojové dílny, ČR
třepačka Mini rocker MR-1	Biosan, Lotyšsko
třepačka Yellow line os 2 basic	IKA, Německo
vortex Genius 3	IKA, Německo
vortex Mixer VX-200	Labnet, USA
vortex MS2 Minishaker	IKA, Německo
vortex VELP	Scientifica, Itálie

4.2 Metody

4.2.1 Premedikace potkanů

Potkani kmene Wistar byli premedikováni benzo(a)pyrenem (BaP), 17 α -ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi (viz Tabulka 1). Látky byly potkanům podávány rozpuštěné ve slunečnicovém oleji pomocí žaludeční sondy (gaváže). V každé premedikované skupině byli tři laboratorní potkani. Kontrolní skupině byl aplikován pouze slunečnicový olej.

Tabulka 1: Premedikace laboratorních potkanů

Dávkování	BaP	150 mg/kg hmotnosti potkana v 0,5 ml oleje
	EE2	20 mg/kg hmotnosti potkana v 0,5 ml oleje
	E2	20 mg/kg hmotnosti potkana v 0,5 ml oleje

Skupina	Premedikace
1	kontrolní skupina
2	BaP
3	EE2
4	E2
5	BaP + EE2
6	BaP + E2
7	EE2 + E2

Třetí den byla zvířata usmrcena, byly jim odebrány orgány (játra, ledviny a plíce), které byly zamrazeny tekutým dusíkem a uchovány při teplotě -80°C. Následně byla z těchto orgánů izolována mikrosomální frakce. Premedikace potkanů, odebrání orgánů a izolace mikrosomální frakce proběhly před zahájením této diplomové práce. 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).

4.2.2 Stanovení koncentrace proteinů v mikrosomální frakci

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí kitu Microplate BCA Protein Assay od Thermo Scientific. Tato metoda spočívá v redukci měďnatých iontů na měďné v alkalickém prostředí působením proteinu a následné detekci měďných iontů jejich chelatací na kyselinu bicinchoninovou. Vzniká fialový komplex, který je možné spektrofotometricky detekovat při vlnové délce 562 nm [66].

Vzorky byly odpovídajícím způsobem naředěny (játra 50×, ledviny 10×, plíce 10×) a byly připraveny kalibrační roztoky hovězího sérového albuminu (BSA) v rozsahu od 0,125 do 2 mg/ml. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno vždy 9 μ l vzorku, kalibračního roztoku nebo destilované vody a 260 μ l činidla připraveného z 50 dílů reagentu A (*pH 11,25; 2% (w/v) $Na_2CO_3 \cdot H_2O$, 0,95% (w/v) $NaHCO_3$, 0,4% (w/v) $NaOH$, 0,16% (w/v) *vínan sodno-draselný*) a 1 dílu reagentu B (4% (w/v) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$). Mikrosomální vzorky byly nanášeny v tripletech, kalibrační roztoky v dubletech.*

Mikrotitrační destička byla 1 minutu třepána (Yellow line os 2 basic), inkubována 30 minut při 37°C (IR 1500 Automatic CO2 Incubator) a následně temperována na laboratorní teplotu. Byla proměřena absorbance všech roztoků při vlnové délce 562 nm (Tecan Sunrise Microplate Reader) a následně byla vyhodnocena koncentrace proteinů ve vzorcích pomocí programu KIM 32.

4.2.3 Stanovení koncentrace cytochromů P450

V mikrosomální frakci jater a ledvin byla stanovena koncentrace cytochromů P450 pomocí charakteristické absorbance redukovaného CYP v komplexu s oxidem uhelnatým při vlnové délce 450 nm [67].

Vzorky mikrosomální frakce byly odpovídajícím způsobem naředěny (játra 40×, ledviny 20×) fosfátovým pufrem (*pH 7,4; 0,1M KH_2PO_4 , 20% (v/v) glycerol*). Ke každému vzorku byly přidány přibližně 2 mg redukčního činidla dithioničitanu sodného, po 5 minutách stání při laboratorní teplotě byl roztok rozdělen po 1 ml do dvou kyvet o optické dráze 1 cm a byla proměřena základní linie (Specord 250 plus Analytik). Obsah jedné vzorkové kyvety byl následně probubláván 2 minuty oxidem uhelnatým

a byla změřena jeho absorbance v rozsahu vlnových délek 400-490 nm. Koncentrace CYP byla vypočítána podle následujícího vzorce

$$c_{\text{CYP}} = \frac{A_{450} - A_{490}}{\varepsilon_{450} \times l} \times \text{\textit{\textit{ředění}} } [\mu\text{M}]$$

kde	A_{450}	absorbance při dané vlnové délce
	c_{CYP}	molární koncentrace cytochromu P450 [μM]
	l	optická dráha kyvety [1 cm]
	ε_{450}	extinkční molární koeficient CYP [$0,91 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

4.2.4 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Elektroforéza je metoda založená na separaci makromolekul v elektrickém poli, často bývá realizována za použití diskontinuálního polyakrylamidového gelu a dodecylsulfátu sodného (SDS) jako denaturačního činidla (SDS-PAGE). Molekuly SDS obalí polypeptidový řetězec, denaturují ho a udělí mu záporný náboj. V elektrickém poli jsou pak řetězce silně přitahovány ke kladné elektrodě. Malé molekuly se v gelu mohou pohybovat rychleji než molekuly velké, což vede k separaci denaturovaných proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Těto metody se používá především k určení relativní molekulové hmotnosti proteinů nebo k detekci některých hojně exprimovaných proteinů ve vzorcích [68].

Pro diskontinuální elektroforézu v polyakrylamidovém gelu byl použit 4% zaostřovací gel a 10% gel separační. Gely byly připraveny z destilované vody, 30% (w/v) akrylamidu (29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) bisakrylamid), pufru A (pH 8,8; 1,5M Tris/HCl) nebo pufru B (pH 6,8; 1,0M Tris/HCl), 10% (w/v) SDS, tetramethylethyldiaminu (TEMED) a 10% (w/v) persíranu amonného (APS) podle údajů uvedených v Tabulce 2. Připravené gely měly šířku 1 mm a byly opatřeny deseti jamkami o objemu 40 μl .

Tabulka 2 Příprava gelu pro SDS-PAGE

	10% gel (separační)	4% gel (zaostřovací)
Voda	1,9 ml	1,5 ml
30% akrylamid	1,7 ml	267 μ l
1,5M Tris A	1,3 ml	-
1,5M Tris B	-	250 μ l
10% SDS	50 μ l	20 μ l
TEMED	2 μ l	2 μ l
10% APS	50 μ l	20 μ l

Vzorky, které byly nanášeny na SDS-PAGE, obsahovaly vždy 75 μ g proteinu mikrosomální frakce. Vzorky jater a ledvin dále obsahovaly 5 μ l 4 \times koncentrovaného vzorkového pufru (*pH 6,8; 0,63M Tris/HCl, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 5% (v/v) 2-merkaptoethanol, 0,003% (w/v) bromfenolová modř*) a byly doplněny destilovanou vodou na celkový objem 20 μ l. Koncentrace proteinů v mikrosomální frakci plic byla nižší a vzorky byly tedy připraveny s 8 μ l vzorkového pufru a doplněny na celkový objem 35 μ l. Dále byly nanášeny supersomální CYP1B1 a CYP3A1 jako standardní vzorky. Vzorky i standardy byly před separací vařeny po dobu 6 minut (mini Dry Bath).

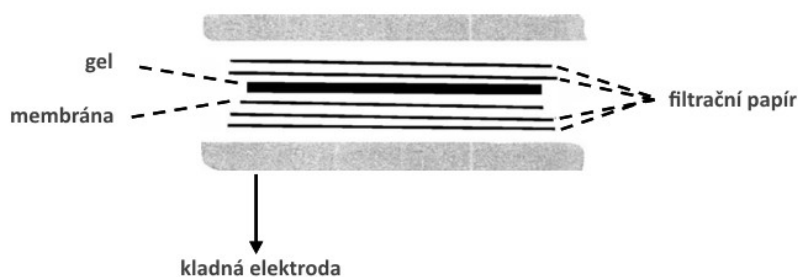
Gely byly upevněny do elektroforetické aparatury BIO-RAD, přelity elektrodoým puftrem (*pH 8,3; 0,192M glycin, 0,025M Tris/HCl, 0,1% (w/v) SDS*) a do jamek byly pomocí mikrostříkačky Hammilton podvrstveny vzorky, standard a marker pro určení molekulových hmotností dělených proteinů. Jako marker byl použit buď Precision Plus Protein Dual Color Standards (nanášeno 5 μ l) nebo Precision Plus Protein Western C (nanášeno 10 μ l). Elektroforéza probíhala 60-90 minut za stálého napětí 200 V.

Po ukončení elektroforézy byl odstraněn zaostřovací gel, separační gel byl vhodně označen a následně podroben metodě Western blot (viz kapitola 4.2.5) nebo přesunut do barvicí lázně (*0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 46% (v/v) ethanol, 9,2% (v/v) kyselina octová*) na dobu 30-60 minut. Obarvený gel byl následně ponořen do odbarvovacího roztoku (*25% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová*), kde byl ponechán přes noc, a druhý den omyt destilovanou vodou.

4.2.5 Western blot s imunodetekcí

Western blot (WB) je metoda používaná k detekci specifického proteinu v komplexní směsi. Elektroforeticky rozdělené proteiny přenesené na membránu jsou dobře přístupné novým reaktantům, což umožňuje jejich další analýzu. Po přenosu jsou volné části membrány zablokovány kaseinem a membrána je následně vystavena primární protilátce specificky se vážící na analyzovaný protein. Na primární protilátku se váže protilátka sekundární konjugovaná s enzymem umožňujícím vizualizaci, jedním z nejčastěji takto používaných enzymů je alkalická fosfatasa [69] katalyzující v přítomnosti 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfátu (BCIP) a nitro blue tetrazolium chloridu (NBT) vznik černo červeného precipitátu [70]. U WB se jako kontrola množství nanesených proteinů využívá tzv. "house-keeping" proteinů, které jsou ve všech buňkách exprimovány stejnoměrně. Příkladem takového proteinu je glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa (GAPDH) [71].

Po skončení SDS-PAGE byl gel určený na přenos ponechán 30 minut v přenosovém pufru (*pH 8,3; 0,192M glycín, 0,05M Tris/HCl*) a bylo nastříháno šest filtračních papírů Whatman a PVDF membrána. Filtrační papíry byly namočeny do přenosového pufru a membrána aktivována smáčením nejprve v methanolu po dobu 30 sekund, poté přibližně 1 minutu v destilované vodě a nakonec 5 minut v transferovém pufru. Do aparatury přístroje na elektropřenos (Fastblot B43) byly na sebe položeny tři vlhké filtrační papíry, aktivovaná PVDF membrána, gel a zbylé tři vlhké filtrační papíry (viz Obrázek 12). Aparatura byla překryta víkem a připojena ke zdroji (EPS 301). Hodnota použitého proudu byla vypočítána podle velikosti gelu. Přenos nejprve probíhal 10 minut při nastavení proudu 0,8 mA na 1 cm² a následně 45 minut za nastavení proudu 3,5 mA na 1 cm².



Obrázek 12 Uspořádání aparatury pro elektropřenos proteinů (převzato a upraveno z [69])

Po dokončení přenosu proteinů byla membrána ponořena na 20 sekund do barvy Ponceau (0,5% PONCEAU červeň v 1% kyselině octové) pro ověření kvality přenosu, barva byla následně odmyta destilovanou vodou a membrána byla ponořena do 5% roztoku sušeného odtučněného mléka v pufru PBS Triton X-100 (pH 7,2; 1,8mM Na₂HPO₄, 1mM NaH₂PO₄, 0,134M NaCl; 0,3% (w/v) TRITON X-100) (tzv. blokovací roztok) po dobu jedné hodiny za stálého třepání (ČSAV vývojové dílny) při laboratorní teplotě. Membrána byla rozstřížena na dvě části v oblasti odpovídající 37 kDa (určeno podle markeru). Část membrány obsahující proteiny o nižší molekulové hmotnosti než 37 kDa byla ponořena do primární králičí protilátky proti GAPDH ředěné blokovacím roztokem v poměru 1:5000. Horní část membrány byla ponořena do primární králičí protilátky proti příslušnému CYP. Protilátka proti CYP1B1 byla ředěna v poměru 1:400, protilátka proti CYP3A1/2 byla ředěna 600×. Inkubace probíhala přes noc při teplotě 4°C za stálého třepání (Mini rocker MR-1).

Druhý den byly obě části membrány promyty čtyřikrát 5 minut v blokovacím roztoku (viz složení výše) a následně byla aplikována sekundární protilátka s alkalickou fosfatase. Při stanovení CYP1B1, CYP3A1/2 i GAPDH byla použita kozí protilátka proti králičímu IgG s alkalickou fosfatase ředěná v poměru 1:1429. Membrány byly inkubovány v sekundární protilátce po dobu 1 hodiny na třepačce (ČSAV vývojové dílny) za laboratorní teploty. Membrána byla omyta dvakrát 5 minut v blokovacím roztoku, dvakrát pět minut v destilované vodě a pět minut v pufru PBS Triton X-100.

Proteiny CYP a GAPDH byly vizualizovány pomocí reakce alkalické fosfatasy s vyvolávacím roztokem. Vyvolávací roztok byl připraven těsně před použitím smícháním 5 ml ALP pufru (pH 9; 100mM Tris/HCl, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂.6H₂O), 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). Pro vyvolání byla membrána máčena ve vyvolávacím roztoku přibližně po dobu 3 minut a následně byla omyta v destilované vodě.

4.2.6 Izolace RNA

Ribonukleová kyselina (RNA) je jednovláknová molekula hrající zásadní roli v syntéze proteinů. Zcela klíčovou úlohu hraje messengerová RNA (mRNA), která je

po svém vzniku transportována do cytoplazmy, kde slouží jako matrice pro tvorbu proteinů [72].

RNA byla izolována ze sterilně odebraných tkání jater, plic a ledvin premedikovaných potkanů (viz kapitola 4.2.1) a také z orgánů kontrolních nepremedikovaných jedinců. Pro izolaci RNA bylo použito činidlo GENEzol™ Reagent od Geneaid a izolace probíhala ve sterilních podmínkách v laminárním boxu Labox.

V třecí misce byly spojeny části orgánů tří potkanů se shodnou premedikací a byly společně homogenizovány tlučkem v přítomnosti tekutého dusíku. Homogenát byl rozdělen do třech sterilních mikroskopických zkumavek obsahujících 1 ml činidla GENEzol™. Vzorky byly vortexovány (vortex Genius 3) a inkubovány po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Při izolaci RNA z jaterní tkáně byly vzorky centrifugovány po dobu 10 min pro oddělení nerozpustných částic (centrifuga Eppendorf 5415R, 16 000×g, 4°C) a supernatant byl převeden do čisté mikroskopické zkumavky Eppendorf. V průběhu izolace RNA z plicní a ledvinové tkáně byl tento krok vynechán.

Do mikroskopických zkumavek Eppendorf bylo přidáno 200 µl chloroformu, vzorky byly intenzivně vortexovány po dobu 20 sekund (vortex Genius 3) a následně stály 3 minuty při laboratorní teplotě. Pro separaci fází byly vzorky centrifugovány 15 minut (centrifuga Eppendorf 5415R, 16 000×g, 4°C). Vrchní vodná fáze byla odebrána do nové mikroskopické zkumavky a byl k ní přidán jeden objemový ekvivalent isopropanolu pro precipitaci RNA. Směs byla promíchána několikerým otočením mikroskopické zkumavky. Vzorky byly inkubovány 10 minut za laboratorní teploty a následně centrifugovány 15 minut (centrifuga Eppendorf 5415R, 16 000×g, 4°C). Pevná peleta RNA na dně mikroskopické zkumavky byla po odstranění supernatantu promyta. Byl přidán 1 ml ethanolu, vzorky byly krátce vortexovány (vortex Genius 3) a 5 minut centrifugovány (centrifuga Eppendorf 5415R, 16 000×g, 4°C). Většina supernatantu byla odstraněna pipetou a zbytek byl odpařen do sucha (termoblok VLM, 55°C). K peletě obsahující RNA bylo přidáno 40 µl destilované vody bez RNas (při izolaci více koncentrované RNA z jater bylo použito 60 µl vody). Vzorky byly krátce vortexovány a inkubovány po dobu 10 minut při teplotě 55°C pro rozpuštění pelety (termoblok VLM).

Získané vzorky RNA byly přesunuty na suchý led a následně uchovávány při teplotě -80°C.

4.2.7 Detekce přítomnosti RNA pomocí agarosové elektroforézy

Elektroforéza je standardní metodou umožňující nejen separaci proteinů, ale také separaci nukleových kyselin, podle jejich velikosti (tzn. podle jejich délky v párech bází) [73]. Jednu z možností vizualizace nukleových kyselin v gelu představuje interkalační barvivo SYBR Green II [74].

Izolovaná RNA (viz kapitola 4.2.6) byla separována pomocí elektroforézy na 1% agarosovém gelu připraveném z 0,4 g agarosu a 40 ml 0,5× koncentrovaného TBE pufru (*5× koncentrovaný TBE - 445mM Tris, 445mM kyselina boritá, 10mM EDTA, pH 8-8,3*). Vzorky byly připraveny smísením 2 µl roztoku izolované RNA (viz kapitola 4.2.6) a 0,4 µl pufru Loading dye (6×) od Applied Biosystems. Jako marker byl použit ss RNA Ladder. Agarosový gel byl v horizontální elektroforetické aparatuře převrstven 300 ml 5× koncentrovaného TBE pufru a byl na něj nanesen celý objem vzorků. Separace probíhala 40 minut při napětí 110 V (EPS 301) a gel byl následně ponořen do 10 000× ředěného barviva SYBR Green II, připraveného z 5 µl barviva Sybr Green II a 50 ml 1× koncentrovaného TBE pufru. Inkubace probíhala po dobu 30 minut na třepačce (ČSAV Vývojové dílny) při laboratorní teplotě bez přístupu světla. K vizualizaci byl použit UV transluminátor.

4.2.8 Stanovení koncentrace a čistoty RNA

Koncentrace a čistota RNA se stanovuje pomocí UV spektroskopie. Výpočet koncentrace RNA pomocí Lambert-Beerova zákona je založen na faktu, že roztok RNA o koncentraci 40 µg/ml vykazuje při vlnové délce 260 nm absorpční hodnotě 1. Čistota roztoku RNA je počítána jako poměr absorpčních hodnot při vlnové délce 260 nm (absorpční pás nukleových kyselin) a 280 nm (absorpční pás proteinů). Výpočet je korigován na pozadí při vlnové délce 320 nm, při této vlnové délce neabsorbují nukleové kyseliny ani proteiny, ale nečistoty [75, 76].

Vzorky obsahující izolovanou RNA byly naředěny 50× a byla proměřena jejich absorpce při 260 nm, 280 nm a 320 nm (DeNovix). Ze získaných hodnot byla vypočtena koncentrace RNA v těchto vzorcích a také jejich čistota. Za dostatečně čisté byly považovány roztoky s čistotou větší než 1,6. Pokud byla naměřená hodnota absorpce vyšší než jedna, byly vzorky navíc měřeny 100× ředěné.

$$\text{čistota} = \frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$$

4.2.9 Syntéza cDNA – reverzní transkripce

Enzym reverzní transkriptasa umožňuje syntetizovat podle vlákna mRNA tzv. komplementární DNA (cDNA), která může být následně použita jako templát pro klasickou polymerázovou řetězovou reakci. Kombinace reverzní transkripce (RT) a PCR umožňuje detekci i velmi nízkých koncentrací RNA ve vzorcích [77].

Reverzní transkripce byla provedena za použití kitu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits od Applied Biosystems. Byla připravena komplementární DNA ke vzorkům RNA izolované z jater, ledvin a plic nepremedikovaných a premedikovaných potkanů (viz kapitola 4.2.6). Během manipulace byly jak vzorky, tak reakční směsi udržovány v chladu. Práce probíhala ve sterilním prostředí za použití sterilního materiálu bez RNas. Každá reakční směs o celkovém objemu 20 μ l pro reverzní transkripci měla následující složení:

- 1 μ g RNA
- 2 μ l 10 \times koncentrovaného pufru pro RT
- 2 μ l 10 \times koncentrovaných náhodných primerů
- 0,8 μ l 25 \times koncentrované směsi deoxyribonukleotidů
- 1 μ l inhibitoru RNas
- destilovaná voda bez RNas

Z každé směsi byly odebrány 2 μ l, které představovaly kontrolní reakční směs bez reverzní transkriptasy. Ke zbylým 18 μ l byl přidán 1 μ l tohoto enzymu. Reverzní transkripce probíhala v thermocyleru Techne za následujících podmínek:

25°C	10 min
37°C	120 min
85°C	5 min
4°C	

Po ukončení reakce byly produkty uchovávány při teplotě -80°C.

4.2.10 Kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR (qPCR, také real-time PCR) je metoda vycházející z klasické polymerázové řetězové reakce umožňující kvantifikaci produktu pomocí detekce fluorescence. V průběhu qPCR je sledováno, kdy dojde k dostatečné amplifikaci signálu a fluorescence překročí určitou prahovou hodnotu (tzv. "treshold"). Tato technika bývá mimo jiné používána při analýze genové exprese [78].

Kvantitativní PCR byla provedena za použití kitu Fast Start Essential DNA Probes Master od Roche. Byly použity specifické sondy Taqman identifikující cDNA vzniklou reverzní transkripcí mRNA, jejíž translací by vznikly proteiny CYP1B1, CYP3A1 a CYP3A2. Jako referentní protein byl zvolen β -aktin.

Stanovení bylo provedeno pro vzorky jater, ledvin a plic nepremedikovaných a premedikovaných potkanů a každá reakční směs pro kvantitativní PCR měla následující složení:

- 5 μ l 10 \times ředěného roztoku cDNA
- 10 μ l 2 \times koncentrovaného roztoku Master Mix
- 1 μ l 20 \times koncentrovaného roztoku specifické sondy
- 4 μ l H₂O (PCR grade)

Kvantitativní PCR probíhala v cycleru Rotor Gene 2000 s úhlovým rotorem na 72 vzorků za následujících podmínek:

95°C	10 min	} 50 cyklů
95°C	15 min	
60°C	60 s	

4.2.11 Studium metabolismu benzo(a)pyrenu

Pro studium metabolismu benzo(a)pyrenu byla použita mikrosomální frakce z jater premedikovaných potkanů a kontrolní nepremedikované skupiny (viz kapitola 4.2.1). Reakční směsi o celkovém objemu 500 μ l byly připraveny do mikrozkupek Eppendorf v triplicátech a složení směsí bylo následující:

- fosfátový pufr (0,1M KH_2PO_4 ; pH 7,4)
- 1 mg/ml proteinu jaterní mikrosomální frakce potkana
- 10 μ M B(a)P (1 μ l 5mM B(a)P v dimethylsulfoxidu (DMSO))
- 50 μ l NADPH-generujícího systému (zásobní roztok: 1mM NADP⁺, 10mM D-glukosa-6-fosfát, 1 U/ml D-glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, 10mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$)

Byly připraveny také kontrolní reakční směsi, které neobsahovaly buď mikrosomální frakci nebo B(a)P nebo NADPH generující systém (GS). Reakce byla zahájena přidáním NADPH-generujícího systému a reakční směsi byly inkubovány za přítupu vzduchu 20 minut (Thermomixer Compact, 37°C, 400 RPM). Reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu, jako interní standard byl přidán fenacetin (5 μ l 1mM fenacetinu v methanolu). Vzniklé metabolity byly extrahovány dvakrát 1 ml ethylacetátu po dobu 2 minut (Thermomixer Compact, 1 400 RPM), vodná a organická fáze byly separovány pomocí centrifugace (centrifuga Eppendorf 5418, 5 minut, 13 000 RPM). Organická fáze byla odebrána do čisté mikroskopické Eppendorf a odpařena do sucha ve vakuové odparce (CentriVap DNA Concentrator, 37°C). Před separací pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byly vzorky rozpuštěny ve 25 μ l methanolu, vortexovány 20 sekund (MS2 Minishaker) a točeny na centrifuze po dobu 10 sekund (minicentrifuga Spectrafuge™).

4.2.11.1 Separace metabolitů benzo(a)pyrenu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)

Metabolity B(a)P byly separovány a kvantifikovány metodou HPLC za použití lineárního gradientu 0-100 % mobilní fáze B v průběhu 35 minut s následnou 10 minutovou isokratickou elucí. Mobilní fáze A byla tvořena 50% (v/v) acetonitrilem, mobilní fáze B obsahovala 85% (v/v) acetonitrilu. Separace probíhala na koloně Nucleosil 100-5 C18 HD, 5 μ m, 250 x 4 mm (Macherey-Nagel) při teplotě 35°C s konstantní průtokovou rychlostí mobilní fáze 0,6 ml/min. Metabolity byly detekovány při vlnové délce 254 nm a kvantifikovány vztažením jejich plochy k ploše vnitřního standardu (fenacetinu). Nástřik na kolonu činil 20 μ l. Pro separaci

byl použit HPLC systém Agilent Technologies 1200 Series, pro udržení stálé teploty kolony byl použit termostat Column Oven LCO 102.

4.2.12 Stanovení specifické aktivity CYP3A: 6 β -hydroxylace testosteronu

6 β -hydroxylace testosteronu (TST) byla stanovována v mikrosomální frakci jater premedikovaných potkanů a kontrolní nepremedikované skupiny (viz kapitola 4.2.1). Reakční směsi o celkovém objemu 500 μ l byly připraveny do mikrozkušavek Eppendorf v triplikátech a složení směsí bylo následující:

- fosfátový pufr (*0,1M KH₂PO₄; pH 7,4*)
- 0,5 mg/ml proteinu jaterní mikrosomální frakce potkana
- 50 μ M TST (*2,5 μ l 10mM TST v methanolu*)
- 50 μ l NADPH-generujícího systému (*zásobní roztok: 1mM NADP⁺, 10mM D-glukosa-6-fosfát, 1 U/ml D-glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, 10mM MgCl₂·6H₂O*)

Byly připraveny také kontrolní reakční směsi, které neobsahovaly buď mikrosomální frakci nebo B(a)P nebo GS. Reakční směsi byly preinkubovány bez přítomnosti GS po dobu 5 minut (Thermomixer Compact, 37°C), reakce byla zahájena přidáním 50 μ l GS a vzorky byly inkubovány za přítomnosti vzduchu po dobu 15 minut (Thermomixer Compact, 37°C, 400 RPM). Reakce byla zastavena přidáním 100 μ l roztoku 1M Na₂CO₃/2M NaCl a vzorky byly 20 sekund vortexovány (vortex MS2 Minishaker). Jako interní standard byl přidán fenacetin (5 μ l 1mM fenacetinu v methanolu). Vzniklé metabolity byly extrahovány dvakrát 1 ml ethylacetátu po dobu 2 minut (Thermomixer Compact, 1 400 RPM), vodná a organická fáze byly separovány pomocí centrifugace (centrifuga Eppendorf 5418, 5minut, 13 000 RPM). Organická fáze byla odebrána do čisté mikrozkušavky Eppendorf a odpařena do sucha ve vakuové odparce (CentriVap DNA Concentrator, 37°C). Před separací pomocí HPLC byly vzorky rozpuštěny ve 30 μ l methanolu, vortexovány 20 s (vortex MS2 Minishaker) a točeny na centrifuze po dobu 10 s (minicentrifuga Spectrafuge™).

4.2.12.1 Separace metabolitů testosteronu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)

Metabolity TST byly separovány a kvantifikovány pomocí metody HPLC za použití lineárního gradientu 0-100 % mobilní fáze B po dobu 27 minut. Mobilní fáze A byla tvořena 50% (v/v) methanolem, mobilní fáze B obsahovala 75% (v/v) methanolu. Separace probíhala na koloně Nucleosil 100-5 C18, 250 x 4 mm (Macherey-Nagel) při teplotě 35°C s konstantní průtokovou rychlostí mobilní fáze 0,6 ml/min. Testosteron a jeho metabolity byly detekovány při vlnové délce 254 nm a kvantifikovány vztažením jejich plochy k ploše vnitřního standardu (fenacetinu). Následné vyhodnocení bylo provedeno za použití pětibodové kalibrační křivky s rozsahem 10 až 200 $\mu\text{mol/l}$, odezvy jednotlivých kalibračních bodů byly také vztaženy na plochu vnitřního standardu. Nástřik na kolonu činil 25 μl . Pro separaci byl použit HPLC systém Agilent Technologies 1200 Series, pro udržení stálé teploty kolony byl použit termostat Column Oven LCO 102.

5 Výsledky

Předkládaná diplomová práce se zabývá vlivem vybraných endokrinních disruptorů a jejich kombinací na genovou a proteinovou expresi CYP1B1, 3A1 a 3A2 v játrech, ledvinách a plicích potkanů *in vivo*. Byl sledován také vliv těchto látek na metabolismus benzo(a)pyrenu a na specifickou aktivitu CYP3A.

5.1 Charakterizace mikrosomální frakce

Nejprve bylo stanoveno množství proteinů v mikrosomální frakci jater, ledvin a plic nepremedikovaných a premedikovaných potkanů (viz kapitola 4.2.2). Dále bylo stanoveno celkové množství cytochromu P450 v mikrosomální frakci izolované z jater a ledvin potkanů. Naměřená data jsou uvedena v Tabulce 3. V mikrosomální frakci izolované z plic potkanů byla koncentrace CYP příliš nízká a nepodařilo se ji proto stanovit. Ze získaných hodnot byl vypočten specifický obsah CYP (koncentrace CYP vztažená na celkovou koncentraci proteinů) (viz Tabulka 3).

Tabulka 3 Koncentrace celkového proteinu, celkového cytochromu P450 (CYP) a specifický obsah CYP v mikrosomální frakci potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi

skupina	premedikace	JÁTRA			LEDVINY			PLÍCE
		C _{proteinů} (mg/ml)	C _{CYP} (μM)	C _{CYP} /C _{proteinů}	C _{proteinů} (mg/ml)	C _{CYP} (μM)	C _{CYP} /C _{proteinů}	C _{proteinů} (mg/ml)
1	-	13,0	5,54	0,426	9,25	0,945	0,102	4,71
2	BaP	20,3	12,9	0,635	7,14	0,967	0,135	2,90
3	EE2	16,9	6,86	0,406	6,68	0,549	0,082	4,05
4	E2	31,9	10,0	0,313	7,25	0,835	0,115	3,08
5	BaP + EE2	14,1	6,33	0,449	7,59	0,879	0,116	5,24
6	BaP + E2	17,0	9,85	0,579	7,14	1,23	0,172	3,79
7	EE2 + E2	19,7	9,85	0,500	11,2	0,945	0,084	5,18

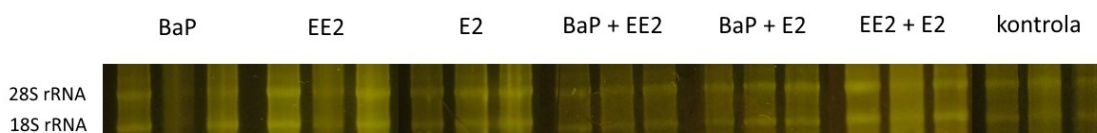
5.2 Charakterizace izolované RNA

Dále byla pomocí spektrofotometrie stanovena koncentrace a čistota RNA, která byla izolována z výše uvedených orgánů potkanů nepremedikovaných a premedikovaných vybranými endokrinními disruptory (viz kapitola 4.2.1). Výsledné hodnoty koncentrace RNA jsou uvedeny v Tabulce 4. Izolace byla provedena vždy paralelně ve třech roztocích. Všechny roztoky vykazovaly dostatečnou čistotu (uvažovány hodnoty nad 1,6) a byly použity k dalšímu zpracování.

Tabulka 4 Koncentrace a čistota RNA izolované z jater, ledvin a plic potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi

skupina	premedikace	JÁTRA		LEDVINY		PLÍCE	
		C_{RNA} ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	čistota	C_{RNA} ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	čistota	C_{RNA} ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	čistota
1	-	1,826	1,77	1,430	1,81	0,685	1,89
		3,208	1,74	2,102	1,87	0,362	2,05
		1,496	1,72	1,472	1,90	0,419	1,90
2	BaP	2,826	1,77	0,547	2,03	1,754	1,75
		1,862	1,76	0,561	2,01	0,934	1,90
		1,378	1,79	1,167	1,83	0,957	1,76
3	EE2	2,000	1,71	1,100	1,98	0,602	1,83
		1,886	1,75	0,949	2,00	0,432	1,82
		2,774	1,74	1,280	1,83	0,595	2,00
4	E2	1,714	1,75	0,740	2,04	0,758	1,76
		1,852	1,76	0,728	1,99	0,435	1,97
		2,276	1,75	1,618	1,89	0,717	1,84
5	BaP + EE2	2,206	1,76	0,875	1,93	0,556	1,71
		1,864	1,765	0,625	1,85	0,512	1,74
		1,550	1,824	0,627	1,79	0,528	1,83
6	BaP + E2	3,684	1,919	0,494	1,80	0,522	1,86
		3,649	1,942	1,064	1,84	0,614	1,94
		2,621	1,963	1,083	1,76	0,435	1,89
7	EE2 + E2	1,698	1,726	1,206	1,93	0,760	1,82
		1,736	1,754	1,288	1,74	0,712	1,79
		2,658	1,770	1,260	1,80	0,422	1,83

Pomocí agarosové elektroforézy a barviva SYBR Green II byla potvrzena přítomnost RNA ve všech roztocích izolované RNA a tedy úspěšnost procesu izolace (viz Obr. 13). Na obrázku jsou viditelné dva signály odpovídající 18S a 28S rRNA, tedy molekulám, které tvoří významnou část izolované buněčné RNA a je možné je vizualizovat.

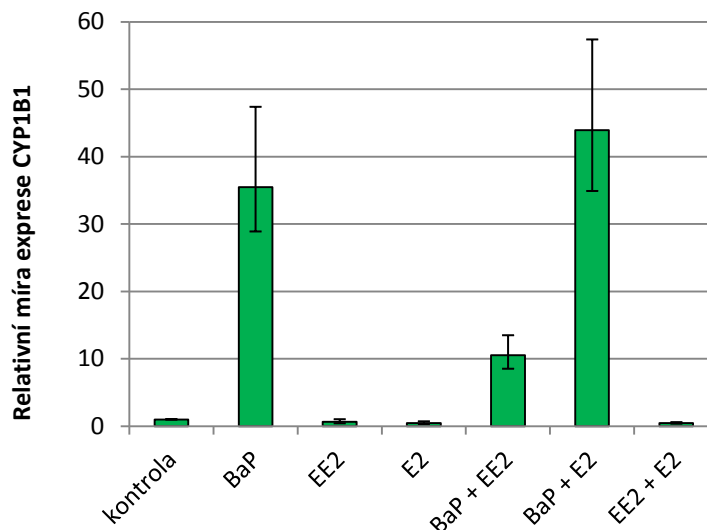


Obrázek 13 Vizualizace přítomnosti RNA v roztocích RNA izolovaných z jater potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi pomocí agarosové elektroforézy a barviva SYBR Green II (viz kapitola 4.2.7)

5.3 Studium vlivu BaP, EE2, E2 a jejich kombinací na míru exprese CYP1B1 u potkana in vivo

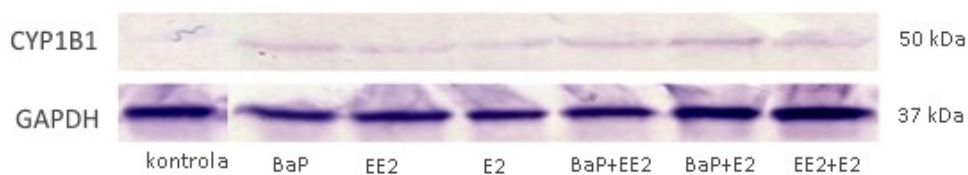
Ve vzorcích izolované RNA z jater, ledvin a plic potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem, ethinylestradiolem, estradiolem a jejich kombinacemi byla sledována nejprve relativní míra genové exprese CYP1B1 pomocí kvantitativní PCR. Následně byla sledována také míra exprese samotného proteinu CYP1B1 pomocí metody Western blot spojené s detekcí CYP1B1 za použití specifických protilátek.

Z Obr. 14 (str. 52) je zřejmé, že došlo ke zvýšení relativní míry genové exprese CYP1B1 v játrech potkanů premedikovaných BaP a jeho kombinacemi s EE2 a E2 ve srovnání s kontrolní skupinou. Tato indukce genové exprese CYP1B1 byla nejvýraznější u potkanů premedikovaných samotným BaP a kombinací BaP a E2. U potkanů premedikovaných BaP spolu s EE2 došlo ke snížení míry indukce oproti potkanům premedikovaným samotným BaP. V játrech potkanů premedikovaných samotným EE2 a EE2 spolu s E2 došlo naopak k signifikantnímu snížení genové exprese CYP1B1.



Obrázek 14 Genová exprese CYP1B1 v játrech potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi

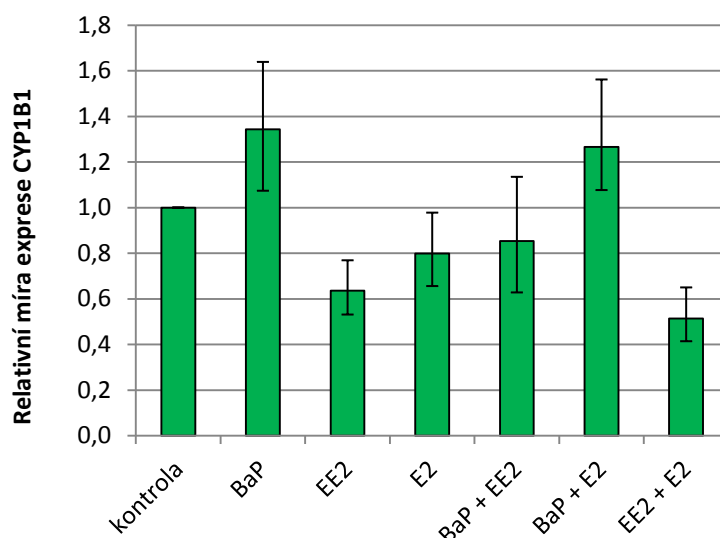
Také na proteinové úrovni došlo ke zvýšení exprese CYP1B1 v jaterních mikrosomech potkanů premedikovaných BaP a jeho kombinacemi (viz Obr. 15).



Obrázek 15 Detekce CYP1B1 na proteinové úrovni v mikrosomální frakci jater potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi.

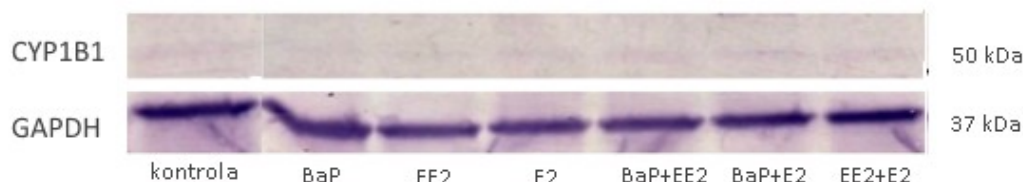
Pro porovnání byl detekován také konstantně exprimovaný protein GAPDH

V ledvinách potkanů premedikovaných BaP a kombinací BaP a E2 došlo k mírnému zvýšení relativní míry genové exprese CYP1B1 oproti kontrolní skupině, u potkanů premedikovaných EE2 a kombinací EE2 s E2 došlo naopak k mírnému poklesu genové exprese tohoto proteinu (viz Obr. 16, str. 53).



Obrázek 16 Genová exprese CYP1B1 v ledvinách potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi

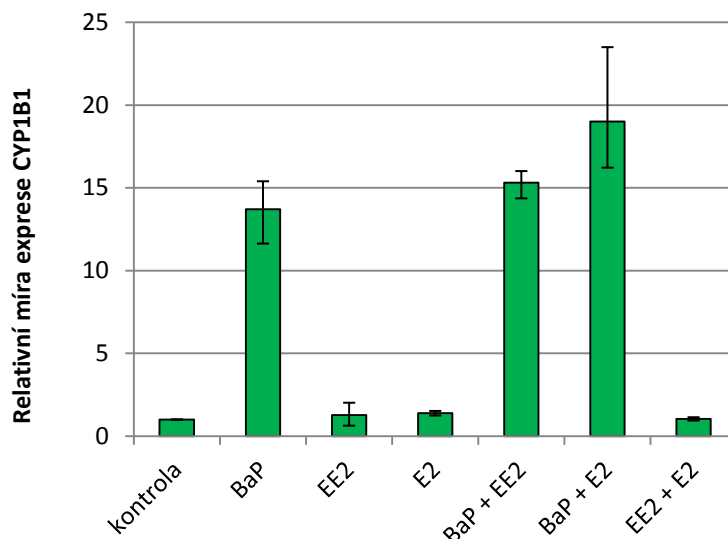
Pomocí specifické protilátky byla potvrzena přítomnost proteinu CYP1B1 v mikrosomální frakci ledvin potkanů, nepodařilo se však posoudit rozdíly v jeho množství mezi jednotlivými premedikačními skupinami a kontrolní skupinou (viz Obr. 17).



Obrázek 17 Detekce CYP1B1 na proteinové úrovni v mikrosomální frakci ledvin potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi. Pro porovnání byl detekován také konstantně exprimovaný protein GAPDH

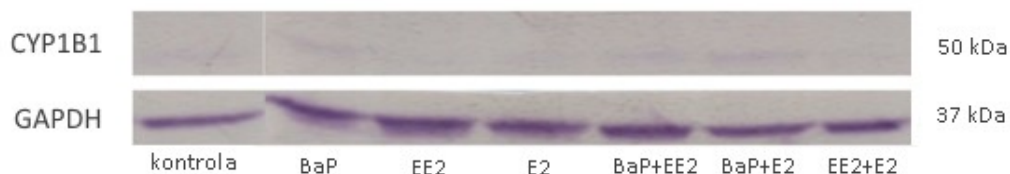
Ke zvýšení relativní míry genové exprese CYP1B1 oproti kontrolní skupině došlo také v případě plicní tkáně potkanů premedikovaných samotným BaP a jeho kombinacemi s EE2 a E2 (viz Obr. 18, str. 54).

Zvýšení genové exprese CYP1B1 v ledvinách potkanů premedikovaných BaP bylo nejnižší v porovnání se zvýšením genové exprese v játrech a plicích potkanů premedikovaných BaP v kombinaci s EE2 nebo E2 (viz obr. 14, str. 52).



Obrázek 18 Genová exprese CYP1B1 v plicích potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi

Na proteinové úrovni byla zřetelně vizualizována pouze přítomnost CYP1B1 ve vzorcích mikrosomální frakce izolované z plic potkanů premedikovaných BaP a jeho kombinacemi (viz Obr. 19).



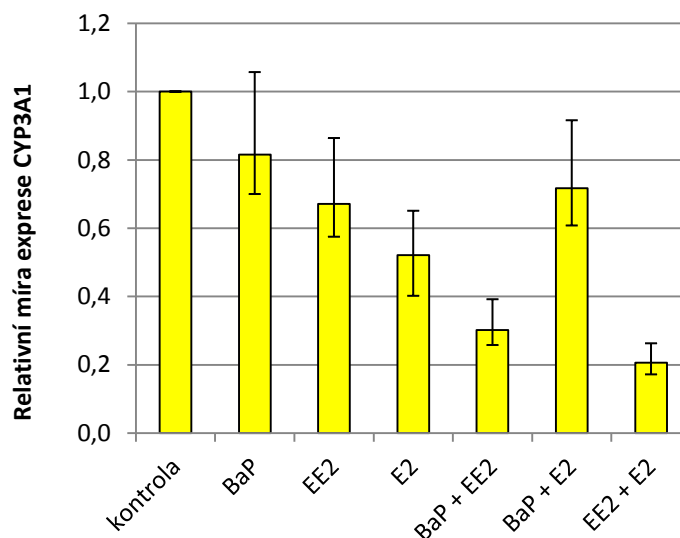
Obrázek 19 Detekce CYP1B1 na proteinové úrovni v mikrosomální frakci ledvin potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi. Pro porovnání byl detekován také konstantně exprimovaný protein GAPDH

5.4 Studium vlivu BaP, EE2, E2 a jejich kombinací na míru exprese CYP3A1 a CYP3A2 u potkana *in vivo*

Podobně jako v případě CYP1B1 byla v roztocích izolované RNA z jater, ledvin a plic potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem, ethinylestradiolem, estradiolem a jejich kombinacemi sledována relativní míra genové a proteinové exprese CYP3A1 a CYP3A2. Pro vizualizaci cytochromů P450

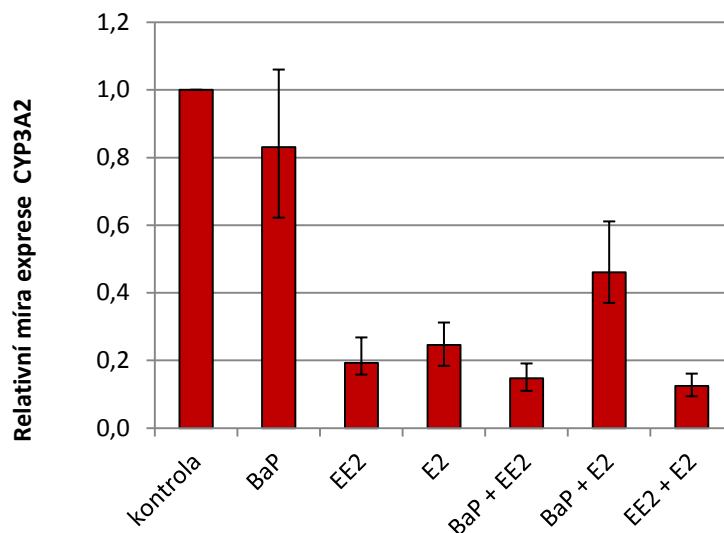
podrodiny 3A na proteinové úrovni byla použita protilátka rozpoznávající CYP3A1 i CYP3A2.

Z Obr. 20 je patrné, že v játrech všech premedikovaných potkanů kromě potkanů premedikovaných samotným BaP došlo ke snížení relativní míry genové exprese CYP3A1 oproti kontrolní nepremedikované skupině. Tento pokles byl nejvýraznější u potkanů premedikovaných kombinacemi EE2 s BaP a EE2 s E2.



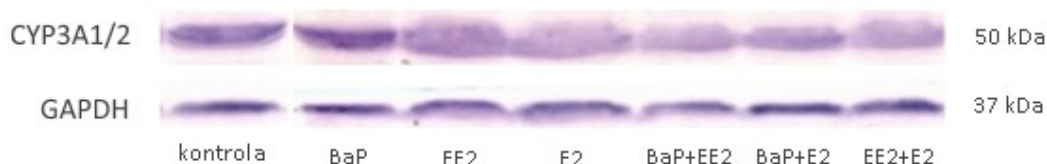
Obrázek 20 Genová exprese CYP3A1 v játrech potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi

Zároveň došlo k výraznému poklesu relativní míry genové exprese CYP3A2 oproti kontrolní skupině v játrech všech skupin premedikovaných potkanů kromě potkanů premedikovaných samotným BaP. K nejvýraznějšímu poklesu došlo v játrech potkanů premedikovaných EE2 a jeho kombinacemi (viz Obr. 21, str. 56)



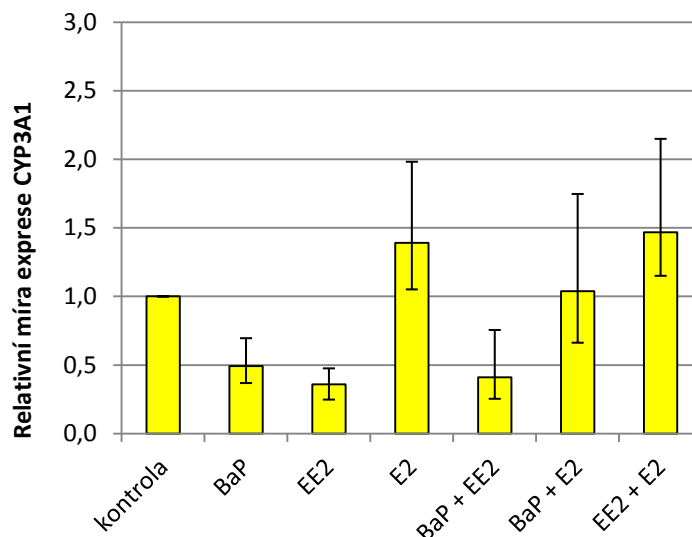
Obrázek 21 Genová exprese CYP3A2 v játrech potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi

Z Obr. 22 lze usuzovat na mírné zvýšení proteinové exprese CYP3A1/2 v mikrosomální frakci jater potkanů premedikovaných samotným BaP. V ostatních případech dochází k mírnému poklesu proteinové exprese CYP3A1/2 ve srovnání s kontrolní skupinou.



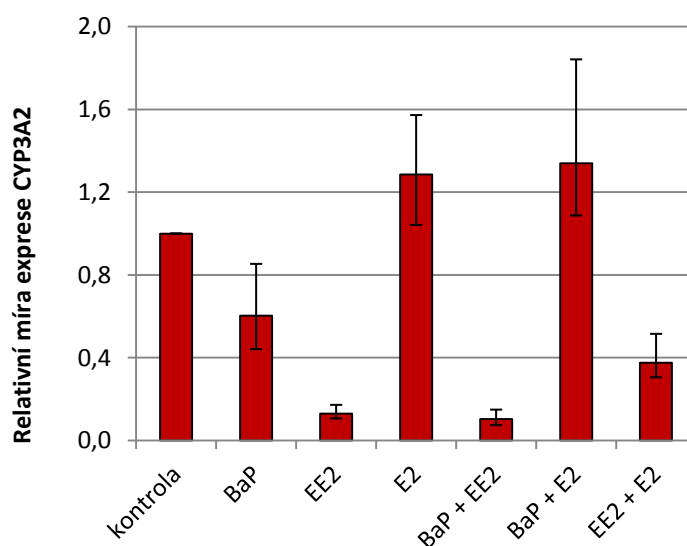
Obrázek 22 Detekce CYP3A1/2 na proteinové úrovni v mikrosomální frakci jater potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi. Pro porovnání byl detekován také konstantně exprimovaný protein GAPDH

Údaje uvedené na Obr. 23 (str. 57) ukazují, že došlo k mírnému zvýšení relativní míry genové exprese CYP3A1 v ledvinách potkanů premedikovaných estradiolem nebo jeho kombinacemi ve srovnání s kontrolní skupinou. U potkanů premedikovaných BaP, EE2 a jejich kombinací došlo naopak k poklesu genové exprese CYP3A1.



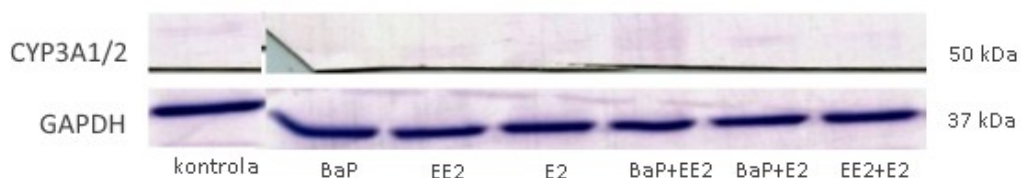
Obrázek 23 Genová exprese CYP3A1 v ledvinách potkanů premedikovaných nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi

V případě genové exprese CYP3A2 došlo k jejímu mírnému zvýšení v ledvinách potkanů premedikovaných estradiolem a jeho kombinací s BaP. V tkáni ledvin potkanů premedikovaných ethinylestradiolem a jeho kombinacemi s benzo(a)pyrenem a estradiolem, došlo naopak k výraznému snížení relativní míry genové exprese této isoformy cytochromu P450 (viz Obr. 24)



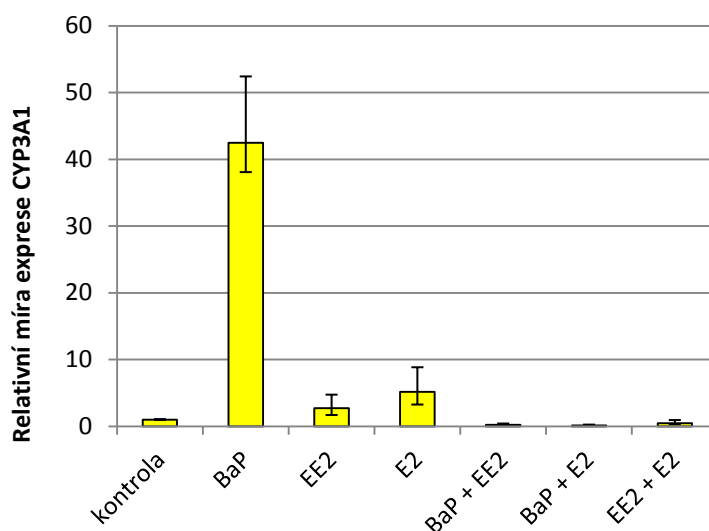
Obrázek 24 Genová exprese CYP3A2 v ledvinách potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi

V mikrosomální frakci ledvin potkanů nepremedikovaných a premedikovaných BaP, EE2, E2 a jejich kombinacemi byla vizualizována přítomnost proteinu CYP3A1/2. Zda došlo ke snížení nebo zvýšení proteinové exprese CYP3A1/2 nebylo možné posoudit (viz Obr. 25).



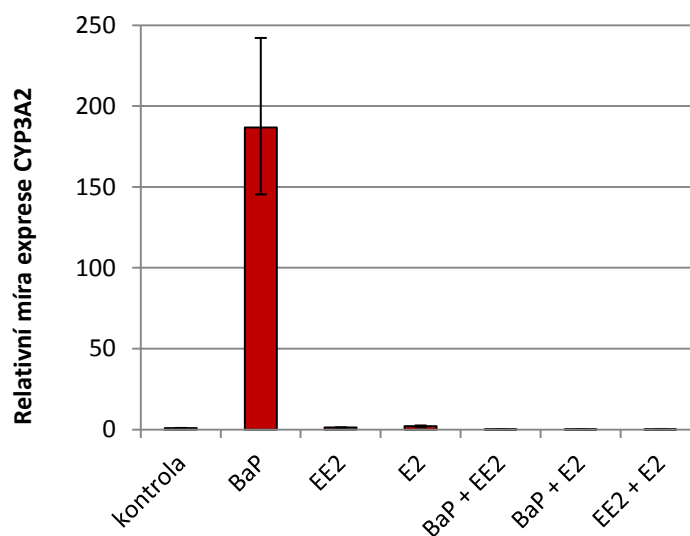
Obrázek 25 Detekce CYP3A1/2 na proteinové úrovni v mikrosomální frakci ledvin potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi. Pro porovnání byl detekován také konstantně exprimovaný protein GAPDH

Jak je patrné z Obr. 26, v plicích potkanů premedikovaných samotným benzo(a)pyrenem došlo k výraznému zvýšení relativní míry genové exprese CYP3A1 oproti kontrolní skupině. K mírnému zvýšení relativní míry genové exprese CYP3A1 došlo také v plicní tkáni potkanů premedikovaných samotným EE2 a samotným E2. Naproti tomu v plicích potkanů premedikovaných kombinacemi látek BaP s EE2, BaP s E2 a EE2 s E2 došlo k jejímu snížení (viz Obr. 26).



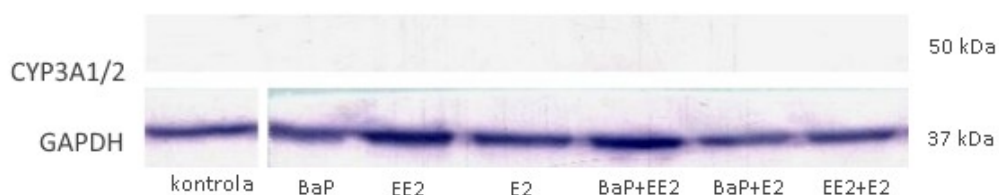
Obrázek 26 Genová exprese CYP3A1 v plicích potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi

Podobná situace nastala také v případě genové exprese CYP3A2, kde v plicní tkáni potkanů premedikovaných samotným BaP také došlo k výraznému zvýšení. Naopak u potkanů premedikovaných kombinacemi BaP s EE2, BaP s E2 a také EE2 s E2 došlo k výraznému poklesu exprese CYP3A2 (viz Obr. 27).



Obrázek 27 Genová exprese CYP3A2 v plicích potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi

Jak je patrné z Obr. 28, v mikrosomální frakci plic potkanů nebylo možné vizualizovat proteiny CYP3A1/2 u žádné premedikované skupiny ani u kontrolní nepremedikované skupiny (viz Obr. 28).



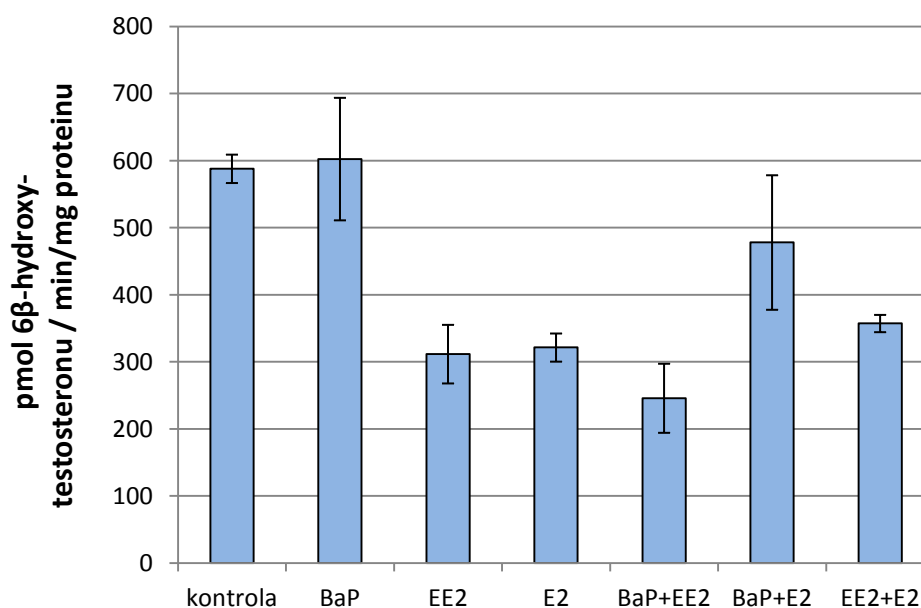
Obrázek 28 Detekce CYP3A1/2 na proteinové úrovni v mikrosomální frakci plic potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi.

Pro porovnání byl detekován také konstantně exprimovaný protein GAPDH

5.5 Stanovení specifické aktivity CYP3A: 6 β -hydroxylace testosteronu

V mikrosomální frakci jater premedikovaných potkanů a nepremedikované kontrolní skupiny byla stanovena specifická aktivita CYP3A. Jako charakteristická reakce katalyzovaná touto isoformou cytochromu P450 byla sledována 6 β -hydroxylace testosteronu (viz Obr. 29).

U potkanů premedikovaných EE2, E2 nebo kombinací BaP a EE2 došlo ke snížení rychlosti tvorby 6 β -hydroxytestosteronu v porovnání s kontrolní skupinou a potkany premedikovanými samotným BaP. K mírnému poklesu rychlosti tvorby 6 β -hydroxytestosteronu došlo také v mikrosomální frakci jater potkanů premedikovaných kombinacemi BaP a E2, nejvýraznější pokles tvorby specifického produktu byl patrný u potkanů premedikovaných kombinací BaP a EE2.



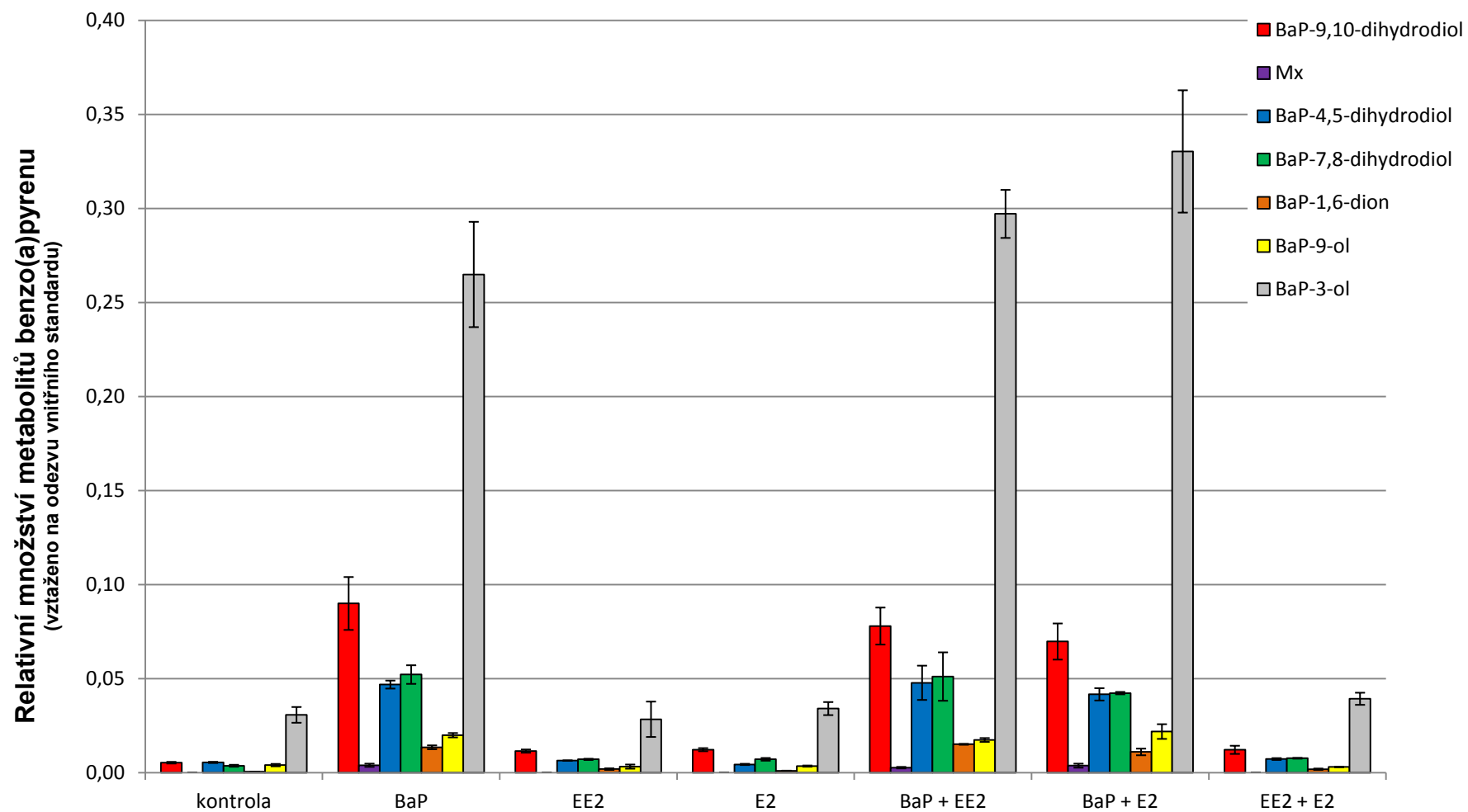
Obrázek 29 Tvorba 6 β -hydroxytestosteronu v mikrosomální frakci jater potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi

5.6 Studium metabolismu benzo(a)pyrenu v játrech potkanů premedikovaných BaP, EE2, E2 a jejich kombinacemi

V mikrosomální frakci jater potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem, ethinylestradiolem, estradiolem a jejich kombinacemi (viz kapitola 4.2.1) byl studován metabolismus benzo(a)pyrenu. Bylo sledováno množství metabolitů BaP-9,10-dihydrodiolu, BaP-4,5-dihydrodiolu, BaP-7,8-dihydrodiolu, BaP-1,6-dionu, BaP-9-olu, BaP-3-olu a také metabolitu Mx (viz Obr. 9, str. 27). Tyto metabolity byly separovány pomocí HPLC a následně kvantifikovány porovnáním s vnitřním standardem (viz kapitola 4.2.11.1).

Jak je patrné z Obr. 30 (str. 62), v mikrosomální frakci jater potkanů premedikovaných samotným benzo(a)pyrenem nebo jeho kombinacemi s ethinylestradiolem nebo estradiolem došlo k výraznému zvýšení rychlosti tvorby metabolitů BaP oproti kontrolní skupině. U potkanů premedikovaných ethinylestradiolem, estradiolem, jejich kombinací a také ve vzorcích kontrolní skupiny byla rychlost vzniku metabolitů BaP výrazně nižší.

U všech premedikačních skupin byl BaP metabolizován v nejvyšší míře na detoxikační metabolit benzo(a)pyrenu BaP-3-ol a poté na BaP-9,10-dihydrodiol. Naopak na metabolit Mx byl BaP přeměňován pouze v mikrosomální frakci jater potkanů premedikovaných BaP a jeho kombinacemi.



Obrázek 30 Vznik metabolitů benzo(a)pyrenu v mikrosomální frakci jater potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo(a)pyrenem (BaP), ethinylestradiolem (EE2), estradiolem (E2) a jejich kombinacemi

6 Diskuze

Endokrinní disruptory jsou látky schopné interferovat s přirozenými procesy tvorby, signalizace a metabolismu endogenních hormonů. Organismy jsou z okolního prostředí obvykle vystaveny více než jednomu endokrinnímu disruptoru [30] a proto je potřeba studovat nejen jednotlivé EDC a jejich vliv na živé organismy, ale také výsledný efekt vyvolaný kombinací více sloučenin.

Tato práce je zaměřena na vliv a interakci endokrinních disruptorů benzo(a)pyrenu (BaP) a 17 α -ethinylestradiolu (EE2), tedy dvou sloučenin exogenního původu hojně se vyskytujících v životním prostředí. Mezi endokrinní disruptory však nepatří pouze sloučeniny cizorodé. Také látky endogenního původu jsou schopné nežádoucím způsobem ovlivňovat endokrinní systém organismů [79] a proto byl v této práci sledován také vliv 17 β -estradiolu jako rozšířeného endogenního endokrinního disruptoru.

Benzo(a)pyren je polycyklická aromatická sloučenina dobře známá svou schopností indukovat genovou expresi cytochromů P450 rodiny 1 interakcí s jaderným aryluhlovodíkovým receptorem (AhR) [40, 80, 81]. V této studii bylo sledováno významné zvýšení exprese CYP1B1 u potkanů premedikovaných BaP a jeho kombinacemi s EE2 a E2 v játrech a plicích. Ačkoli játra nejsou cílovým orgánem metabolismu BaP, byly již dříve zaznamenány případy, kdy podávání polycyklických aromatických uhlovodíků vedlo ke zvýšení genové exprese CYP rodiny 1 (konkrétně CYP1A1 a CYP1B1) ve větší míře v játrech než v plicích [82], jak tomu bylo i v této práci. Také v ledvinách potkanů premedikovaných BaP a jeho kombinacemi došlo k mírnému zvýšení genové exprese CYP1B1.

Vliv estradiolu a ethinylestradiolu na expresi CYP1B1 je komplikovanější záležitostí. Mnohé zdroje napovídají, že estradiol zvyšuje genovou expresi CYP1B1 ovlivňováním estrogenového receptoru a tento jev byl také pozorován v několika (především hormonálně kontrolovaných) tkáních, jako je děloha, vaječníky, mléčná žláza nebo buněčná linie karcinom prsu [18, 83]. V rámci této práce však bylo pozorováno mírné zvýšení genové exprese CYP1B1 vlivem estradiolu pouze v tkáni plic, zatímco v játrech a ledvinách potkanů premedikovaných estradiolem došlo k mírnému poklesu genové exprese této isoformy. Vliv estradiolu

na expresi CYP1B1 je pravděpodobně tkáňově specifický, neboť byl popsán případ, ve kterém došlo ke snížení genové exprese CYP1B1 v testikulárních Leydigových buňkách po premedikaci estradiol benzoátem [84]. Zároveň bylo prokázáno, že estradiol je schopen zvyšovat indukční efekt BaP na CYP1B1 pomocí AhR [85], což potvrzuje teorii o komunikaci mezi signálními drahami AhR a ER [84]. Také výsledky této práce ukazují, že v játrech a plicích potkanů premedikovaných kombinací BaP a E2 dochází ke zvýšení exprese CYP1B1 v porovnání s potkany premedikovanými samotným BaP. Tento jev by potenciálně mohl ovlivňovat genotoxické působení BaP.

V případě ethinylestradiolu nebylo nalezeno mnoho studií zabývajících se jeho vlivem na expresi CYP1B1. V rámci této práce se vliv EE2 na expresi CYP1B1 přibližně shodoval s efektem vyvolaným samotným estradiolem. Pouze v jaterní tkáni došlo k významnému poklesu genové exprese CYP1B1 u potkanů premedikovaných BaP spolu s EE2 ve srovnání s potkany premedikovanými samotným BaP.

Výsledky studia metabolismu benzo(a)pyrenu v jaterních mikrosomech potkanů premedikovaných vybranými EDC vykazují obdobný trend jako změny genové exprese CYP1B1 v této tkáni. To je v souladu s již dříve publikovanými výsledky [47] ze kterých je zřejmé, že se CYP1B1 nejen podílí na metabolismu BaP, ale že tato sloučenina CYP1B1 také indukuje. Je proto logické, že v mikrosomální frakci jater potkanů premedikovaných BaP došlo k tvorbě zvýšeného množství metabolitů v porovnání s kontrolní nepremedikovanou skupinou. Na metabolismu BaP v játrech se však podílí větší množství isoforem CYP (mimo jiné CYP1A1, CYP1A2 a podle některých studií také CYP3A) [86], pro úplnost je tedy potřeba získaná data propojit s výsledky studia genové a proteinové exprese zbývajících zúčastněných enzymů.

Protein CYP1B1 byl detekovatelný pouze v mikrosomální frakci jater a ledvin potkanů nepremedikovaných a premedikovaných vybranými endokrinními disruptory. V játrech potkanů premedikovaných BaP a jeho kombinacemi s EE2 a E2 bylo patrné zvýšení proteinové exprese CYP1B1, což je v souladu s výsledky získanými při studiu genové exprese. V mikrosomální frakci plic nebylo možné pomocí specifických protilátek daný protein detekovat. Důvodem může být nízká

koncentrace cytochromů P450 v tkáni plic, tomu odpovídá také fakt, že v mikrosomální frakci plic nebylo možné obsah CYP spektrofotometricky stanovit.

Na rozdíl od CYP1B1, jehož exprese je regulována především pomocí aryluhlovodíkového receptoru, je genová exprese cytochromů P450 podrodiny 3A regulována pomocí konstitutivního androstanového receptoru (CAR) a pregnanového receptoru X (PXR) [87].

Je známo, že jak estradiol [88] tak ethinylestradiol [89] jsou schopné inhibovat aktivitu CYP3A. Například podávání hormonální antikoncepce obsahující ethinylestradiol a levonorgestrel výrazně snižuje aktivitu CYP3A v organismech uživatelů [90]. Některá xenobiotika jsou schopná zároveň inhibovat expresi i aktivitu enzymů podrodiny CYP3A, přičemž jako zprostředkovatel efektu cizorodých estrogenů na genovou expresi CYP3A byl označen právě pregnanový receptor X [91].

Těmito informacím odpovídají výsledky získané studiem specifické aktivity CYP3A v mikrosomální frakci jater potkanů premedikovaných BaP, E2, EE2 a jejich kombinacemi. Specifická aktivita CYP3A u potkanů premedikovaných EE2, E2 a jejich kombinací byla přibližně o polovinu nižší než specifická aktivita CYP3A kontrolní skupiny. Nejnižší specifickou aktivitu CYP3A vykazovala mikrosomální frakce potkanů premedikovaných kombinací EE2 a BaP. Také genová a proteinová exprese CYP3A1 a CYP3A2 v játrech potkanů premedikovaných těmito látkami vykazovaly pokles v porovnání s kontrolní skupinou.

Výsledky studií týkajících se vlivu estradiolu na expresi enzymů podrodiny CYP3A v dalších orgánech jako jsou ledviny a plíce však nejsou jednoznačné. Studie zabývající se vlivem endokrinních disruptorů na buněčnou linii ledvin primátů (COS-7) naznačuje, že E2 způsobuje zvýšení genové exprese CYP3A1 [92], a také u samců tresky obecné způsobila premedikace estradiolem zvýšenou proteinovou expresi CYP3A [88]. Jiné zdroje naopak popisují snížení exprese CYP3A1 po parenterálním podání estradiolu u pstruha duhového [91] a také v játrech samic potkanů premedikovaných estradiolem. V posledním případě byla zároveň zdokumentována snížená exprese hepatických jaderných receptorů CAR a PXR a dokonce snížená exprese cytochrom P450 oxidoreduktasy. Tyto výsledky naznačují, že by se zmíněné proteiny mohly podílet na regulaci exprese CYP3A vlivem E2 [93]. V rámci této práce měla sledovaná genová exprese CYP3A1 a 3A2 v ledvinách

obdobný průběh jako ve vzorcích jater. Pouze v ledvinách potkanů premedikovaných estradiolem a E2 spolu s BaP došlo ke zvýšení exprese CYP3A1 i CYP3A2.

V plicích došlo k výraznému zvýšení exprese CYP3A1 i CYP3A2 u potkanů premedikovaných BaP. K tomuto zvýšení došlo však pouze u skupin premedikovaných samotným BaP a ne jeho kombinacemi. V plicích potkanů premedikovaných samotným EE2 nebo E2 byla exprese CYP3A1 a CYP3A2 oproti kontrolní skupině také lehce zvýšená, zatímco u potkanů premedikovaných kombinacemi EE2 s E2, BaP s EE2 a BaP s E2 byla exprese těchto isoformů výrazně snížena. Příčiny vedoucí k těmto výsledkům musí být ještě objasněny. Jsou sice známy případy zvýšení exprese CYP3A4 vlivem benzo(a)pyrenu zprostředkované pregnanovým receptorem X [86], není však jasné, proč k indukci exprese CYP3A v plicích nedošlo také v případě podání BaP spolu s EE2 nebo E2.

Změny exprese CYP1B, 3A1 a 3A2 způsobené studovanými endokrinními disruptory mohou ovlivňovat metabolismus těchto látek a tím také modulovat jejich schopnost genotoxicky působit na organismus (tvořit adukty s DNA). Všechny tyto interakce se tak mohou promítnout do způsobu, jakým tyto látky působí na životní prostředí a na všechny živé organismy včetně člověka.

7 Závěr

V předkládané diplomové práci byl studován vliv endokrinních disruptorů 17 β -estradiolu, 17 α -ethinylestradiolu, benzo(a)pyrenu a jejich kombinací na expresi vybraných isoform cytochromů P450 u potkanů *in vivo*.

Byl stanoven specifický obsah cytochromů P450 v mikrosomální frakci jater a ledvin potkanů premedikovaných uvedenými endokrinními disruptory a nepremedikované kontrolní skupiny. Metodou Western blot spojenou s použitím specifických protilátek byla sledována míra proteinové exprese CYP1B1 a CYP3A1/2 v mikrosomální frakci jater, ledvin a plic. Byla izolována mRNA z tkání potkanů a sledována míra genové exprese CYP1B1, CYP3A1 a CYP3A2 v játrech, ledvinách a plicích pomocí kvantitativní PCR. V mikrosomální frakci jater byl navíc studován metabolismus benzo(a)pyrenu a také stanovena specifická aktivita CYP3A (sledována 6 β -hydroxylace testosteronu).

Výsledky prezentované v této diplomové práci lze shrnout následovně:

- premedikace potkanů benzo(a)pyrenem způsobuje zvýšení genové exprese CYP1B1 v játrech, ledvinách i v plicích, kombinované podání BaP s E2 tento efekt v játrech a v plicích umocňuje, naopak podáním BaP spolu s EE2 dochází k výraznému snížení indukce CYP1B1 v játrech ve srovnání s podáním samotného benzo(a)pyrenu
- premedikace potkanů ethinylestradiolem a estradiolem způsobuje snížení genové exprese CYP1B1 v játrech a v ledvinách a mírné zvýšení genové exprese této isoformy v plicích, efekt estrogenů na expresi CYP1B1 je pravděpodobně tkáňově specifický
- premedikace potkanů BaP a jeho kombinací s EE2 a E2 zvyšuje tvorbu BaP-3-olu, BaP-9,10-diolu, BaP-7,8-diolu i dalších metabolitů

- premedikace potkanů ethinylestradiolem, estradiolem, jejich společnou kombinací i kombinací s BaP vede ke snížení genové exprese CYP3A1 i CYP3A2 v játrech a zároveň snižuje specifickou aktivitu CYP3A v mikrosomální frakci jater
- v ledvinách laboratorních potkanů způsobuje premedikace BaP, EE2 a jejich kombinacemi snížení genové exprese CYP3A1 a CYP3A2, podávání E2 a kombinace E2 s BaP expresi těchto isoform v ledvinách naopak mírně zvyšuje
- premedikace potkanů BaP výrazně zvyšuje genovou expresi CYP3A1 a CYP3A2 v plicích potkanů, mírné zvýšení exprese těchto isoform bylo sledováno také po podání ethinylestradiolu a estradiolu, kombinace těchto zmíněných sloučenin však vedly naopak k výraznému snížení genové exprese obou isoform, příčina tohoto jevu musí být ještě objasněna

8 Seznam literatury

- [1] Mendes, JJ Amaral. "The endocrine disrupters: a major medical challenge." *Food and Chemical Toxicology* 40.6 (2002): 781-788.
- [2] E. Diamanti-Kandarakis *et al.*, "Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement," *Endocr. Rev.*, vol. 30, no. 4, pp. 293–342, Jun. 2009.
- [3] "Endocrine Disruptors." [Online]. Available: <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/>. [Accessed: 23-Mar-2017].
- [4] A. C. Gore and D. Crews, "Environmental Endocrine Disruption of Brain and Behavior," in *Hormones, Brain and Behavior*, Elsevier, 2009, pp. 1789–1818.
- [5] S. M. Dickerson and A. C. Gore, "Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle," *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, vol. 8, no. 2, pp. 143–159, 2007.
- [6] J. Massé, T. Watrin, A. Laurent, S. Deschamps, D. Guerrier, and I. Pellerin, "The developing female genital tract: from genetics to epigenetics. The developing female genital tract: from genetics to epigenetics," *Int J Dev Biol*, vol. 53, no. 3, pp. 411–24, 2009.
- [7] F. J. Cisneros, "DNA methylation and male infertility.," *Front. Biosci.*, vol. 9, pp. 1189–200, May 2004.
- [8] D. M. Sheehan, E. Willingham, D. Gaylor, J. M. Bergeron, and D. Crews, "No threshold dose for estradiol-induced sex reversal of turtle embryos: how little is too much?," *Environ. Health Perspect.*, vol. 107, no. 2, pp. 155–9, Feb. 1999.
- [9] "What is Estrogen?" [Online]. Available: <http://www.news-medical.net/health/What-is-Estrogen.aspx>. [Accessed: 18-May-2017].
- [10] Combalbert, Sarah, and Guillermina Hernandez-Raquet. "Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure." *Applied microbiology and biotechnology* 86.6 (2010): 1671-1692.
- [11] A. Z. Aris, A. S. Shamsuddin, and S. M. Praveena, "Occurrence of 17 β -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: A review," *Environ. Int.*, vol. 69, no. January, pp. 104–119, 2014.

- [12] "screen-shot-2014-10-02-at-6-22-53-pm.png (676×249)." [Online]. Available: <https://stuartshepherd1.files.wordpress.com/2014/10/screen-shot-2014-10-02-at-6-22-53-pm.png?w=676>. [Accessed: 17-May-2017].
- [13] "008E1E2E3_576.jpg (576×394)." [Online]. Available: http://alaskadigitalvisions.com/femalehormones/ImagesGeneral/008E1E2E3_576.jpg. [Accessed: 17-May-2017].
- [14] Rodgers-Gray, Trevor P., et al. "Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development." *Environmental science & technology* 35.3: 462-470, 2001.
- [15] V. N. Kristensen and A. L. Børresen-Dale, "Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism," *Mutat. Res. Mutat. Res.*, vol. 462, no. 2, pp. 323–333, 2000.
- [16] A. J. Lee, J. W. Kosh, A. H. Conney, and B. T. Zhu, "Characterization of the NADPH-Dependent Metabolism of 17 β -Estradiol to Multiple Metabolites by Human Liver Microsomes and Selectively Expressed Human Cytochrome P450 3A4 and 3A5," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 298, no. 2, 2001.
- [17] A. J. Lee, "NADPH-Dependent Metabolism of Estrone by Human Liver Microsomes," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 300, no. 3, pp. 838–849, Mar. 2002.
- [18] Tsuchiya, Yuki, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. "Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human." *Cancer letters* 227.2 (2005): 115-124.
- [19] J. Weisz, Q. D. Bui, D. Roy, and J. G. Liehr, "Elevated 4-hydroxylation of estradiol by hamster kidney microsomes: a potential pathway of metabolic activation of estrogens.," *Endocrinology*, vol. 131, no. 2, pp. 655–661, Aug. 1992.
- [20] A. J. Lee, M. X. Cai, P. E. Thomas, A. H. Conney, and B. T. Zhu, "Characterization of the Oxidative Metabolites of 17 β -Estradiol and Estrone Formed by 15 Selectively Expressed Human Cytochrome P450 Isoforms," *Endocrinology*, vol. 144, no. 8, pp. 3382–3398, Aug. 2003.
- [21] F. P. Guengerich, "Oxidation of 17 α -ethynylestradiol by human liver cytochrome P-450.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 33, no. 5, 1988.
- [22] T. AOYAMA, K. KORZEKWA, K. NAGATA, J. GILLETTE, H. V. GELBOIN, and F. J.

- GONZALEZ, "Estradiol Metabolism by Complementary Deoxyribonucleic Acid-Expressed Human Cytochrome P450s," *Endocrinology*, vol. 126, no. 6, pp. 3101–3106, Jun. 1990.
- [23] M. Shou, K. R Korzekwa, E. N Brooks, K. W Krausz, and F. J Gonzalez, "Role of human hepatic cytochrome P450 1A2 and 3A4 in the metabolic activation of estrone mediated growth and proliferation derived from the hormone's," *Carcinogenesis*, vol. 18, no. 1, pp. 207–214, 1997.
- [24] J. G. Liehr, M. J. Ricci, C. R. Jefcoatet, E. V Hannigan, J. A. Hokansons, and B. T. Zhu, "4-Hydroxylation of estradiol by human uterine myometrium and myoma microsomes: Implications for the mechanism of uterine tumorigenesis (2-hydroxyestradiol/4-hydroxyestradiol/estrogen metabolism/cytochrome P450/uterine myoma)," *Med. Sci.*, vol. 92, pp. 9220–9224, 1995.
- [25] J. G. Liehr and M. J. Ricci, "4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors (estrogen metabolism/catecholestrone formation/2-hydroxyestradiol/4-hydroxyestradiol/human breast tumors)," *Med. Sci.*, vol. 93, pp. 3294–3296, 1996.
- [26] P. BALL and R. KNUPPEN, "Formation of 2- and 4-Hydroxyestrogens by Brain, Pituitary, and Liver of the Human Fetus*," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 47, no. 4, pp. 732–737, Oct. 1978.
- [27] C. L. Hayes, D. C. Spinkt, B. C. Spinkt, J. Q. Caot, N. J. Walker, and T. R. Sutter, "7f8-Estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 IBI," *Med. Sci.*, vol. 93, pp. 9776–9781, 1996.
- [28] Z. Heger, R. Guran, O. Zitka, M. Beklova, V. Adam, and R. Kizek, "In Vitro Interactions between 17 β -Estradiol and DNA Result in Formation of the Hormone-DNA Complexes," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 11, no. 8, pp. 7725–7739, Jul. 2014.
- [29] J.-P. Cravedi, D. Zalko, J.-F. Savouret, A. Menuet, and B. Jégou, "[The concept of endocrine disruption and human health].," *Med. Sci. (Paris)*, vol. 23, no. 2, pp. 198–204, Feb. 2007.
- [30] E. K. Shanle and W. Xu, "Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action," *Chem Res Toxicol. Chem Res Toxicol January*, vol. 14, no. 241, pp. 6–19, 2011.

- [31] G. G. J. M. Kuiper *et al.*, "Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β ," *Endocrinology*, vol. 138, no. 3, pp. 863–870, Mar. 1997.
- [32] S. S. and M. Wormke, "Inhibitory Aryl Hydrocarbon Receptor–Estrogen Receptor α Cross-Talk and Mechanisms of Action," 2003.
- [33] T. V. Beischlag, J. L. Morales, B. D. Hollingshead, and G. H. Perdew, "The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex and the Control of Gene Expression," *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, vol. 18, no. 3, pp. 207–250, 2008.
- [34] L. P. Nguyen and C. A. Bradfield, "The Search for Endogenous Activators of the Aryl Hydrocarbon Receptor," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 21, no. 1, pp. 102–116, Jan. 2008.
- [35] "No Title." [Online]. Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ethinyl_estradiol#section=Top. [Accessed: 25-May-2017].
- [36] N. Penner, Penner, and Natasha, "Ethinylestradiol," in *Handbook of Metabolic Pathways of Xenobiotics*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013, pp. 1–3.
- [37] B. Wang, R. I. Sanchez, R. B. Franklin, D. C. Evans, and S.-E. W. Huskey, "THE INVOLVEMENT OF CYP3A4 AND CYP2C9 IN THE METABOLISM OF 17 α -ETHINYLESTRADIOL," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 32, no. 11, 2004.
- [38] L. Bořek-Dohalská, P. Valášková, V. Černá, and M. Stiborová, "Role of rat cytochromes P450 in the oxidation of 17 α -ethinylestradiol," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 38, no. 3, pp. 852–860, Nov. 2014.
- [39] M. Moserová, V. Kotrbová, D. Aimová, M. Šulc, E. Frei, and M. Stiborová, "Analysis of benzo[a]pyrene metabolites formed by rat hepatic microsomes using high pressure liquid chromatography: optimization of the method," *Interdiscip. Toxicol.*, vol. 2, no. 4, pp. 239–244, 2009.
- [40] J. A. Harrigan, B. P. McGarrigle, T. R. Sutter, and J. R. Olson, "Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene," *Toxicol. Vitro.*, vol. 20, no. 4, pp. 426–438, Jun. 2006.
- [41] J. H. Kim, K. H. Stansbury, N. J. Walker, M. A. Trush, P. T. Strickland, and T. R. Sutter, "Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human

- cytochrome P450 1B1," *Carcinogenesis*, vol. 19, no. 10, pp. 1847–1853, 1998.
- [42] N. Trushin *et al.*, "Comparative metabolism of benzo[a]pyrene by human keratinocytes infected with high-risk human papillomavirus types 16 and 18 as episomal or integrated genomes.," *J. Carcinog.*, vol. 11, no. 1, p. 1, 2012.
- [43] H. Uppstad, S. Øvrebø, A. Haugen, and S. Mollerup, "Importance of CYP1A1 and CYP1B1 in bioactivation of benzo[a]pyrene in human lung cell lines," *Toxicol. Lett.*, vol. 192, no. 2, pp. 221–228, 2010.
- [44] S. Halappanavar *et al.*, "Pulmonary gene and microRNA expression changes in mice exposed to benzo(a)pyrene by oral gavage," *Toxicology*, vol. 285, no. 3, pp. 133–141, 2011.
- [45] D. A. Reeves *et al.*, "Resistance of bulky DNA lesions to nucleotide excision repair can result from extensive aromatic lesion-base stacking interactions.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 20, pp. 8752–64, Nov. 2011.
- [46] M. Kodíček and V. Karpenko, *Biofyzikální chemie*. Praha: ACADEMIA, 2013.
- [47] M. Stiborova, P. Hodek, E. Frei, H. H. Schmeiser, and V. M. Arlt, "NADPH- and NADH-dependent metabolism of and DNA adduct formation by benzo [a] pyrene catalyzed with rat hepatic microsomes and cytochrome P450 1A1," vol. 450, pp. 847–855, 2016.
- [48] R. Indra *et al.*, "Cytochrome b 5 and epoxide hydrolase contribute to benzo [a] pyrene-DNA adduct formation catalyzed by cytochrome P450 1A1 under low NADPH : P450 oxidoreductase conditions," vol. 318, pp. 1–12, 2014.
- [49] S. Halappanavar *et al.*, "Pulmonary gene and microRNA expression changes in mice exposed to benzo(a)pyrene by oral gavage," *Toxicology*, vol. 285, no. 3, pp. 133–141, 2011.
- [50] R. Indra, M. Moserova, M. Sulc, E. Frei, and M. Stiborova, "Oxidation of carcinogenic benzo[a]pyrene by human and rat cytochrome P450 1A1 and its influencing by cytochrome b5 - a comparative study.," *Neuro Endocrinol. Lett.*, vol. 34, pp. 55–63, 2013.
- [51] Y. Guéguen *et al.*, "[Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance].," *Ann. Biol. Clin. (Paris)*., vol. 64, no. 6, pp. 535–48, 2006.
- [52] "Gallery_1A1_med.png (765×601)." [Online]. Available: http://scottlab.info/wp-content/uploads/Gallery_1A1_med.png. [Accessed: 18-

May-2017].

- [53] D. Mansuy and J.-P. Renaud, "Heme-Thiolate Proteins Different from Cytochromes P450 Catalyzing Monooxygenations," in *Cytochrome P450*, Boston, MA: Springer US, 1995, pp. 537–574.
- [54] M. Stiborová, J. Hudeček, P. Hodek, and E. Frei, "Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví," *Chem. List.*, vol. 93, pp. 229–237, 1999.
- [55] "cyp450-color-pic-8f7e0.png (667×252)." [Online]. Available: <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/graphics/cyp450-color-pic-8f7e0.png>. [Accessed: 18-May-2017].
- [56] Y.-Y. Zhang and L. Yang, "Interactions between human cytochrome P450 enzymes and steroids: physiological and pharmacological implications," *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 5, no. 6, pp. 621–629, Jun. 2009.
- [57] T. Shimada, E. M. Gillam, T. R. Sutter, P. T. Strickland, F. P. Guengerich, and H. Yamazaki, "Oxidation of xenobiotics by recombinant human cytochrome P450 1B1," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 25, no. 5, pp. 617–22, May 1997.
- [58] G. I. Murray *et al.*, "Tumor-specific Expression of Cytochrome P450 CYP1B1," *Cancer Res.*, vol. 57, no. 14, 1997.
- [59] L. Muskhelishvili, P. A. Thompson, D. F. Kusewitt, C. Wang, and F. F. Kadlubar, "In situ hybridization and immunohistochemical analysis of cytochrome P450 1B1 expression in human normal tissues," *J Histochem.*, vol. 49, no. 0022–1554, pp. 229–236, 2001.
- [60] D.-Y. Ryu and E. Hodgson, "Constitutive expression and induction of CYP1B1 mRNA in the mouse," *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, vol. 13, no. 5, pp. 249–251, 1999.
- [61] F. Peter Guengerich, Y.-J. Chun, D. Kim, E. M. . Gillam, and T. Shimada, "Cytochrome P450 1B1: a target for inhibition in anticarcinogenesis strategies," *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 523, pp. 173–182, 2003.
- [62] J. Liu, J. Sridhar, and M. Foroozesh, "Cytochrome P450 family 1 inhibitors and structure-activity relationships," *Molecules*, vol. 18, no. 12, pp. 14470–14495, 2013.
- [63] J. Lu *et al.*, "CRISPR knockout rat cytochrome P450 3A1/2 model for advancing drug metabolism and pharmacokinetics research," *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 42922, Feb. 2017.

- [64] "[J]Carcinog_2012_11_1_1_92309_u2.jpg (1073×783)." [Online]. Available: http://www.carcinogenesis.com/articles/2012/11/1/images/JCarcinog_2012_11_1_1_92309_u2.jpg. [Accessed: 16-May-2017].
- [65] K. Debri, A. R. Boobis, D. S. Davies, and R. J. Edwards, "Distribution and induction of CYP3A1 and CYP3A2 in rat liver and extrahepatic tissues.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 50, no. 12, pp. 2047–56, Dec. 1995.
- [66] "Pierce BCA Protein Assay Kit - Thermo Fisher Scientific." [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225>. [Accessed: 16-Jun-2017].
- [67] "MEDICAL TRIBUNE CZ > Cytochrom P450, jeho vliv na metabolismus léčiv, jejich působení, interakce a nežádoucí účinky." [Online]. Available: <https://www.tribune.cz/clanek/11305-cytochrom-p-jeho-vliv-na-metabolismus-leciv-jejich-pusobeni-interakce-a-nezadouci-ucinky>. [Accessed: 16-Jun-2017].
- [68] "Introduction to SDS-PAGE." [Online]. Available: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/gellab2.html>. [Accessed: 17-Jun-2017].
- [69] B. T. Kurien and R. H. Scofield, "Western blotting," *Methods*, vol. 38, no. 4, pp. 283–293, 2006.
- [70] "1-Step NBT/BCIP Substrate Solution - Thermo Fisher Scientific." [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/34042>. [Accessed: 16-Jun-2017].
- [71] C. Welinder and L. Ekblad, "Coomassie Staining as Loading Control in Western Blot Analysis," *J. Proteome Res.*, vol. 10, no. 3, pp. 1416–1419, Mar. 2011.
- [72] "What Is RNA? - Definition and Types." [Online]. Available: <https://www.thoughtco.com/g00/rna-373565?i10c.referrer=https%3A%2F%2Fwww.google.cz%2F>. [Accessed: 17-Jun-2017].
- [73] "Addgene: Protocol - How to Run an Agarose Gel." [Online]. Available: <https://www.addgene.org/protocols/gel-electrophoresis/>. [Accessed: 17-Jun-2017].
- [74] "An Eye for a Dye | The Scientist Magazine®." [Online]. Available:

- <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/12802/title/An-Eye-for-a-Dye/>. [Accessed: 17-Jun-2017].
- [75] T. Okamoto and S. Okabe, "Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution.," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 5, no. 6, pp. 657–9, Jun. 2000.
- [76] "Quantitating RNA." [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/quantitating-rna.html>. [Accessed: 16-Jun-2017].
- [77] "Reverse Transcription (cDNA Synthesis) | NEB." [Online]. Available: <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-preparation/reverse-transcription-cdna-synthesis>. [Accessed: 16-Jun-2017].
- [78] "Quantitative PCR (qPCR) | Biocompare.com." [Online]. Available: <http://www.biocompare.com/PCR-Real-Time-PCR/7217-Real-Time-PCR/>. [Accessed: 16-Jun-2017].
- [79] Hilder, Tamsyn A., and Justin M. Hodgkiss. "Molecular Mechanism of Binding between 17 β -Estradiol and DNA." *Computational and structural biotechnology journal* 15 (2017): 91-97.
- [80] Y. Shimizu *et al.*, "Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 2, pp. 779–82, Jan. 2000.
- [81] T. Shimada *et al.*, "Activation of Chemically Diverse Procarcinogens P-450 IBI1 by Human Cytochrome," *City*, pp. 2979–2984, 1996.
- [82] T. Hussain *et al.*, "Induction of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, increased oxidative stress and inflammation in the lung and liver tissues of rats exposed to incense smoke," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 391, no. 1–2, pp. 127–136, Jun. 2014.
- [83] Y. Tsuchiya, M. Nakajima, S. Kyo, T. Kanaya, M. Inoue, and T. Yokoi, "Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor.," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 9, pp. 3119–25, May 2004.
- [84] S. Deb, J. K. Tai, G. S. Leung, T. K. H. Chang, and S. M. Bandiera, "Estradiol-mediated suppression of CYP1B1 expression in mouse MA-10 Leydig cells is independent of protein kinase A and estrogen receptor," *Mol. Cell. Biochem.*, vol.

- 358, no. 1–2, pp. 387–395, 2011.
- [85] D. C. Spink, B. H. Katz, M. M. Hussain, B. T. Pentecost, Z. Cao, and B. C. Spink, "Estrogen regulates Ah responsiveness in MCF-7 breast cancer cells," *Carcinogenesis*, vol. 24, no. 12, pp. 1941–1950, Aug. 2003.
- [86] C. Luckert, A. Ehlers, T. Buhrke, A. Seidel, A. Lampen, and S. Hessel, "Polycyclic aromatic hydrocarbons stimulate human CYP3A4 promoter activity via PXR," *Toxicol. Lett.*, vol. 222, no. 2, pp. 180–188, Oct. 2013.
- [87] S. Anakk *et al.*, "CAR/PXR provide directives for Cyp3a41 gene regulation differently from Cyp3a11," *Pharmacogenomics J.*, vol. 4, pp. 91–101, 2004.
- [88] L. Hasselberg, S. Meier, A. Svardal, T. Hegelund, and M. C. Celander, "Effects of alkylphenols on CYP1A and CYP3A expression in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*)," *Aquat. Toxicol.*, vol. 67, no. 4, pp. 303–313, May 2004.
- [89] L. Bořek-Dohalská, P. Valášková, V. Černá, and M. Stiborová, "Role of rat cytochromes P450 in the oxidation of 17 α -ethinylestradiol," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 38, no. 3, pp. 852–860, 2014.
- [90] H. Shibasaki *et al.*, "Use of endogenous cortisol 6 β -hydroxylation clearance for phenotyping in vivo CYP3A activity in women after sequential administration of an oral contraceptive (OC) containing ethinylestradiol and levonorgestrel as weak CYP3A inhibitors," *Steroids*, vol. 87, pp. 137–144, 2014.
- [91] S. Kashiwada *et al.*, "Estrogenic modulation of CYP3A38, CYP3A40, and CYP19 in mature male medaka (*Oryzias latipes*)," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 145, no. 3, pp. 370–378, Apr. 2007.
- [92] Masuyama, H., Hiramatsu, Y., Kunitomi, M., Kudo, T., & MacDonald, P. N., "Endocrine disrupting chemicals, phthalic acid and nonylphenol, activate pregnane X receptor-mediated transcription". *Molecular Endocrinology*, 14(3), 421-428, 2000.
- [93] S.-Y. Choi, L. Fischer, K. Yang, H. Chung, and H. Jeong, "Isoform-specific regulation of cytochrome P450 expression and activity by estradiol in female rats," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 81, no. 6, pp. 777–782, 2011.

