

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

DIZERTAČNÍ PRÁCE

STUDIUM ÚLOHY BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ
V CHEMICKÉ KARCINOGENEZI

Mgr. Eliška Kondrová

2008

Děkuji především školiteli RNDr. Pavlu Součkovi, CSc. za odborné vedení a cenné rady při zpracování dizertační práce a dále celému kolektivu OS pro biotransformace ve Státním zdravotním ústavu v Praze za vytvoření přátelského a podnětného prostředí pro práci. Děkuji také pracovníkům Ústavu anorganické chemie AV ČR v Řeži, Ing. Pavlu Stopkovi, CSc. a Mgr. Janě Křížové, za vstřícnost a čas věnovaný měření ESR.

Tato práce byla finančně podpořena granty IGA 6095-3 a NL/7567-3, GAČR 203/02/1152 a 203/01/0944 a COST OC119.

Prohlašuji, že předkládanou práci jsem vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Pavla Součka, CSc.

V Praze dne 2.4.2008
Mgr. Eliška Kondrová

OBSAH

Seznam použitých zkratk	1
1. TEORETICKÝ ÚVOD	2
1.1 Biotransformace a biotransformační enzymy	3
1.1.1 Xenobiotika a jejich osud v organismu	3
1.1.2 Mikrosomální monooxygenázový systém	4
1.1.2.1 Cytochromy P450	4
1.1.2.2 NADPH:cytochrom P450 reduktáza	7
1.2 Metody studia biotransformace	9
1.2.1 In vitro systémy pro studium biotransformace	9
1.2.1.1 Purifikované enzymy a rekonstituované systémy	9
1.2.1.2 Membránové frakce obsahující lidské rekombinantní enzymy	10
1.2.1.3 Jaterní mikrosomy	10
1.2.1.4 Cytosolická frakce	11
1.2.1.5 S9 frakce	12
1.2.1.6 Hepatocyty	12
1.2.1.7 Jaterní buněčné linie	13
1.2.1.8 Transgenní buněčné linie	13
1.2.1.9 Jaterní řezy	14
1.2.1.10 Perfundovaná játra	14
1.2.2 Miniprasata	15
1.3 Toxicita chinonů	17
1.3.1 Reaktivní metabolity benzenu	17
1.3.2 Anthracyklinová cytostatika	19
1.4 Polyfenolické antioxidanty	21
2. CÍL PRÁCE	23
3. MATERIÁLY A METODY	25
3.1 Materiály	26
3.1.1 Chemikálie	26
3.1.2 Biologický materiál	28
3.1.3 Další materiály	28
3.1.4 Zvířata	28
3.1.5 Přístroje	29
3.1.6 Složení roztoků	30
3.2 Příprava membránových systémů obsahujících lidské rekombinantní cytochromy P450	32
3.2.1 Expres lidských cytochromů P450 v bakteriích <i>Escherichia coli</i>	32
3.2.2 Izolace bakteriálních membrán	33
3.3. Příprava jaterních mikrosomů miniprasat	35
3.4 Stanovení destrukce cytochromů P450 a CPR v bakteriálních membránových systémech	36
3.4.1 Testování stability bakteriálních membrán při inkubaci s NADPH	36
3.4.2 Stanovení destrukce P450 2C9 vlivem metabolitů benzenu	36
3.4.3 Stanovení destrukce CPR vlivem NADPH a metabolitů benzenu	37
3.5 Stanovení destrukce cytochromů P450 a vzniku oxidativního stresu vlivem působení metabolitů benzenu v jaterních mikrosomech miniprasat	38
3.5.1 Stanovení destrukce P450 vlivem působení NADPH a metabolitů benzenu v jaterních mikrosomech miniprasat	38
3.5.2 Stanovení vzájemných přeměn benzochinonu a hydrochinonu	38

3.5.3 Stanovení aktivit cytochromů P450.....	39
3.5.4 Elektroforéza a imunobloting.....	40
3.5.5 Stanovení tvorby hydroxylových radikálů pomocí elektronové spinové rezonance (ESR).....	41
3.6 Destrukce cytochromů P450 a vznik oxidativního stresu vlivem působení doxorubicinu v jaterních mikrosomech miniprasat, ovlivnění toxicity fenolickými antioxidanty.....	43
3.6.1 Stanovení destrukce P450 vlivem působení doxorubicinu v jaterních mikrosomech miniprasat.....	43
3.6.2 Stanovení aktivit a množství proteinu cytochromů P450.....	43
3.6.3 Stanovení tvorby semichinonu doxorubicinu a superoxidových radikálů pomocí ESR.....	44
3.6.4 Stanovení tvorby hydroxylových radikálů pomocí ESR.....	45
3.7 Statistické zpracování dat.....	45
4. VÝSLEDKY	46
4.1 Příprava membránových systémů obsahujících lidské rekombinantní cytochromy P450 a jaterních mikrosomů miniprasat.....	47
4.2 Stanovení destrukce cytochromů P450 v bakteriálních membránových systémech.....	48
4.2.1 Testování stability bakteriálních membrán při inkubaci s NADPH.....	48
4.2.2 Destrukce P450 2C9 vlivem metabolitů benzenu.....	51
4.2.3 Destrukce CPR vlivem metabolitů benzenu.....	51
4.3 Stanovení destrukce cytochromů P450 a vzniku oxidativního stresu vlivem působení metabolitů benzenu v jaterních mikrosomech miniprasat.....	53
4.3.1 Destrukce P450 vlivem působení NADPH a metabolitů benzenu v jaterních mikrosomech miniprasat.....	53
4.3.2 Vzájemné přeměny benzochinonu a hydrochinonu v inkubacích s jaterními mikrosomy miniprasat.....	55
4.3.3 Vliv NADPH, hydrochinonu a benzochinonu na aktivity P450 2E a 3A v jaterních mikrosomech miniprasat.....	57
4.3.4 Vliv NADPH, hydrochinonu a benzochinonu na obsah proteinu P450 2E a 3A v jaterních mikrosomech miniprasat.....	59
4.3.5 Produkce hydroxylových radikálů vlivem působení NADPH, katecholu, benzochinonu a hydrochinonu v jaterních mikrosomech miniprasat.....	59
4.4 Destrukce cytochromů P450 a vznik oxidativního stresu vlivem působení doxorubicinu v jaterních mikrosomech miniprasat, jeho ovlivnění fenolickými antioxidanty.....	64
4.4.1 Destrukce P450 vlivem působení doxorubicinu v jaterních mikrosomech miniprasat.....	64
4.4.2 Vliv doxorubicinu na aktivity a obsah proteinu P450 2E a 3A v jaterních mikrosomech miniprasat.....	65
4.4.3 Tvorba semichinonu doxorubicinu a superoxidových radikálů.....	65
4.4.4 Tvorba hydroxylových radikálů vlivem doxorubicinu v jaterních mikrosomech miniprasat.....	67
4.4.5 Vliv polyfenolických antioxidantů na tvorbu hydroxylových radikálů v systému doxorubicinu a jaterních mikrosomů miniprasat.....	68
5. DISKUZE.....	69
6. ZÁVĚRY	81
7. LITERATURA	84
8. SEZNAM PŘÍLOH.....	91

Seznam použitých zkratk

BQ	1,4-benzochinon
C	katechol
CLZ	chlorzoxazon
CPR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa (E.C. 1.6.2.4)
CYP	cytochrom P450 (E.C. 1.14.14.1)
DMPO	1,1,3,3-tetramethoxypropan, 5,5'-dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ESR	elektronová spinová rezonance
FAD	flavin adenin dinukleotid
FMN	flavin mononukleotid
HQ	1,4-hydrochinon
IgG	imunoglobulin G
IgG-HRP	kozí anti-králičí IgG navázaný na křenovou peroxidasu (goat anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase)
IPTG	isopropylthiogalaktosid
KPi	fosfátový pufr
MFO systém	systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)
NADH	β -nikotinamid adenin dinukleotid, redukovaná forma
NADP	β -nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, oxidovaná forma
NADPH	β -nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, redukovaná forma
NADPH-GS	NADPH generující systém
PMSF	fenylmetylsulfonylfluorid
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SDS	laurylsulfát sodný
SQ	semichinonový radikál
TEMED	N,N,N',N'- tetramethyl-ethylendiamin
TEMPOL	4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin 1-oxyl
TES	testosteron
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol

Kapitola 1

Teoretický úvod

1.1 Biotransformace a biotransformační enzymy

1.1.1 Xenobiotika a jejich osud v organismu

Biotransformace je proces přeměny cizorodých látek v živém organismu napomáhající jejich eliminaci [1]. Cizorodé látky, se kterými organismus přichází do styku, přičemž normálně v něm nejsou přítomny a nemají žádnou fyziologickou úlohu, se nazývají xenobiotika [1] a mohou být přírodního nebo syntetického původu. Xenobiotika vstupující do organismu mohou být vyloučena v nezměněné formě, mohou projít neenzymatickou přeměnou anebo mohou být metabolizována, tj. přeměněna enzymaticky. Metabolizovány jsou především látky, které by díky vysoké lipofilitě nemohly být z organismu vyloučeny. Biotransformační reakce tedy zpravidla směřují ke snížení lipofility xenobiotik. Tento proces je většinou dvoufázový, v první fázi se v molekule vytvoří nebo odkryje vhodná funkční skupina, v druhé fázi biotransformace je tato funkční skupina použita ke konjugaci s endogenní hydrofilní molekulou [2].

Biotransformační enzymy se vyvinuly pravděpodobně na ochranu organismů před xenobiotiky přírodního, např. rostlinného původu a vyznačují se některými vlastnostmi, které je odlišují od enzymů endogenního metabolismu. Jedná se zejména o nízkou substrátovou specifitu a dokonce i nízkou specifitu produktu (tj. možnost katalýzy různých reakcí jedním enzymem). Dále jsou biotransformační enzymy charakterizovány afinitou k lipofilním sloučeninám a většinou také nízkou kapacitou. Je pro ně typické, že mohou být xenobiotiky, včetně svých substrátů, indukovány nebo inhibovány.

Důsledky biotransformačních reakcí pro účinky xenobiotika na organismus mohou být rozmanité, v nejjednodušším případě, kdy z jednoho xenobiotika vzniká jeden metabolit, existují čtyři možnosti:

- 1) ani xenobiotikum ani metabolit nejsou biologicky aktivní
- 2) pouze xenobiotikum je biologicky aktivní
- 3) xenobiotikum i metabolit jsou biologicky aktivní
- 4) za biologickou aktivitu je zodpovědný výhradně metabolit

Biologickou aktivitou se přitom rozumí žádoucí i nežádoucí účinky, případně toxicita. Biotransformační reakce tedy mohou mít charakter aktivační nebo deaktivující, toxikační nebo detoxikační. Aktivita metabolitu se přitom může výrazně kvalitativně i kvantitativně lišit od aktivity původního xenobiotika. Studium biotransformace je proto významnou součástí farmakologického i toxikologického výzkumu a vývoje nových léčiv.

1.1.2 Mikrosomální monooxygenázový systém

1.1.2.1 Cytochromy P450

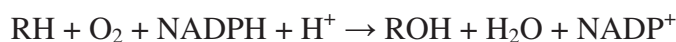
Za nejvýznamnější nadrodinu biotransformačních enzymů první fáze biotransformace jsou považovány hemthiolátové enzymy cytochromy P450 (P450, E.C. 1.14.14.1, [2]). Cytochromy P450 jsou terminálními oxidázami tzv. mikrosomálního monooxygenázového systému, který představuje nejvýznamnější enzymatický systém

první fáze biotransformace. Je též označován jako systém oxidáz a oxygenáz se smíšenou funkcí (mixed function oxidases – MFO system). Základními složkami MFO systému jsou flavinový enzym NADPH:cytochrom P450 reduktáza (CPR, E.C. 1.6.2.4.), cytochrom P450 a membránové lipidy. Subcelulárně je MFO systém lokalizován převážně v membráně endoplazmatického retikula (v tzv. mikrosomální frakci) v orgánech exponovaných xenobiotikům (játra, plíce, ledviny, gastrointestinální trakt) a v menší míře v mitochondriální membráně.

Cytochromy P450 byly nalezeny ve všech studovaných prokaryotických i eukaryotických organismech [3]. Kromě metabolismu xenobiotik se podílí i na endogenních procesech jako např. metabolismu eikosanoidů, biosyntéze cholesterolu a žlučových kyselin, syntéze a metabolismu steroidů nebo syntéze a degradaci biogenních aminů [2].

Systematická nomenklatura cytochromů P450 je založena na shodě aminokyselinových sekvencí. Cytochromy P450 se dělí na rodiny označované číselně (sekvenční homologie >40%) a na podrodiny značené písmeny (sekvenční homologie >60%) [4]. Jednotlivé enzymy náležící do podrodin mají opět číselné označení, příkladem výsledného pojmenování enzymu tedy může být 2E1, 3A4 apod. Celkem bylo k 7. září 2007 identifikováno u živých organismů 7703 různých sekvencí cytochromů P450 náležících do 866 rodin, z toho u živočichů 2740 sekvencí z 109 rodin [5]. U savců se nacházejí cytochromy P450 z 18 rodin [2]. Lidský genom obsahuje geny 57 cytochromů P450 (s 58 pseudogeny), z nichž 15 se účastní biotransformace xenobiotik, 29 se podílí na metabolismu endogenních substrátů a u 13 není substrát známý [6].

Jako monooxygenázy se označují enzymy katalyzující zpravidla oxidace, při kterých je do molekuly substrátu zaveden jeden atom kyslíku, nejčastěji ve formě hydroxylové skupiny. Monooxygenázová reakce je také nejtypičtější reakcí katalyzovanou cytochromy P450. V průběhu reakce dochází k aktivaci molekulárního kyslíku postupně dvěma elektrony, jejichž donorem je CPR. Jeden atom kyslíku je potom zabudován do molekuly substrátu a druhý je redukován na vodu. Průběh monooxygenázové reakce lze tedy vyjádřit následující rovnicí, kde RH značí substrát a ROH hydroxylovaný produkt [7]:



Oxygenační reakce katalyzované cytochromy P450 zahrnují např. C-hydroxylace, oxygenace heteroatomu nebo tvorbu epoxidů. Z dalších oxidačních reakcí se může jednat o oxidativní štěpení esterů, dearylacii, aromatickou dehalogenaci a další reakce. V mnoha případech jsou zdánlivě neobvyklé produkty důsledkem změn v uspořádání molekuly, ke kterým dochází samovolně až po uvolnění z vazby na cytochrom P450 [8].

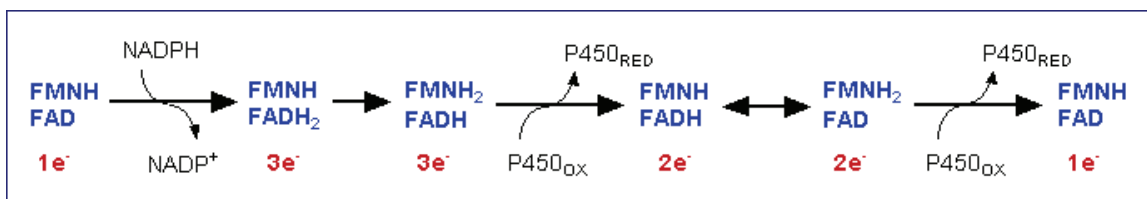
Kromě monooxygenázové aktivity mohou cytochromy P450 působit i jinými mechanismy. Jsou schopny katalyzovat některé redukční reakce, pokud elektrony poskytnuté CPR nejsou využity k aktivaci kyslíku, ale redukují přímo substrát [8]. Dalším reakčním mechanismem cytochromů P450 je peroxidasová aktivita. V tomto případě není třeba CPR jako donor elektronů, protože neprobíhá aktivace molekulárního kyslíku. Zdrojem atomu kyslíku je organický peroxid nebo peroxid vodíku a výsledkem je hydroxylovaný substrát stejně jako v případě typického monooxygenázového mechanismu. Cytochromy P450 mohou však peroxid vodíku a jiné reaktivní formy

kyslíku (reactive oxygen species - ROS) také produkovat a to při interakci se substrátem, který má sice afinitu k danému cytochromu P450, ale obtížně se hydroxyluje. V tom případě dojde k aktivaci kyslíku, ale už ne k jeho zabudování do molekuly substrátu a aktivní forma kyslíku je uvolněna do okolí. Některé cytochromy P450 generují ROS díky své NADPH – oxidasové aktivitě i v nepřítomnosti substrátu [9].

1.1.2.2 NADPH:cytochrom P450 reduktáza

NADPH:cytochrom P450 reduktáza je membránový enzym katalyzující přenos elektronů z NADPH na cytochromy P450 [10], [11]. Dalšími fyziologickými akceptory elektronů od CPR jsou např. mikrosomální hem oxygenáza nebo cytochrom b₅, mezi nefyziologické patří např. cytochrom c, který je využíván laboratorně pro stanovení aktivity CPR [12]. Aminokyselinové sekvence CPR z různých organismů vykazují velmi vysokou podobnost, což svědčí o významu tohoto enzymu v průběhu evoluce [10].

CPR je jeden z mála savčích enzymů obsahujících jako prostetické skupiny dva flaviny, FAD i FMN, v jednom polypeptidovém řetězci [11], přičemž FAD funguje jako akceptor elektronového páru ve formě hydridového iontu z NADPH a FMN předává elektrony jednotlivě cytochromu P450. CPR funguje jako dělič elektronového páru na základě stabilizace semichinonových forem obou flavinů (tj. forem redukovaných jedním elektronem) [11]. CPR může být celkem redukována čtyřmi elektrony, během katalytického cyklu se fyziologicky pohybuje mezi stavy, kdy je redukována jedním až třemi elektrony [13]. Přenos elektronů mezi flaviny CPR je znázorněn na Obr. 1, tento přenos je přímý bez zapojení aminokyselinových zbytků.



Obr. 1 Přenos elektronů mezi flaviny CPR (www.uky.edu/Pharmacy/ps/Porter/CPR_enzymology.htm)

Vysoká selektivita CPR k NADPH je způsobena přítomností pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků ve vazebném místě pro koenzym, které interagují s negativně nabitou fosfátovou skupinou v poloze 2' ribosy odlišující NADPH od NADH [10].

CPR s cytochromem P450 tvoří díky iontovým a hydrofobním interakcím funkční komplex 1:1 [10], [14]. Přesto je však obsah CPR v dané tkáni několikanásobně menší než obsah cytochromů P450, např. v játrech se poměr CPR k cytochromům P450 pohybuje mezi 1:10 a 1:20 [14]. Na vazbu konkrétního cytochromu P450 a CPR má pravděpodobně vliv navázání substrátu na tento cytochrom P450, význam mohou mít také interakce mezi různými cytochromy P450 [14].

1.2 Metody studia biotransformace

1.2.1 In vitro systémy pro studium biotransformace

Biotransformační studie *in vitro* jsou nezbytnou součástí toxikologického výzkumu i vývoje nových léčiv, neboť umožňují významnou měrou snížit počet testů na lidských dobrovolnících a poskytují detailnější informace o metabolismu studované látky. Podle složitosti systému rozlišujeme následující *in vitro* systémy pro studium biotransformace:

1.2.1.1 *Purifikované enzymy a rekonstituované systémy*

Jednotlivé biotransformační enzymy mohou být izolovány z tkání zvoleného modelového laboratorního zvířete nebo lidského materiálu nebo mohou být k purifikaci použity rekombinantní lidské enzymy exprimované v mikroorganismech, např. v bakteriích *Escherichia coli*. Cytosolární, tj. rozpustné enzymy je možné použít v purifikované formě, membránové enzymy je nutné rekonstituovat ve fosfolipidové dvojvrstvě. V případě cytochromů P450 musí mít rekonstituovaný systém k vytvoření funkčního MFO systému tři složky: cytochrom P450, CPR a fosfolipidovou frakci.

Použití purifikovaných enzymů při studiu metabolismu umožňuje získání detailních informací o vlastnostech daného enzymu při interakci se studovanou látkou a o jejích metabolitech tvořených tímto enzymem.

1.2.1.2 Membránové frakce obsahující lidské rekombinantní enzymy

Rekombinantní lidské biotransformační enzymy exprimované v bakteriálních buňkách mohou být použity ke studiu biotransformace také ve formě izolovaných bakteriálních membrán, enzymy exprimované v eukaryotických (např. hmyzích) buňkách potom ve formě mikrosomů (viz dále). Například membrány *Escherichia coli* představují poměrně levný a dobře reprodukovatelný systém pro expresi lidských cytochromů P450, přičemž tyto enzymy si zachovávají katalytické kinetické parametry i inhibiční vlastnosti srovnatelné s lidskými jaterními mikrosomy při použití jednotlivých enzymů i jejich směsí [15].

Stejně jako u purifikovaných enzymů tyto systémy poskytují informace o metabolismu studované látky definovaným enzymem, jejich výhodou je přitom nízká cena a snadnější a rychlejší příprava s menšími ztrátami enzymové aktivity během izolace [16]. Lze je také využít pro studium vlivu polymorfismu cytochromů P450 na jejich aktivitu (komerčně dostupné je např. stanovení genotypu P450 2C9 – [17]) nebo pro studium lékových interakcí podmíněných daným cytochromem P450.

Nevýhodou membránových systémů mohou být příměsi nedefinovaných hostitelských (např. bakteriálních či hmyzích) enzymů. Nejedná se však zpravidla o enzymy metabolizující xenobiotika, projeví se proto jen při studiu určitých typů reakcí.

1.2.1.3 Jaterní mikrosomy

Mikrosomy jsou fragmenty endoplazmatického retikula získané z dané tkáně homogenizací a diferenční centrifugací [18], [19]. Vzhledem k obsahu

biotransformačních enzymů a významu jater při metabolismu cizorodých látek se pro studium biotransformace většinou používají jaterní mikrosomy.

Mikrosomy představují cenný zdroj většiny enzymů první fáze biotransformace a některých enzymů druhé fáze [20] a mohou tudíž pomoci identifikovat metabolity studované látky tvořené širokým spektrem jaterních enzymů. S použitím mikrosomů lze studovat i kinetiku metabolismu či možnou inhibici biotransformačních enzymů daným xenobiotikem [20].

Mikrosomy poskytují spíše kvalitativní než kvantitativní odhad skutečného metabolismu látky v organismu, protože jsou oproti jaterní tkáni obohaceny o biotransformační enzymy, koncentrace a dostupnost substrátu se mohou lišit od situace *in vivo* a není přítomná kompetice s jinými enzymy [17], [20]. Další nevýhodou lidských jaterních mikrosomů může být v určitých typech studií vysoká interindividuální variabilita obsahu a aktivity jednotlivých cytochromů P450, jindy mohou být lidské jaterní mikrosomy naopak využity ke studiu této variability [17], [20]. Pro získání reprezentativního směsného vzorku lidských mikrosomů je třeba použít tkáň od více než dvaceti dárců [20], což může v praxi představovat problém. V neposlední řadě je tedy nevýhodou použití lidských jaterních mikrosomů jejich horší dostupnost pro většinu laboratoří.

1.2.1.4 Cytosolická frakce

Při izolaci mikrosomů lze získat také cytosolickou frakci buněk dané tkáně. Jaterní cytosolická frakce obsahuje rozpustné enzymy, mezi které patří enzymy účastnící se první i druhé fáze biotransformace.

1.2.1.5 S9 frakce

Jaterní S9 frakce se získává po centrifugaci tkáně při 9000g. Tato frakce obsahuje enzymy první i druhé fáze biotransformace, umožňuje následné působení mikrosomálních i cytosolických enzymů a tím získání kompletnější představy o metabolickém profilu studované látky. Nevýhodou používání S9 frakce pro studium biotransformace je celkově nižší enzymatická aktivita a tudíž menší pravděpodobnost, že budou detekovány minoritní metabolity dané látky [17], [20]. S9 frakce se používá jako metabolický aktivační systém např. v kombinaci s Amesovým testem [21] pro detekci mutagenního potenciálu xenobiotik a jejich metabolitů.

1.2.1.6 Hepatocyty

Primární hepatocyty

Použití lidských primárních hepatocytů může přinést cenné informace o metabolismu xenobiotika u člověka, neboť výsledky získané v tomto systému velmi dobře korelují se situací in vivo. Primární hepatocyty jsou použitelné pro experimenty pouze po dobu několika hodin, což velmi snižuje jejich dostupnost. Po delší dobu je lze uchovávat ve zmrazeném stavu.

Kultura hepatocytů

Výhodou hepatocytů v kultuře oproti primárním hepatocytům je jejich použitelnost po delší dobu. Stejně jako u primárních hepatocytů tento systém zahrnuje i vliv difuze a transportu xenobiotika na jeho metabolismus. Po několik dní si hepatocyty v kultuře

zachovávají i funkční regulační mechanismy umožňující např. sledovat snížení nebo zvýšení aktivity biotransformačních enzymů vlivem xenobiotik [20]. Nevýhodou systému je postupná ztráta vlastností specifických pro jaterní tkáň, např. exprese cytochromů P450.

Nevýhodou použití obou zmíněných typů hepatocytů může být absence jiných typů jaterních buněk, které mohou být důležité např. jako zdroj kofaktorů pro některé reakce [17]. Dalšími nevýhodami tohoto modelu je obtížná a časově náročná izolace často spojená s poškozením určitého procenta hepatocytů a také již zmíněná interindividuální variabilita v obsahu a aktivitě biotransformačních enzymů.

1.2.1.7 Jaterní buněčné linie

Lidské jaterní buněčné linie jsou obvykle odvozeny od primárních tumorů jaterního parenchymu vyskytujících se u pacientů s chronickou hepatitidou nebo cirhózou jater. Jejich výhodou oproti primárním hepatocytům je snadnější kultivace, vzhledem k méně diferencovanému charakteru buněk a nízké expresi enzymů první i druhé fáze biotransformace však patří k méně používaným modelovým *in vitro* systémům [17].

1.2.1.8 Transgenní buněčné linie

Biotransformační reakce zvoleného biotransformačního enzymu lze sledovat také při jeho expresi v transgenních buněčných liniích. Tento systém lze využít k preparativním účelům pro stanovení struktury metabolitů nebo např. k posouzení potenciálních

lékových interakcí na metabolické úrovni [20]. Nevýhodou tohoto systému je jeho vysoká cena.

1.2.1.9 Jaterní řezy

V jaterních řezech zůstává zachována lobulární struktura a buněčná diverzita, dále tento model umožňuje posoudit vliv vzájemných mezibuněčných interakcí a zachovává i transportní mechanismy pro xenobiotika. Tento model také umožňuje sledovat indukci biotransformačních enzymů vlivem xenobiotik, přičemž obsah cytochromů P450 se s časem snižuje méně výrazně než v případě hepatocytů [20]. Pro reprodukovatelné výsledky je třeba zajistit produkci řezů o stejné velikosti s vysokou přesností s použitím speciálních zařízení. Nevýhodou oproti hepatocytům je omezený průnik média do nitra řezu a snížená dostupnost substrátu pro biotransformační enzymy. Další nevýhodou je nemožnost uchovávání ve zmrazeném stavu a nedostupnost jaterních řezů za komerčních podmínek [17].

1.2.1.10 Perfundovaná játra

Izolovaná perfundovaná játra jsou považována za nejvěrnější napodobení situace *in vivo*, jejich použití jako *in vitro* modelu má však řadu nevýhod. Hlavním omezením je nedostupnost lidských jater pro tento typ experimentu, dále nízká reprodukovatelnost výsledků, omezená životnost jater a náročnost provedení experimentů. Perfundovaná játra zvířecích modelů se proto používají zejména v případech, kdy je vyžadován sběr a analýza žluči [17].

Je zřejmé, že každý model pro studium metabolismu xenobiotik *in vitro* má výhody i nevýhody a jeho výběr je třeba zvážit s ohledem na konkrétní studovaný problém. Obecně se pro odhad metabolismu cizorodých látek u člověka upřednostňují systémy využívající lidské biotransformační enzymy, neboť existují značné mezidruhové rozdíly v obsahu jednotlivých cytochromů P450, jejich aktivitě i regulaci [22]. Vzhledem k nízké dostupnosti lidské jaterní tkáně se jedná většinou o rekombinantní enzymy. Pro studium dalších dopadů interakce xenobiotik s biotransformačními enzymy, např. pro studium tvorby oxidativního stresu, je naopak vhodné výsledky získané na lidských rekombinantních enzimech porovnat také s použitím „nativních“ systémů, tedy systémů obsahujících biotransformační enzymy společně s dalšími enzymy endogenního metabolismu a simulujících tak lépe situaci *in vivo*. V těchto případech se jedná většinou o tkáně či subcelulární frakce získané z vhodných zvířecích modelů.

Využití zvířecích modelů je také nutné pro biotransformační studie *in vivo*, které zpravidla následují po testech *in vitro* v procesu testování bezpečnosti xenobiotik a jejich schvalování pro použití u lidí [17].

1.2.2 Miniprasata

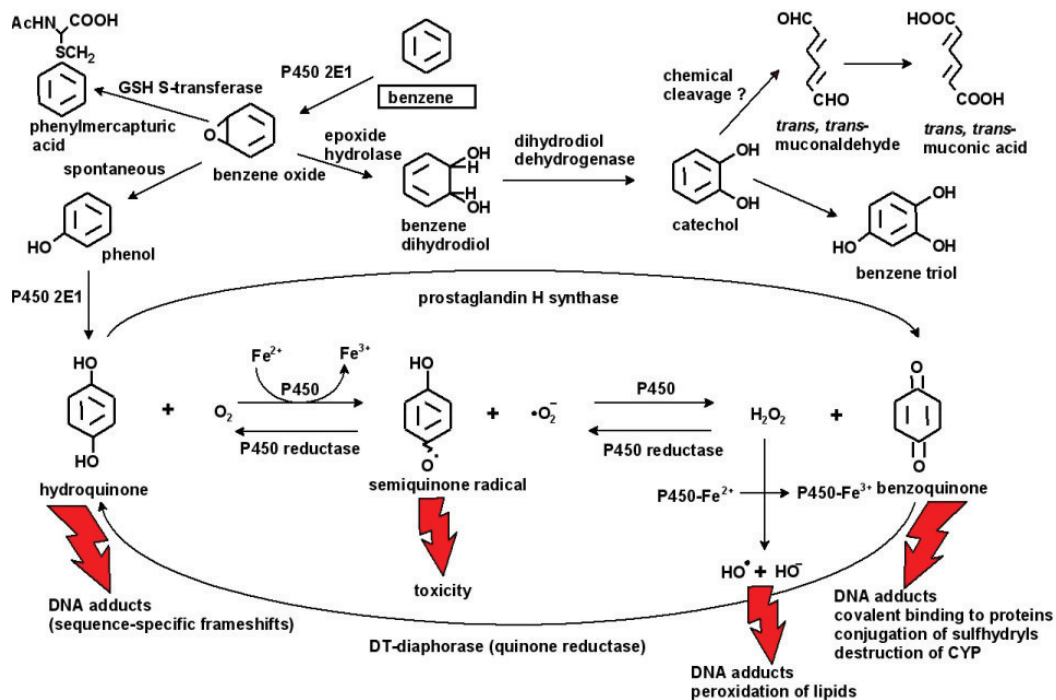
V jaterních mikrosomech miniprasat byly nalezeny cytochromy P450 s aktivitami odpovídajícími nejdůležitějším lidským cytochromům [23], [24], [25]. Ve srovnání s nejpoužívanějším modelovým zvířecím druhem, potkanem, je zejména významný miniprasečí cytochrom P450 3A29, který odpovídá aktivitou a indukčními vlastnostmi lidskému cytochromu P450 3A4 zodpovědnému za metabolismus 50% léčivých látek na

trhu [26]. Dále byly v jaterních mikrosomech miniprasat nalezeny aktivity typické pro lidské cytochromy 2A6, 2D6, 2E1 a 2C9 [24]. Miniprasata jsou proto navrhována jako vhodnější zvířecí model pro studium lidské biotransformace než například běžně používaný potkan.

1.3 Toxicita chinonů

1.3.1 Reaktivní metabolity benzenu

Chronická expozice benzenu má za následek zvýšené riziko závažných poruch krvetvorby jako jsou např. aplastická anémie nebo akutní myeloidní leukémie [27], [28]. Benzen je přitom hematotoxický i při koncentracích nižších než 1 ppm [29]. Klíčová role v toxicitě benzenu je připisována jeho metabolismu [28], [30], (Obr.2). Mezi reaktivní metabolity benzenu zodpovědné za jeho toxické účinky patří 1,4-hydrochinon (HQ) a jeho oxidovaná forma 1,4-benzochinon (BQ), přičemž za jejich možné mechanismy účinku je považováno jak kovalentní tak i oxidativní poškození DNA a proteinů [27], [30].



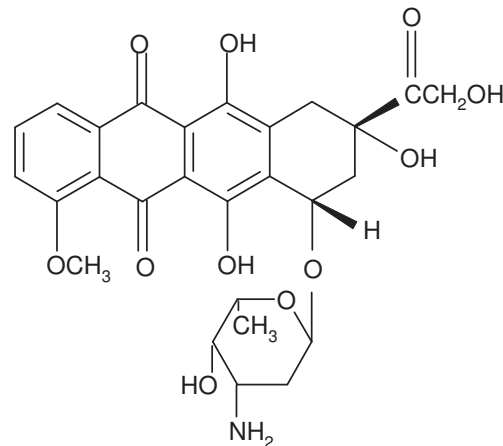
Obr.2 Schématické znázornění metabolismu a toxicity benzenu a jeho metabolitů [31]

U benzenu i jeho reaktivních metabolitů HQ a BQ byly pozorovány také negativní účinky na cytochromy P450. Expozice benzenu snižovala obsah cytochromů P450 u potkanů *in vivo* [32], HQ a BQ způsobovaly destrukci cytochromů P450 v potkanních i lidských jaterních mikrosomech *in vitro* [33]. Destrukce cytochromů P450 vlivem HQ a BQ může mít následky pro organismus, neboť *in vivo* ovlivňuje toxicitu a účinky xenobiotik. U myši zbavených aktivity veškerých jaterních cytochromů P450 se projevíly změny metabolismu lipidů a cholesterolu a jejich schopnost metabolizovat vybraná xenobiotika byla závažně porušena [34]. Dále může být poškození cytochromů P450 v závislosti na jeho mechanismu také považováno za obecný marker poškození bílkovin vlivem metabolitů benzenu. Jedním z cílů předkládané práce bylo tento mechanismus popsat a případně zobecnit.

Jelikož bylo v dřívějších pracích zjištěno, že lidské a potkanní jaterní cytochromy P450 jsou rozdílně citlivé vůči toxickému působení metabolitů benzenu i vůči působení oxidativního stresu [33], potkan není vhodným modelovým druhem pro studium těchto interakcí. Lidská jaterní tkáň je ale pro mnoho laboratoří jen omezeně dostupná a je tedy třeba hledat vhodný modelový systém pro studium úlohy biotransformačních enzymů v toxicitě metabolitů benzenu a chinonů obecně. V rámci této práce byly použity dva *in vitro* přístupy, a to využití rekombinantních lidských cytochromů P450 v bakteriálních membránách a experimenty s využitím jaterních mikrosomů miniprasat.

1.3.2 Anthracyklinová cytostatika

Anthracykliny patří mezi nejúčinnější a nejpoužívanější cytostatika v terapii solidních nádorů i leukémií [35], [36]. Vůdčí molekulou této skupiny látek je cytostatikum doxorubicin (DOX, obr. 3). Hlavními mechanismy účinku anthracyklinů jsou interkalace do molekul DNA a inhibice topoisomérázy II [37], [38], [39].



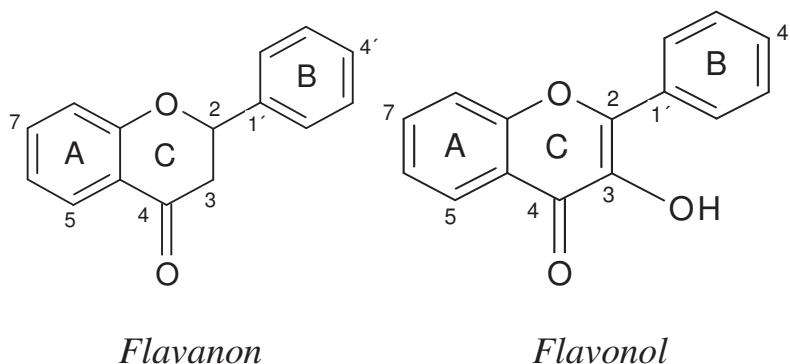
Obr.3 Struktura doxorubicinu

Interkalační mechanismus je umožněn planární strukturou molekuly anthracyklinu a spočívá ve vmezezení molekuly mezi dva sousední nukleotidové páry a narušení funkce a replikace DNA. Topoisoméráza II (E.C. 5.99.1.3) je jedním z enzymů podílejících se na replikaci DNA, jejím úkolem je snižování torzního napětí vznikajícího při rozplétání vláken DNA pomocí helicázy. Je tedy enzymem nezbytným pro funkci DNA. V přítomnosti DOX se vytváří a stabilizuje komplex mezi DOX, DNA a topoisomérázou II a přerušuje se tak katalytický cyklus tohoto enzymu [38].

Nejzávažnějším nežádoucím účinkem anthracyklinových cytostatik, limitujícím jejich terapeutické dávky, je jejich akutní a chronická kardiotoxicita. Klinickým nálezem jsou arytmie a kongestivní srdeční selhání [40], [36]. Za možné příčiny kardiotoxicity DOX je považována řada mechanismů včetně ovlivnění homeostázy železa, produkce ROS a apoptózy [36], [41], [42], přičemž klinický obraz je pravděpodobně výsledkem komplexních interakcí všech těchto procesů. Většina autorů se však shoduje, že

1.4 Polyfenolické antioxidanty

V lidské potravě je obsaženo široké spektrum polyfenolických látek rostlinného původu s antioxidačními vlastnostmi. Pravděpodobně nejpočetnější strukturální skupinou mezi nimi jsou flavonoidy (Obr. 5). Flavonoidy se vyskytují v ovoci, zelenině, čaji nebo např. červeném víně a je jim připisována řada vlastností prospěšných pro lidský organismus. Mezi popisované účinky flavonoidů v organismu patří antioxidační, antivirotické, antikarcinogenní nebo protizánětlivé účinky [47].

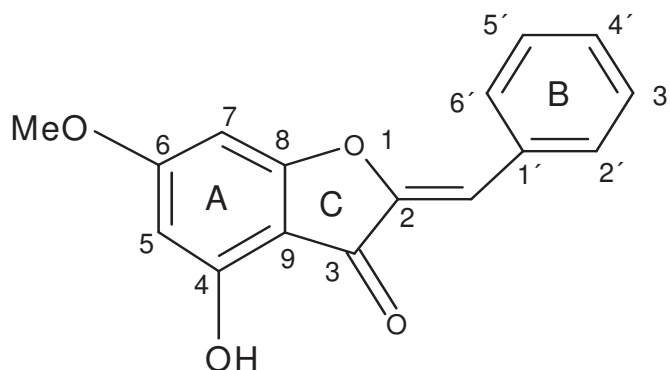


Flavanony	Eriodictyol (5,7,3',4'- tetrahydroxyflavon)	5,7,3',4'- OH
Flavonoly	Fisetin (3,7,3',4'- tetrahydroxyflavon)	3,7,3',4'- OH
	Kvercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon)	3,5,7,3',4'-OH
	Myricetin (3,5,7,3',4',5' – hexahydroxyflavon)	3,5,7,3',4',5'-OH
	Kaempferol (3,5,7,4'- tetrahydroxyflavon)	3,5,7,4'-OH
	Morin (3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavon)	3,5,7,2',4'-OH

Obr. 5 Struktury použitých přírodních flavonoidů

Mnohé flavonoidy jsou chelátory železa, což spolu s jejich antioxidačním působením předurčuje tyto látky jako látky potenciálně příznivé pro zmírnění nežádoucích účinků anthracyklinových cytostatik.

S cílem vystupňovat příznivé účinky přirozených flavonoidů jsou syntetizovány a v různých modelech testovány jejich strukturálně příbuzné analogy. Tyto látky patří do různých tříd flavonoidů a dělí se na aurony, chalkony, flavony, flavonoly, chromony a isoflavony. V rámci této práce byl testován syntetický analog flavonoidů 4-hydroxy-6-methoxyauron (Obr. 6).



Obr. 6 Struktura 4-hydroxy-6-methoxyauronu

Kapitola 2

Cíl práce

Cílem této práce bylo:

- 1) Připravit modelový systém s lidskými biotransformačními enzymy exprimovanými v bakteriálních membránách a porovnat vlastnosti tohoto systému s jaterními mikrosomy pokusných miniprasat. Zhodnotit možné využití těchto dvou systémů pro testování interakcí látek se strukturním motivem chinonů s biotransformačními enzymy. Dílčím cílem bylo také porovnat odolnost jednotlivých enzymů P450 vůči působení modelových xenobiotik (metabolity benzenu).
- 2) Popsat molekulární mechanismus možných toxických následků interakcí jednoduchých chinonů s biotransformačními enzymy.
- 3) Popsat možnosti použití jaterních mikrosomů miniprasat jako modelového systému k testování nežádoucích účinků anthracyklinů

Kapitola 3

Materiály a metody

3.1 Materiály

3.1.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly v analytické kvalitě.

Od firmy Sigma-Aldrich (Praha, ČR) byly získány následující chemikálie:

ampicilin, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaCl , FeCl_3 , ZnCl_2 , CoCl_2 , Na_2MoO_4 , CaCl_2 , CuCl_2 , H_3BO_3 , thiamin, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 , isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG), 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris), sacharóza, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, dithiothreitol (DTT), isopropanol, lysozym, leupeptin, aprotinin, bestatin, fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF), KCl , β -nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, redukovaná forma (NADPH), glukózo-6-fosfát, β -nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, oxidovaná forma (NADP), glukózo-6-fosfát dehydrogenáza, 1,4-benzochinon (BQ), 1,4-hydrochinon (HQ), katechol (C), 2-thiobarbiturová kyselina, trichloroctová kyselina, 1,1,3,3-tetramethoxypropan, 5,5'-dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO), aktivní uhlí, 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin 1-oxyl (TEMPOL), chlorzoxazon (CLZ), testosteron (TES), 6 β -hydroxytestosteron, fenacetin, H_3PO_4 , Na_2CO_3 , želatina, Pyronin Y, Tween 20, 4-chloro-1-naftol, H_2O_2 , hydrochlorid DOX, kvercetin, fisetin a morin.

Další chemikálie:

SOC médium bylo získáno od firmy Life Technologies Ltd. (Paisley, Velká Británie), LB base od firmy Gibco BRL byla dodána firmou KRD (Praha, ČR). Agar, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$,

glycin, laurylsulfát sodný (SDS), kaempferol a myricetin byly získány od firmy Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Švýcarsko) a trypton, kvasničný extrakt a pepton od firmy Oxoid Ltd.(Basingstoke, Hampshire, Velká Británie). Glycerol byl od firmy Penta (Chrudim, ČR), HCl, CH₃COOH a ethylacetát od firmy Lachema (Lach-Ner s.r.o, Neratovice, ČR). Oxid uhelnatý a argon 5.6 (99,9996%) byly dodány firmou Linde Gas a.s. (Praha, ČR), dále byly použity Supersignal West Pico chemiluminiscenční substrát a BCA Protein assay od Pierce Biotechnology Inc. (Rockford, IL, USA). Cytochrom c, methanol LiChrosolv a CH₂Cl₂ byly získány od firmy Merck s.r.o (Říčany, ČR), akrylamid, bis-akrylamid, β-merkptoethanol, persíran amonný a N,N,N',N'- tetramethyl-ethylendiamin (TEMED) od firmy Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Německo). Bromfenolová modř byla od firmy BioRad (Hercules, CA, USA), 6-hydroxychlorzoxazon byl syntetizován ve Výzkumném ústavu farmacie a biochemie (Praha, ČR). Eriodictyol byl laskavě darován Dr. Yune-Fang Ueng (National Research Institute of Chinese Medicine, Taipei, Taiwan). 4-hydroxy-6-methoxyauron byl syntetizován v laboratoři Dr. Ahcene Boumendjela (Département de Pharmacochimie Moléculaire, Faculte de Pharmacie de Grenoble, Meylan, France).

HQ a C byly před použitím purifikovány rekrystalizací, BQ byl purifikován sublimací. Ethylacetát byl před použitím purifikován destilací. DMPO byl purifikován pomocí aktivního uhlí podle doporučení firmy Bruker BioSpin GmbH (Rheinstetten/Karlsruhe, Německo) a uchováván v alikvotech v atmosféře argonu při -20°C.

3.1.2 Biologický materiál

Buňky *Escherichia coli* DH5 α byly získány od firmy Life Technologies Ltd. a byly uchovávány při -80 °C. Plasmidy pro expresi lidských rekombinantních P450 a CPR byly získány darem od F. P. Guengeriche (Center in Molecular Toxicology, Vanderbilt University, Nashville, TN) a E. M. J. Gillam (Department of Pharmacology and Physiology, University of Queensland, Brisbane, Australia). Purifikované lidské P450 2E1 a 3A4 a polyklonální protilátky proti těmto P450 byly získány jako dar od F. P. Guengeriche. Kozí anti-králičí IgG navázaný na křenovou peroxidázu (Goat anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase, IgG-HRP) byla získána od firmy Sigma-Aldrich.

3.1.3 Další materiály

Pro přenos proteinů při provedení imunoblotingu byla použita membrána Hybond-P od firmy Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA).

3.1.4 Zvířata

V experimentech byla použita jaterní tkáň dvou samců brněnské bílé variety Goettingenských miniprasat odchovaných ve Výzkumném ústavu veterinární medicíny v Brně, ČR. Použití jedinci byli 6 měsíců staří a vážili 22-31 kg. Zvířata byla krmena standardní dietou pro prasata (A1) smíchanou s chlebem. Nebyla prováděna indukce

žádných forem cytochromů P450. Zvířata byla usmrcena zabíjecí pistolí, jaterní tkáň byla odebrána z mediálního laloku a uchována při -80°C až do izolace mikrosomů.

3.1.5 Přístroje

Parní sterilizátor OT 032, Nüve (Ankara, Turecko)

Milli-Q destilační jednotka pro produkci ultračisté vody, Millipore s.r.o (Praha, ČR)

Předvážky FY-300, A&D Company Ltd. (Tokyo, Japonsko)

Analytické digitální váhy BBC model, Boeco (Hamburg, Německo)

Inkubátor TCH 100, Laboratorní přístroje (Praha, ČR)

Vodní lázeň Elpan shaker type 357, Labora (Praha, ČR)

Inkubátor s orbitálním třepáním, Gallenkamp (Loughborough, Leicestershire, Velká Británie)

pH-metr inoLab, WTW s.r.o (Praha, ČR)

Centrifugy Z 513 K a Z 233 MK-2, Hermle Labortechnik GmbH (Wehingen, Německo)

Ultrazvukový homogenizátor model 300V/T, Biologics Inc. (Manassas, Virginia, USA)

Ultracentrifuga Beckman L7, Beckman Coulter Inc. (Fullerton, CA, USA)

Spektrofotometr Cary 300, Varian Inc. (Palo Alto, CA, USA)

Vodní lázeň Tempette Junior TE-8J, Techne Inc. (Burlington, NJ, USA)

ESR spektrometr Bruker Elexsys E540 X band, Bruker BioSpin GmbH (Rheinstetten/Karlsruhe, Německo)

Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P, Bandelin electronic GmbH (Berlin, Německo)

Centrifuga MPW-310, Mechanika Precyzyjna (Mech-Prec Elektronik s.c., Zlotow, Polsko)

Minicentrifuga Spectrafuge, Labnet International Inc. (Woodbridge, NJ, USA)

Třepačka JK MS1, IKA Werke GmbH (Staufen, Německo)

HPLC sestava Agilent HP1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Elektroforetická sestava MiniProtean II (BioRad, Hercules, CA, USA)

Sestava Miniblotter (BioRad, Hercules, CA, USA)

CDD kamera LAS 1000, Fujifilm CZ s.r.o (Praha, ČR)

Fotoaparát Lumix DMC-FX01, Panasonic Czech republic s.r.o (Praha, ČR)

3.1.6 Složení roztoků

K přípravě všech roztoků byla použita ultračistá voda.

LB médium	Luria-Bertani base naředěná podle návodu výrobce, sterilizováno autoklávováním, ampicilin (10mg/100ml, sterilizován membránovou filtrací)
LB agar	LB médium, 1,5% agar, ampicilin (10mg/100ml, sterilizován membránovou filtrací, přidán po ochlazení)
KPi pro TB	11,5g KH_2PO_4 a 64,5g K_2HPO_4 /500ml
TB expresní médium	6g tryptonu, 12g kvasničného extraktu (yeast extract), 1g peptonu, 200 μl 2,5M NaCl, 2 ml glycerolu, 50 ml KPi pro TB/500ml média, sterilizováno autoklávováním, ampicilin (50mg/500ml, sterilizován membránovou filtrací, přidán po ochlazení)
TE (roztok stopových prvků)	2,7g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,131g ZnCl_2 , 0,2g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,2g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,075g CaCl_2 , 0,1g CuCl_2 , 0,05g H_3BO_3 , 10ml koncentrované HCl/100ml, sterilizováno autoklávováním
2xTES	100 mM Tris acetát, 500 mM sacharóza, 0,5 mM EDTA, pH upraveno na 7,6 pomocí CH_3COOH

KPi pH 7,4	KH_2PO_4 a K_2HPO_4 v poměru 2:8 v požadované koncentraci, pH upraveno na 7,4
sonikační pufr	100 mM KPi pH 7,4, 6 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, 20% glycerol, 0,1 mM DTT (přidáno těsně před použitím)
PMSF	100 mM PMSF v isopropanolu
KCl-Tris	150 mM KCl, 50 mM Tris, pH upraveno HCl na 7,7 při 25°C
NADPH-GS	50 mM MgCl_2 , 25 mM glukózo-6-fosfát, 2,5 mM NADP, 3,5U/ml glukózo-6-fosfát dehydrogenáza
PBS	20 mM KPi, pH 7,4, 150 mM NaCl
PBS/Tween	20 mM KPi, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20
Barvicí roztok s 4-chloro-1-naftolem	2,5 mM 4-chloro-1-naftol, 20% methanol, 15 mM H_2O_2 v PBS

3.2 Příprava membránových systémů obsahujících lidské rekombinantní cytochromy P450

Expresse bicistronických systémů obsahujících lidské P450 1A2, 1B1, 2A6, 2E1, 2C9 a 3A4 spolu s CPR nebo monocistronického pouze s CPR a izolace bakteriálních membrán byly provedeny již popsanou a zavedenou metodikou podle [48] a [49].

3.2.1 Expresse lidských cytochromů P450 v bakteriích *Escherichia coli*

Buňky *E. coli* DH5 α byly transformovány plasmidy pomocí tepelného šoku, inkubovány nejprve 1 hodinu při 37 °C v S.O.C médiu (900 μ l média/ 100 μ l buněk) a potom na LB agaru při 37 °C 12-16 hodin. Vybrané kolonie byly přeneseny do LB média a inkubovány cca 7-8 hodin za třepání při 37 °C v objemu 1 ml. Poté byla zaočkována středněobjemová kultura a byla kultivována přes noc za třepání při 37 °C v 50 ml LB média.

Tato kultura byla zaočkována do velkoobjemové expresní kultury v poměru 1:100, tj. 5 ml kultury do 500 ml TB expresního média a byla kultivována 4-6 hodin při 37 °C a třepání 250 ot/min. Po této době kultura již dostatečně narostla pro zahájení exprese proteinů. Na každých 500 ml expresní kultury byly přidány následující roztoky sterilizované jako mix membránovou filtrací: 125 μ l roztoku TE, 0,5 ml 1 M roztoku thiaminu, 125 μ l 0,2 M FeCl₃, 0,5 ml 2,5 M (NH₄)₂SO₄, 0,5 ml 1 M MgCl₂. Na každých 500 ml expresní kultury bylo dále přidáno 0,5 ml 1 M sterilního IPTG a kultura byla inkubována 40 hodin při 32 °C a třepání 150 ot/min.

3.2.2 Izolace bakteriálních membrán

Po 40 hodinách byla velkoobjemová expresní kultura převedena do předvážených centrifugačních nádob (11) a odstředěna 10 min při 5000g a teplotě 4 °C. Nadále byl biologický materiál po celou dobu přípravy přechováván na ledu. Po odlití supernatantu byla zjištěna hmotnost buněk a bylo přidáno 15 ml vychlazeného roztoku 2x TES/g buněk. Za šetrného míchání bylo přidáno 50 mg čerstvě rozpuštěného lysozymu na 250 ml suspenze buněk a následně bylo pomalu přilito množství vychlazené vody rovnající se původnímu objemu 2x TES. Buňky byly inkubovány 30 min na ledu, odstředěny 10 min při 5000g a supernatant byl odstraněn. Sféroplasty v peletě byly šetrně resuspendovány v sonikačním pufru s čerstvě přidaným DTT (2 ml pufru/g původní hmotnosti buněk).

Do suspenze sféroplastů bylo na každých 50 ml přidáno 45 µl roztoku leupeptinu (1 mg/ml), 65 µl roztoku aprotininu (27 U/ml), 12 µl roztoku bestatinu (1 mg/ml) a 0,45 ml 100 mM PMSF. Suspenze byla sonikována třikrát po 20 s, během sonikace byla uchovávána na ledu se solí. Suspenze byla odstředěna 20 min při 10 000g, supernatant byl odebrán a odstředěn 90 min při 180 000g. Pelety byly resuspendovány v 50 mM KPi 7,4/ 20% glycerolu v polovičním objemu oproti původní suspenzi sféroplastů. Suspenze membrán byla uchovávána v 0,5 –1 ml alikvotech při –80°C.

Obsah cytochromu P450 byl stanoven spektrofotometricky [50] a aktivita CPR byla stanovena fotometrickým sledováním rychlosti redukce cytochromu c [12]. Ke stanovení

množství proteinu byl použit zkušební kit založený na reakci proteinu s BCA od firmy Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA.

3.3 Příprava jaterních mikrosomů miniprasat

Jaterní mikrosomy miniprasat (dále jen mikrosomy) byly připraveny podle [19]. Játra miniprasat byla homogenizována na ledu v KCl-Tris pufru a materiál byl dále uchováván na ledu. Homogenát byl odstředěn 20 min při 9000g a 4 °C. Poté byl odebrán supernatant bez horní vrstvy tuku (S9 frakce) a odstředěn 90 min při 105 000g. Peleta byla opatrně resuspendována, aby nedošlo k jejímu znečištění glykogenem (průhledná vrstva, která se peletuje jako první). K resuspendaci byl použit KCl-Tris pufr a suspenze byla opět odstředěna 60 min při 105 000g. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v 50 mM KPi 7,4/ 20 % glycerolu. Suspenze mikrosomů byla uchovávána v 0,5 – 1 ml alikvotech při –80°C. V průběhu zpracování této práce byly postupně ze stejné jaterní tkáně připraveny dva preparáty mikrosomů označené jako MP1 a MP2.

3.4 Stanovení destrukce cytochromů P450 a CPR v bakteriálních membránových systémech

3.4.1 Testování stability bakteriálních membrán při inkubaci s NADPH

Inkubační směs o celkovém objemu 2 ml pro testování stability bakteriálních membrán obsahovala vybrané membrány v množství 500 pmol P450 v 50 mM KPi pH 7,4 buď bez NADPH nebo s 0,1 mM či 0,5 mM NADPH. Směsi byly připravovány na ledu a reakce byly zahájeny přidáním požadovaného množství NADPH generujícího systému (NADPH-GS). U kontrolních vzorků neobsahujících NADPH byla inkubace zahájena přemístěním do inkubátoru o teplotě 37 °C. Vzorky byly inkubovány 60 min při 37 °C v uzavřených zkumavkách za třepání a za nepřístupu světla. Po skončení inkubace byl ve vzorcích okamžitě spektrofotometricky stanoven obsah P450 dle [50]. U membrán P450 2E1-CPR byla dále stanovena kinetika destrukce P450 (doba inkubace 0, 10, 30 a 60 min), u membrán P450 2C9-CPR byl stanovena závislost destrukce P450 na koncentraci NADPH při inkubaci 60 min (0, 0,1, 0,25, 0,5 nebo 1 mM NADPH-GS).

3.4.2 Stanovení destrukce P450 2C9 vlivem metabolitů benzenu

Inkubační směs o celkovém objemu 2 ml obsahovala membrány P450 2C9-CPR v množství odpovídajícím 250 pmol P450/ml, 50 mM KPi pH 7,4 a testovanou látku (čerstvě rozpuštěné BQ, HQ nebo C) v požadované koncentraci (0, 0,1, 0,5 nebo 1 mM) v přítomnosti či bez 0,5 mM NADPH přidaného jako NADPH-GS. Vzorky byly

inkubovány a dále zpracovány stejným způsobem jako bylo popsáno v předchozí kapitole.

3.4.3 Stanovení destrukce CPR vlivem NADPH a metabolitů benzenu

Inkubační směs o celkovém objemu 2 ml obsahovala membrány CPR v množství odpovídajícím 500 pmol CPR, 50 mM KPi pH 7,4 a testovanou látku (čerstvě rozpuštěné 0,5 mM BQ, HQ nebo C) v přítomnosti či bez 0,5 mM NADPH přidaného jako NADPH-GS. Vzorky byly inkubovány 60 min při 37 °C a okamžitě po skončení inkubace byla stanovena aktivita CPR podle [12].

3.5 Stanovení destrukce cytochromů P450 a vzniku oxidativního stresu

vlivem působení metabolitů benzenu v jaterních mikrosomech

miniprasat

3.5.1 Stanovení destrukce P450 vlivem působení NADPH a metabolitů benzenu v jaterních mikrosomech miniprasat

Inkubační směs pro testování vlivu NADPH o celkovém objemu 2 ml obsahovala mikrosomy MP1 v množství odpovídajícím 250 pmol P450/ml, 50 mM KPi pH 7,4 a 0, 0,1, 0,25, 0,5 nebo 1 mM NADPH přidaného jako NADPH-GS. Směs pro testování vlivu metabolitů benzenu obsahovala navíc testovanou látku (čerstvě rozpuštěné BQ, HQ nebo C) v požadované koncentraci (0, 0,1, 0,5 nebo 1 mM) v přítomnosti či absenci 0,5 mM NADPH. Reakce byly zahájeny přidáním požadovaného množství NADPH-GS. Ve vzorcích bez NADPH byly reakce zahájeny přemístěním do inkubátoru o teplotě 37 °C. Vzorky byly inkubovány 10, 30 nebo 60 min při 37 °C v uzavřených zkumavkách za třepání a za nepřístupu světla. Po skončení inkubace byl ve vzorcích okamžitě spektrofotometricky stanoven obsah P450 dle [50].

3.5.2 Stanovení vzájemných přeměn benzochinonu a hydrochinonu

Vzorky byly připraveny stejným způsobem jako pro stanovení destrukce P450 (kapitola 3.5.1.) v celkovém objemu 0,5 ml a inkubovány 10 nebo 60 min v temnu při 37 °C za třepání. Po extrakci do ethylacetátu byla změřena UV spektra a koncentrace

BQ a HQ byly stanoveny z kalibrační přímky sestavené podle absorpcí při vlnové délce absorpčního maxima (252 nm pro BQ a 295 nm pro HQ).

3.5.3 Stanovení aktivit cytochromů P450

Vzorky pro stanovení aktivit P450 a imunobloting byly připravovány v centrifugačních zkumavkách v celkovém objemu 1,5 ml a obsahovaly mikrosomy MP1 (250 pmol P450/ml), 50 mM KPi pH 7,4 a BQ nebo HQ v požadované koncentraci v přítomnosti nebo bez 0,5 mM NADPH přidaného jako NADPH-GS. Dále byly připraveny vzorky pro posouzení vlivu různých koncentrací NADPH (0, 0,1, 0,5 a 1 mM) bez obsahu testovaných metabolitů benzenu. Vzorky byly inkubovány 10 nebo 60 min při 37 °C za třepání a následně centrifugovány 60 min při 14 000g při 5 °C (podle [33]). Pelety obsahující mikrosomy byly resuspendovány v 50 mM KPi pH 7,4 a použity pro stanovení 6-hydroxylace CLZ podle [51]. Inkubační směs pro toto stanovení o celkovém objemu 0,25 ml obsahovala 0,5 mM CLZ, 50 mM KPi pH 7,4, 0,5 mM NADPH přidaného jako NADPH-GS a mikrosomy v množství odpovídajícím 50 pmol celkového P450/vzorek. Doba inkubace byla 30 min při 37 °C za třepání. Jako vnitřní standard byl použit fenacetin (2,5 nmol/vzorek), analýza byla provedena metodou HPLC s UV detekcí při vlnové délce 287 nm. Jako mobilní fáze byl použit 56 % roztok methanolu ve vodě (m/m) Koncentrace metabolitu byla spočtena z kalibrační přímky sestavené z hodnot naměřených u standardů 6-hydroxychlorzoxazonu (0, 125, 250, 500 a 1000 pmol/vzorek), které byly inkubovány a dále zpracovávány stejně jako ostatní vzorky.

6 β -hydroxylace TES byla stanovena podle [52] ve vzorcích popsaných v předchozím odstavci.. Inkubační směs pro toto stanovení o celkovém objemu 0,25 ml obsahovala 0,1 mM TES, 50 mM KPi pH 7,4, 0,5 mM NADPH přidaného jako NADPH-GS a mikrosomy v množství odpovídajícím 50 pmol celkového P450. Doba inkubace byla 30 min při 37 °C za třepání. Jako vnitřní standard byl použit fenacetin (2,5 nmol/vzorek), analýza byla provedena metodou HPLC s UV detekcí při vlnové délce 254 nm. Jako mobilní fáze byl použit 60 % roztok methanolu ve vodě (m/m). Koncentrace metabolitu byla vypočtena z kalibrační přímky sestavené z hodnot naměřených u standardů 6 β -hydroxytestosteronu (0, 500, 1000, 2000 a 4000 pmol/vzorek), které byly inkubovány a dále zpracovávány stejně jako ostatní vzorky.

K vyhodnocení výsledků HPLC analýz byl použit software Clarity v2.2 (Data Apex, Praha, ČR).

3.5.4 Elektroforéza a imunobloting

Elektroforéza mikrosomálních proteinů v SDS-polyakrylamidovém gelu byla provedena podle [53] ve vzorcích popsaných v prvním odstavci kapitoly 3.5.3. Pro separaci byl použit 10 % akrylamidový gel, vzorky byly nanášeny v množství 20 μ g proteinu/řádek. Imunobloting byl proveden podle [54] za použití purifikovaných lidských P450 2E1 a 3A4 (1 pmol/řádek) jako standardů. Jako blokovací roztok byla použita 3 % želatina v PBS, bloty byly dále inkubovány 2 h při 37 °C s primární protilátkou proti lidskému P450 2E1 nebo 3A4 (50 μ g IgG/10 ml PBS/Tween). Jako

sekundární protilátka byla použita IgG-HRP v ředění 1:1000 v PBS/Tween a byla inkubována s blotem 45 min při pokojové teplotě. V případě P450 2E byl k visualizaci použit barvicí roztok s 4-chloro-1-naftolem, u P450 3A byla použita chemiluminiscenční detekce (Supersignal West Pico chemiluminiscenční substrát, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA). Výsledky byly zaznamenány pomocí digitálního fotoaparátu a CDD kamery.

3.5.5 Stanovení tvorby hydroxylových radikálů pomocí elektronové spinové rezonance (ESR)

Inkubační směsi pro stanovení hydroxylových radikálů o celkovém objemu 300 μ l obsahovaly mikrosomy MP1 v množství odpovídajícím 250 pmol P450/ml, 50 mM KPi, NADPH-GS v požadované koncentraci, 400 mM DMPO a případně HQ nebo BQ v různých koncentracích. Vzorby byly inkubovány 10 min při 37 °C bez třepání v tmavých zkumavkách. Po skončení inkubace byl každý vzorek převeden do ploché kvyety z křemičitého skla a bylo změřeno jeho ESR spektrum. Spektrum bylo zaznamenáno jako první derivace a bylo tvořeno součtem 30 scanů s celkovým časem měření 5 min. Nastavení pro měření bylo následující: mikrovlnná frekvence, 9,76 GHz; střed měřeného pole, 3480 G; rozsah měřeného pole, 200 G; rozlišení, 1024 bodů; časová konstanta, 1,28 ms; modulační frekvence, 100 kHz; modulační amplituda, 1 G; nastavení zesílení přijímače, 60 dB; konverzní čas, 10,24 ms; mikrovlnný výkon, 2 mW. Pro kvantifikaci naměřeného spektra byla hodnota jeho druhého integrálu porovnána s hodnotou druhého integrálu spektra roztoku stabilního radikálu TEMPOLu získaného

za identických podmínek v den měření. Integrace ESR spekter byla prováděna pomocí softwaru Microcal Origin, version 3.5 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA, USA). Koncentrace hydroxylových radikálů potom byla vypočtena z kalibrační přímky, přičemž přesná koncentrace roztoku TEMPOLu byla stanovena spektrofotometricky podle doporučení firmy Bruker BioSpin GmbH.

3.6 Destrukce cytochromů P450 a vznik oxidativního stresu vlivem

působení doxorubicinu v jaterních mikrosomech miniprasat, ovlivnění toxicity fenolickými antioxidanty

3.6.1 Stanovení destrukce P450 vlivem působení doxorubicinu v jaterních mikrosomech miniprasat

Inkubační směs o celkovém objemu 2 ml obsahovala mikrosomy MP2 v množství odpovídajícím 0,5 mg proteinu/ml, 50 mM KPi pH 7,4 a DOX v různých koncentracích (0, 5, 10, 15, 30, 50 μ M) v přítomnosti nebo bez 0,5 mM NADPH přidaného jako NADPH-GS. Vzorky byly inkubovány 60 min při 37 °C a dále zpracovány jak bylo popsáno v kapitole 3.5.1.

3.6.2 Stanovení aktivit a množství proteinu cytochromů P450

Vzorky pro stanovení aktivit P450 a imunobloting o celkovém objemu 1,5 ml obsahovaly mikrosomy MP2 v množství odpovídajícím 0,5 mg proteinu/ml, 50 mM KPi pH 7,4, DOX v různých koncentracích (0, 5, 15, 30, 50 μ M) v přítomnosti nebo bez 0,5 mM NADPH přidaného jako NADPH-GS. Stanovení 6-hydroxylace CLZ, 6 β -hydroxylace TES, elektroforéza a imunobloting pak byly provedeny stejným způsobem jako ve vzorcích s metabolity benzenu (kapitoly 3.5.5 a 3.5.6).

3.6.3 Stanovení tvorby semichinonu doxorubicinu a superoxidových radikálů pomocí

ESR

Inkubační směsi pro stanovení semichinonu DOX o celkovém objemu 300 μ l obsahovaly bakteriální membrány obsahující CPR v množství odpovídajícím 100 nebo 300 pmol CPR/ml nebo mikrosomy MP2 v množství odpovídajícím 0,5 mg proteinu/ml, 50 mM KPi, DOX v různých koncentracích (0, 30, 100, 300 μ M) a 1 mM NADPH přidané jako NADPH-GS. Jednotlivé roztoky i inkubační směs byly probublány argonem a inkubovány za nepřístupu světla a vzduchu 10 min při 37 °C. Po skončení inkubace byl každý vzorek převeden pomocí injekční stříkačky za nepřístupu vzduchu do ploché kyvety pro ESR, ze které byl předem rovněž pomocí argonu odstraněn vzduch. ESR spektrum bylo zaznamenáno jako první derivace a bylo tvořeno součtem 30 scanů s celkovým časem měření 10 min. Nastavení pro měření bylo následující: mikrovlnná frekvence, 9,76 GHz; střed měřeného pole, 3480 G; rozsah měřeného pole, 200 G; rozlišení, 1024 bodů; časová konstanta, 1,28 ms; modulační frekvence, 100 kHz; modulační amplituda, 1 G; nastavení zesílení přijímače, 60 dB; konverzní čas, 20,48 ms; mikrovlnný výkon, 25 mW.

Inkubační směsi pro stanovení superoxidových radikálů o celkovém objemu 300 μ l obsahovaly bakteriální membrány s CPR v množství odpovídajícím 100 pmol CPR/ml, 50 mM KPi, 400 mM DMPO, DOX v různých koncentracích (0, 30, 50 μ M) a 0,5 mM NADPH přidané jako NADPH-GS. Vzorky byly inkubovány a měřeny stejným způsobem jako bylo popsáno v kapitole 3.5.4 s výjimkou nastavení mikrovlnného výkonu, který byl 25 mW.

3.6.4 Stanovení tvorby hydroxylových radikálů pomocí ESR

Inkubační směsi pro stanovení hydroxylových radikálů o celkovém objemu 300 μ l obsahovaly mikrosomy MP2 v množství odpovídajícím 0,5 mg proteinu/ml, 50 mM KPi, 400 mM DMPO, DOX v různých koncentracích (0, 5, 10, 15, 30, 50 μ M) a 0,5 mM NADPH přidané jako NADPH-GS. Vzorky byly inkubovány a měřeny stejným způsobem jako při stanovení superoxidových radikálů (kapitola 3.6.2).

Vliv polyfenolických antioxidantů kvercetinu, myricetinu, fisetinu, morinu, kaempferolu, eriodictyolu a syntetického 4-hydroxy-6-methoxyauronu na tvorbu hydroxylových radikálů vlivem DOX byl stanovován ve vzorcích s 30 μ M DOX. Testované látky (30, 50 a 100 μ M) byly přidávány jako methanolické roztoky, přičemž koncentrace methanolu ve vzorku nepřesáhla 1 %. Do kontrolních vzorků byl přidán místo roztoku antioxidantu pouze methanol.

3.7 Statistické zpracování dat

Všechny výsledky kromě stanovení ESR jsou vyjádřeny jako průměr tří měření \pm směrodatná odchylka, která byla vypočítána v softwaru Microsoft Excel. Výsledky měření ESR jsou vyjádřeny jako průměr šesti měření \pm směrodatná odchylka. K analýze statistických rozdílů mezi skupinami byl použit oboustranný Studentův t-test a k analýze významnosti koncentračních a časových závislostí byl použit statistický test ANOVA.

Kapitola 4

Výsledky

4.1 Příprava membránových systémů obsahujících lidské rekombinantní cytochromy P450 a jaterních mikrosomů miniprasat

Pro plánované experimenty byly připraveny dva typy biologických preparátů:

- 1) bakteriální membrány *E. coli* s vysokým obsahem CPR a vybraných lidských P450, které byly řízeně exprimovány pomocí bicistronických vektorů a
- 2) jaterní mikrosomy z pokusných miniprasat.

Obsah P450, CPR a celkový obsah proteinu ve výsledných preparátech bakteriálních membrán a dvou preparátech jaterních mikrosomů miniprasat označených jako MP1 a MP2 jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab.1 Výsledky preparací bakteriálních membrán a jaterních mikrosomů miniprasat

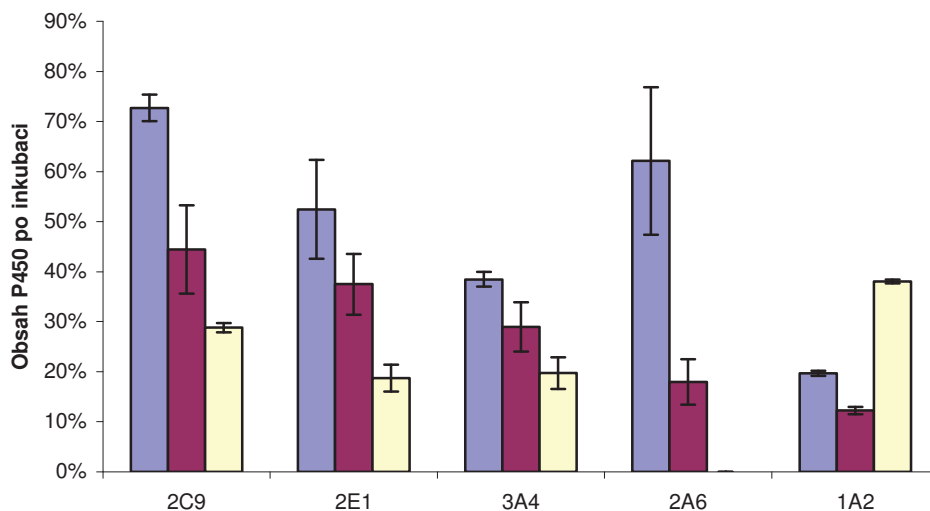
Exprimované enzymy	Obsah P450 [nmol/ml]	Obsah CPR [nmol/ml]	Obsah proteinu [mg/ml]	nmol P450/mg proteinu	Poměr P450:CPR
1A2-CPR	6,83	0,37	24,41	0,28	18,42
2A6-CPR	2,12	2,81	20,50	0,10	0,75
2C9-CPR	2,76	3,36	18,22	0,15	0,82
2E1-CPR	12,81	4,09	50,40	0,25	3,13
3A4-CPR	3,08	0,67	30,73	0,10	4,60
CPR		5,36	16,61		
Mikrosomy MP1	12,60	0,42	17,62	0,72	30,13
Mikrosomy MP2	7,85	0,27	25,71	0,31	29,41

4.2 Stanovení destrukce cytochromů P450 v bakteriálních membránových systémech

4.2.1 Testování stability bakteriálních membrán při inkubaci s NADPH

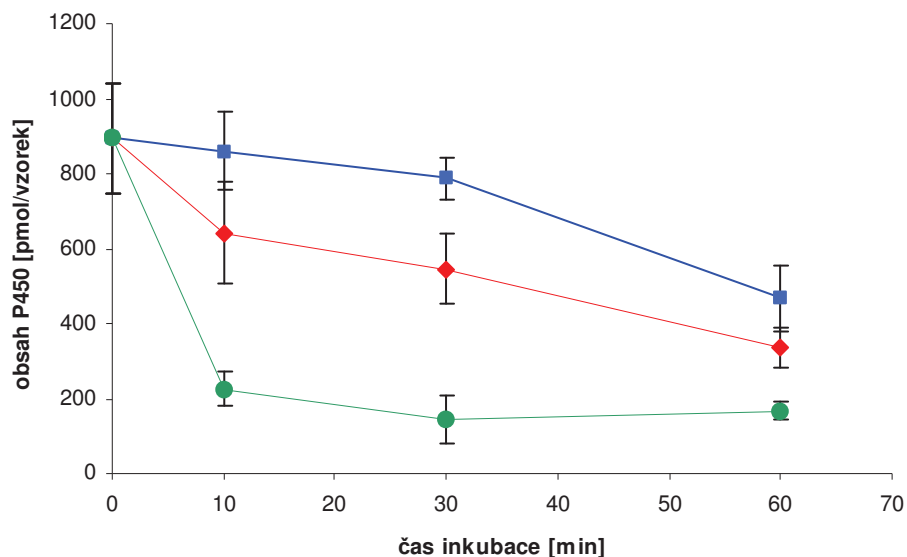
Před použitím bakteriálních membrán jako modelového systému v plánovaných experimentech pro studium interakcí xenobiotik s lidskými P450 byla testována jejich integrita a stabilita při inkubaci.

Stabilita lidských P450 1A2, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4 exprimovaných společně s CPR v bakteriálních membránách byla hodnocena po šedesátiminutové inkubaci bez NADPH anebo v přítomnosti 0,1 mM nebo 0,5 mM NADPH P450 (Obr. 7). Jednotlivé P450 se svou stabilitou za těchto podmínek velmi lišily. Při inkubaci bez NADPH byl



Obr. 7 Stabilita lidských P450 v bakteriálních membránách při inkubaci s NADPH

Membrány obsahující P450 a CPR byly inkubovány 60 min bez NADPH (■), s 0,1 mM NADPH (■) nebo s 0,5 mM NADPH (■). Obsah P450 po inkubaci je vyjádřen jako podíl vůči obsahu P450 ve vzorku bez inkubace.



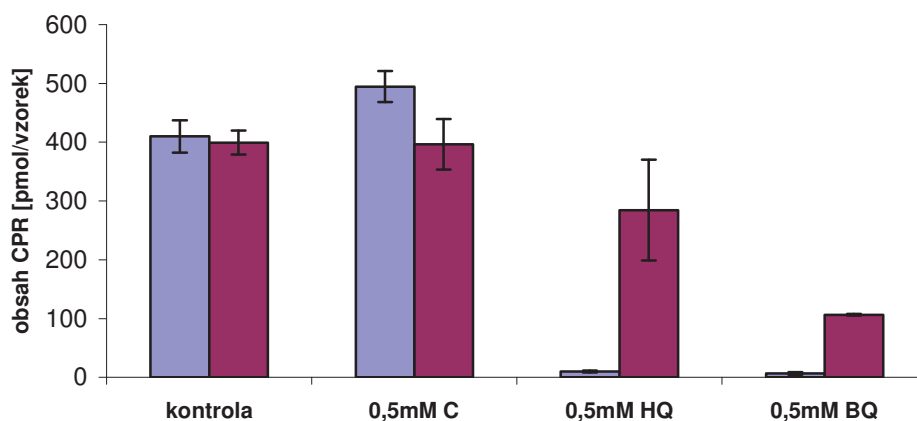
Obr. 8 Kinetika destrukce lidského P450 2E1 v bakteriálních membránách vlivem NADPH

Membrány obsahující P450 2E1-CPR byly inkubovány 10, 30 nebo 60 min bez NADPH (■), s 0,1 mM NADPH (◆) nebo s 0,5 mM NADPH (●).

nejstabilnější P450 2C9 a ostatní testované enzymy následovaly v pořadí 2A6>2E1>3A4>1A2. Při inkubaci s 0,1 mM NADPH byl nejstabilnější z testovaných enzymů opět P450 2C9. Přítomnost 0,5 mM NADPH, což je koncentrace běžně používaná v pokusech *in vitro*, však již u všech testovaných enzymů způsobila degradaci více než 60 % P450. Vliv NADPH byl nejvýraznější u P450 2A6, kde po inkubaci s 0,5 mM NADPH již nebyl nativní enzym detekován vůbec.

Dále byl stanoven časový průběh destrukce P450 2E1 vlivem NADPH (Obr. 8), neboť tento P450 hraje důležitou roli v aktivaci benzenu a membrány P450 2E1-CPR tak byly nejzajímavějším modelem pro další studium interakcí s jeho metabolity. Destrukce P450 2E1 byla koncentračně i časově závislá, 0,5 mM NADPH způsobovalo statisticky významnou destrukci P450 ($P=0,017$) již po 10 min inkubace.

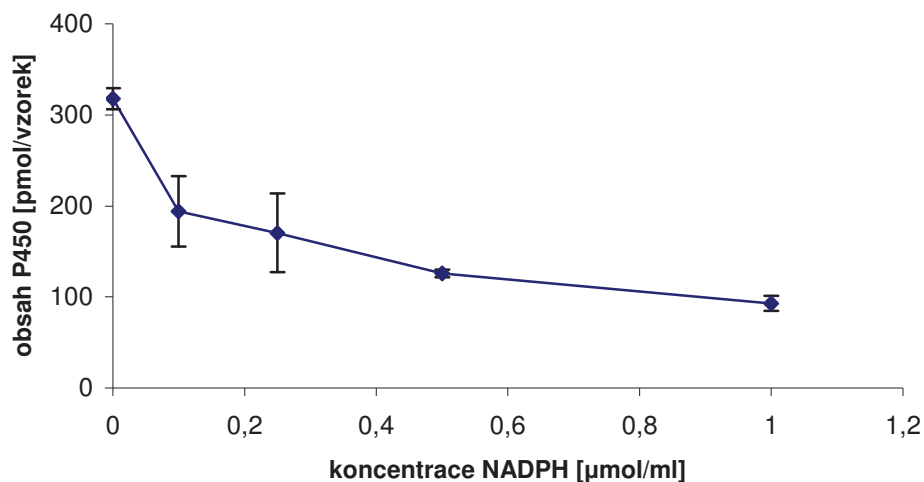
Lidská CPR v bakteriálních membránách bez exprese P450 (monocistronický vektor) byla při inkubaci s 0,5 mM NADPH stabilní (Obr. 9).



Obr. 9 Stabilita lidské CPR v bakteriálních membránách při inkubaci s NADPH a metabolity benzenu

Membrány obsahující CPR byly inkubovány 60 min bez NADPH (■) nebo s 0,5 mM NADPH (■) s přidávkem metabolitů benzenu tak, jak je uvedeno v grafu

Koncentrační závislost destrukce P450 v nejstabilnějším systému P450 2C9-CPR na koncentraci NADPH při inkubaci 60 min je zobrazena na Obr. 10. Statisticky významnou destrukci P450 2C9 způsobila již nejnižší použitá koncentrace NADPH, tj. 0,1 mM ($P=0,0018$).



Obr. 10 Destrukce lidského P450 2C9 v bakteriálních membránách vlivem NADPH

Membrány obsahující P450 2C9-CPR byly inkubovány 60 min bez NADPH a s 0,1 , 0,25, 0,5 nebo 1 mM NADPH.

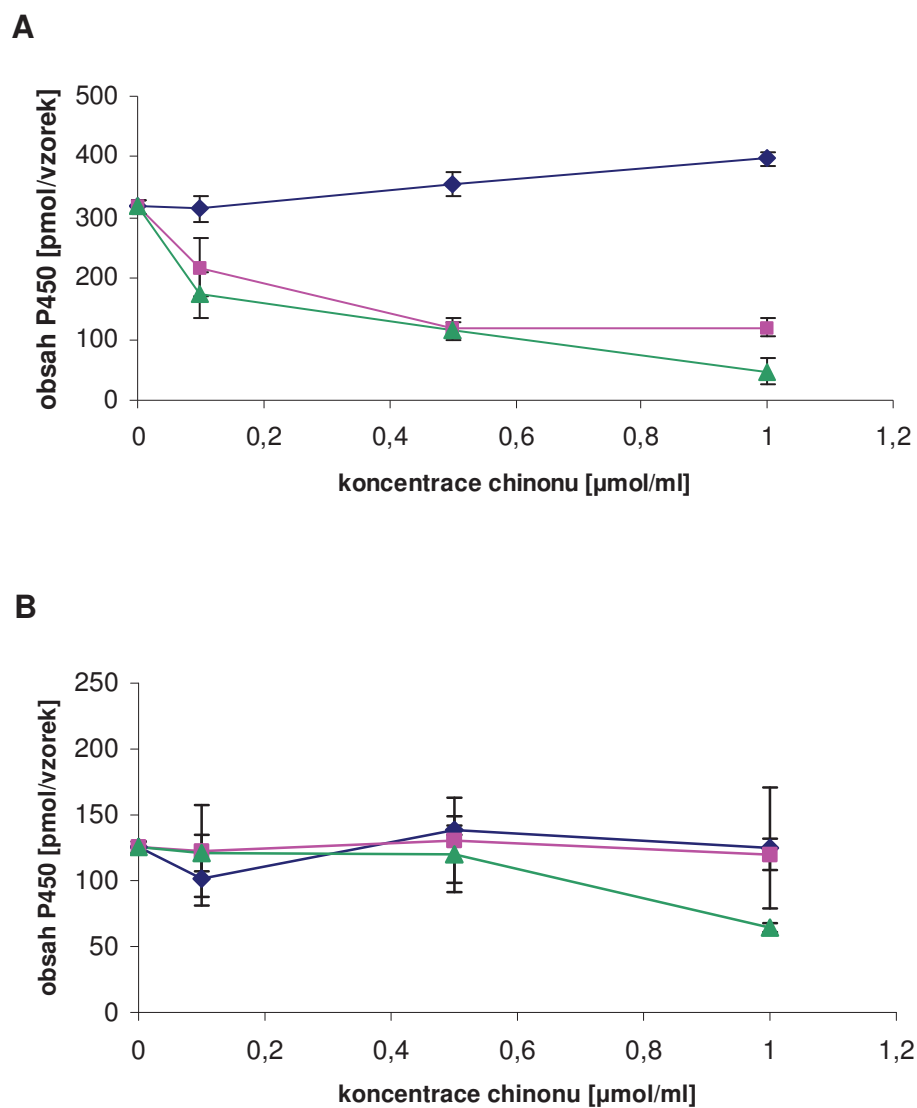
4.2.2 Destrukce P450 2C9 vlivem metabolitů benzenu

Nejstabilnější bakteriální systém – P450 2C9-CPR - byl použit ke sledování vlivu metabolitů benzenu na obsah P450 2C9.

HQ i BQ v nepřítomnosti NADPH (Obr. 11A) způsobovaly statisticky významnou destrukci P450 2C9 již v nejnižší testované koncentraci, tj. 0,1 mM ($P=0,0025$ pro BQ, $P=0,0083$ pro HQ), C neměl negativní účinek na obsah P450 2C9. V přítomnosti 0,5 mM NADPH (Obr. 11B) se účinek C, HQ a BQ neprojevil tak výrazně. Významnou destrukci způsobil pouze 1 mM BQ ($P=0,004$). Celkově tedy nebylo možné příspěvek metabolitů benzenu k destrukci P450 2C9 odlišit od účinků samotného NADPH.

4.2.3 Destrukce CPR vlivem metabolitů benzenu

Inkubace membrán obsahujících CPR bez P450 s C neukázala významný účinek C na aktivitu CPR (Obr. 9). HQ i BQ v nepřítomnosti NADPH poškodily CPR mnohem výrazněji než P450 v systému P450 2C9-CPR (Obr. 11). Při inkubaci s 0,5 mM NADPH byl destruktivní účinek na CPR větší u BQ než u HQ (Obr. 9). Tato destrukce, na rozdíl od P450, byla významně vyšší než destrukce samotným NADPH, jehož přítomnost CPR prakticky nepoškodila.



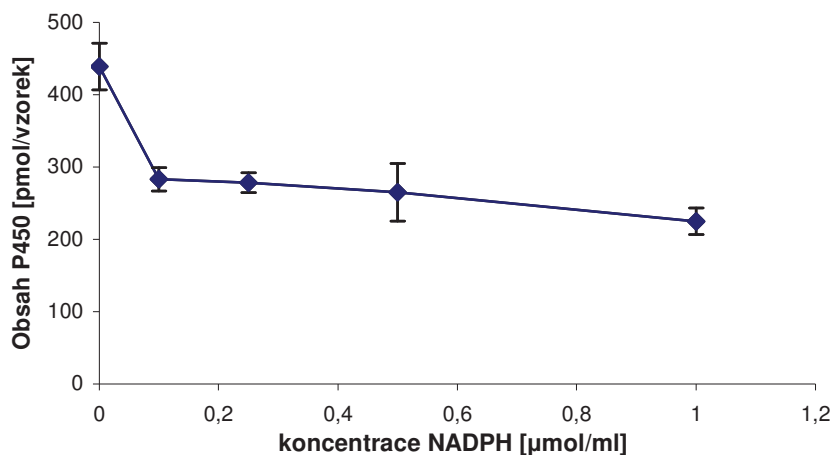
Obr. 11 Destrukce lidského P450 2C9 v bakteriálních membránách vlivem metabolitů benzenu
 Membrány obsahující P450 2C9-CPR byly inkubovány 60 min s C (\diamond), HQ (\blacksquare) nebo BQ (\blacktriangle) v nepřítomnosti NADPH (A) nebo s 0,5 mM NADPH (B).

4.3 Stanovení destrukce cytochromů P450 a vzniku oxidativního stresu vlivem působení metabolitů benzenu v jaterních mikrosomech miniprasat

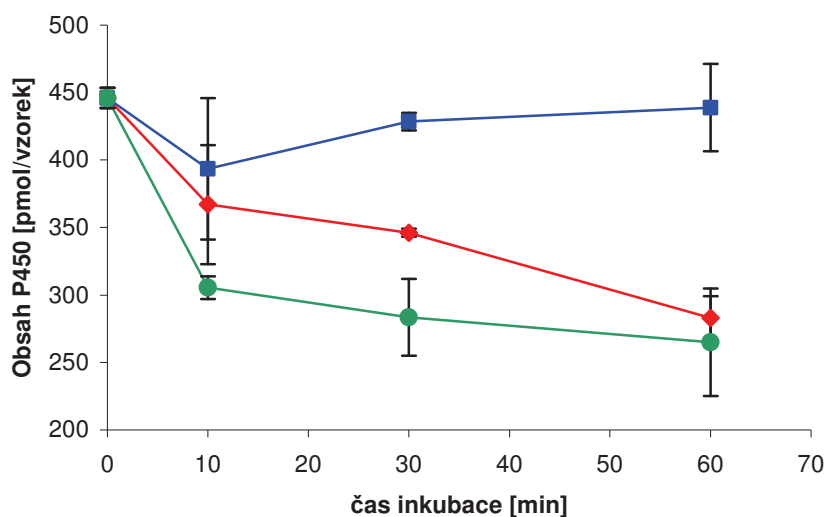
Pro přímé porovnání výsledků experimentů v bakteriálních systémech se situací v jaterních mikrosomech a následné studium oxidativního stresu byly vybrány preparáty mikrosomů z jater pokusných miniprasat, které obsahují P450 s vlastnostmi podobnými lidským P450.

4.3.1 Destrukce P450 vlivem působení NADPH a metabolitů benzenu v jaterních mikrosomech miniprasat

NADPH způsobovalo statisticky významnou destrukci P450 po 60 min inkubace již v nejnižší použité koncentraci, tj. 0,1 mM (Obr. 12, $P < 0,001$). 0,5 mM NADPH potom



Obr. 12 Destrukce P450 v miniprasečích mikrosomech MP1 vlivem NADPH
Mikrosomy MP1 byly inkubovány 60 min bez NADPH a s 0,1 , 0,25, 0,5 nebo 1 mM NADPH



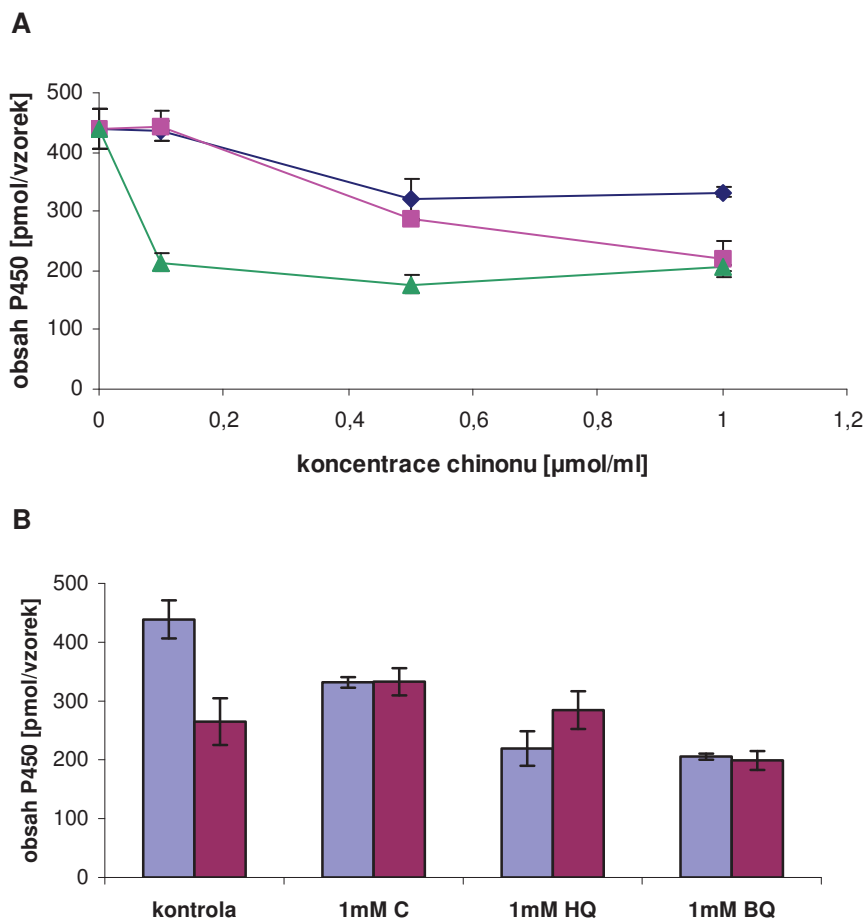
Obr. 13 Kinetika destrukce P450 v miniprasecích mikrosomech MP1 vlivem NADPH

Mikrosomy MP1 byly inkubovány 10, 30 nebo 60 min bez NADPH (■), s 0,1 mM NADPH (◆) nebo s 0,5 mM NADPH (●).

způsobilo významnou destrukci P450 již po 10 min inkubace (Obr. 13, $P=0,048$).

Z Obr. 13 je patrné, že časový průběh destrukce se pro 0,1 mM a 0,5 mM NADPH lišil, ale po 60 min inkubace již nebyl mezi těmito dvěma koncentracemi významný rozdíl.

Srovnání destrukčního působení HQ, BQ a C ukazuje, že v inkubacích bez NADPH byl nejúčinnější BQ (Obr. 14A), přičemž rozdíl byl nejvýraznější při nízkých koncentracích. HQ působil destrukci P450 v závislosti na koncentraci, zatímco nejmenší poškození způsoboval C. V přítomnosti NADPH nebyl účinek testovaných látek významný ve srovnání s účinkem samotného NADPH, ale byla pozorována významně větší destrukce vlivem BQ oproti HQ ($P=0,043$, Obr. 14B).



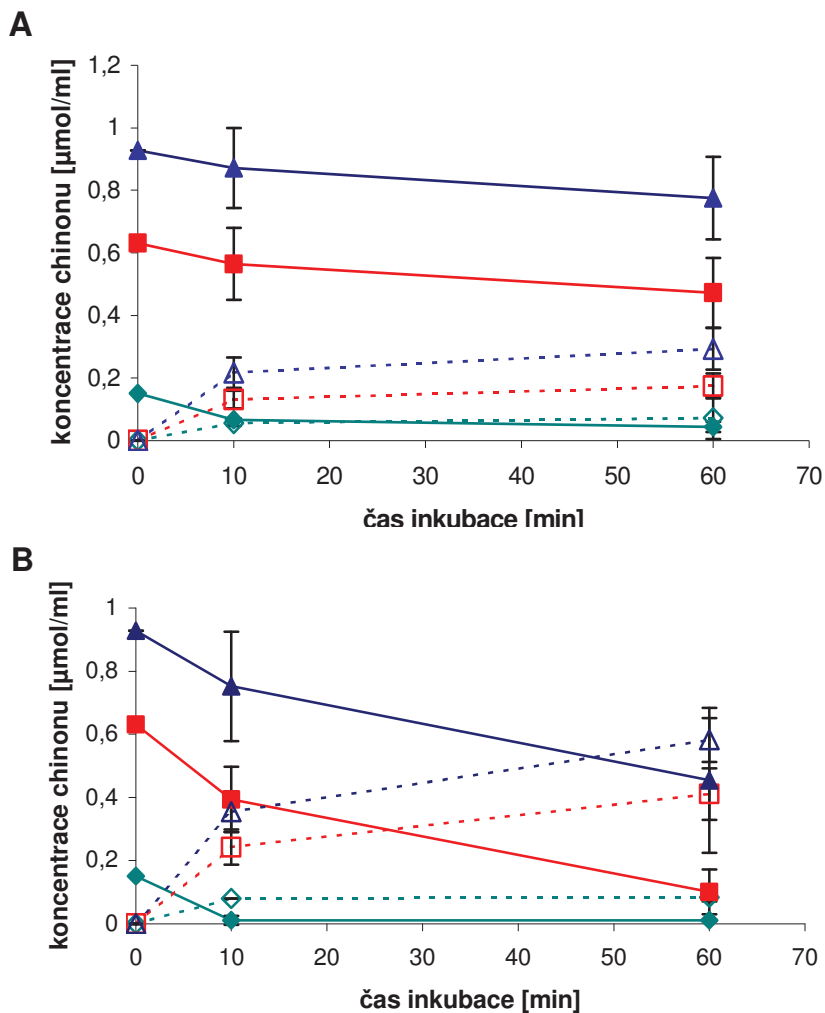
Obr. 14 Destrukce P450 v miniprasečích mikrosomech MP1 vlivem metabolitů benzenu
 (A) Mikrosomy MP1 byly inkubovány 60 min s C (♦), HQ (■) nebo BQ (▲) v nepřítomnosti NADPH.
 (B) Mikrosomy MP1 byly inkubovány 60 min s 1 mM C, HQ nebo BQ v nepřítomnosti (■) nebo přítomnosti (■) 0,5 mM NADPH.

4.3.2 Vzájemné přeměny benzochinonu a hydrochinonu v inkubacích s jaterními mikrosomy miniprasat

Za účelem studia možných mechanismů destrukce P450 metabolity benzenu bylo provedeno sledování vzájemných přeměn BQ a HQ v prostředí mikrosomů MP1 bez i za přítomnosti NADPH.

V inkubacích s BQ přítomnost NADPH velmi podporovala jeho redukci na HQ, redukce však v menší míře probíhala i v nepřítomnosti NADPH (Obr. 15). Koncentrace HQ ve vzorcích bez NADPH dosáhla po 60 min inkubace maximálně 30 % počáteční koncentrace BQ, zatímco v přítomnosti NADPH množství BQ přeměněného na HQ přesáhlo 50 % původního obsahu BQ ve všech sledovaných koncentracích (v nejnižší 0,1 mM dokonce bylo 80 % BQ zredukováno na HQ už po 10 min inkubace).

V inkubacích s HQ se přeměnilo na BQ maximálně 5-10 % původně inkubovaného HQ (výsledky nezobrazeny).



Obr. 15 Vzájemné přeměny BQ a HQ během inkubace s mikrosomy MP1 0,1 mM (◆), 0,5 mM (■) nebo 1 mM BQ (▲) byl inkubován s mikrosomy MP1 za nepřítomnosti (A) nebo v přítomnosti (B) 0,5 mM NADPH. Plné symboly zobrazují koncentraci BQ a prázdné symboly zobrazují koncentraci HQ.

4.3.3 Vliv NADPH, hydrochinonu a benzochinonu na aktivity P450 2E a 3A v jaterních mikrosomech miniprasat

Studium mechanismu destrukce P450 vlivem metabolitů benzenu dále pokračovalo analýzami poškození enzymatické aktivity a apoproteinů dvou P450, které mají u miniprasat velmi podobné hladiny a aktivity jako u lidí.

Přítomnost NADPH v koncentracích od 0,1 do 1 mM neovlivňovala enzymatickou aktivitu P450 2E stanovenou jako 6-hydroxylaci CLZ ani P450 3A stanovenou jako 6 β -hydroxylaci TES (výsledky nezobrazeny).

Jelikož C v předchozích pokusech nepůsobil významnou destrukci P450, vliv na aktivity P450 byl sledován pouze u HQ a BQ. Vliv těchto látek na aktivity P450 2E a 3A je shrnut v Tab. 2.

Inkubace s BQ ukázaly, že aktivita P450 2E byla vůči jeho působení výrazně citlivější než aktivita P450 3A. Aktivita P450 2E, na rozdíl od P450 3A, významně klesla již po 10 min inkubace s nejnižší koncentrací (0,1 mM) BQ bez NADPH. Na destrukci významného podílu aktivity P450 3A za stejných podmínek bylo zapotřebí 60 min inkubace s BQ. V přítomnosti NADPH sice aktivita P450 3A klesala v závislosti na koncentraci BQ již po 10 min inkubaci, ale pouze nejvyšší použitá koncentrace BQ (1 mM) snížila aktivitu P450 3A srovnatelně se snížením aktivity P450 2E. Celkově lze konstatovat, že aktivita P450 2E byla poškozována velmi rychle již nejnižšími koncentracemi BQ bez ohledu na přítomnost NADPH. Jedinou výjimkou byla aktivita

Tab.2 Aktivity P450 2E a 3A v mikrosomech MP1 po inkubaci s benzochinonem a hydrochinonem

		Koncentrace chinonu	Aktivita P450 2E [pmol/min/nmol P450]		Aktivita P450 3A [pmol/min/nmol P450]	
			10 min	60 min	10 min	60 min
BQ	Bez NADPH	0.1 mM	190 ± 3 *	163 ± 167 *	588 ± 165	87 ± 8 *
		0.5 mM	67 ± 1 *	57 ± 2 *	652 ± 15	116 ± 8 *
		1 mM	160 ± 3 *	16 ± 12 *	759 ± 193	104 ± 2 *
	0.5mM NADPH	0.1 mM	119 ± 45 *	473 ± 124	672 ± 33	137 ± 2 *
		0.5 mM	179 ± 152 *	87 ± 17 *	385 ± 152	167 ± 49 *
		1 mM	128 ± 96 *	136 ± 27 *	217 ± 83 *	189 ± 25 *
HQ	Bez NADPH	0.1 mM	705 ± 71 *	919 ± 89	572 ± 127	730 ± 72
		0.5 mM	688 ± 98 *	49 ± 87 *	548 ± 50	542 ± 135
		1 mM	307 ± 169 *	152 ± 96 *	391 ± 133 *	428 ± 77 *
	0.5mM NADPH	0.1 mM	621 ± 120 *	977 ± 293	487 ± 107	312 ± 110 *
		0.5 mM	615 ± 199 *	714 ± 102 *	449 ± 50 *	243 ± 130 *
		1 mM	650 ± 200	725 ± 27 *	431 ± 117	177 ± 91 *
Neinkubované mikrosomy			974 ± 57		633 ± 23	

Hodnoty, které se statisticky významně liší od hodnoty neinkubovaných mikrosomů, jsou označeny hvězdičkami

P450 2E po 60 min inkubace s 0,1 mM BQ za přítomnosti NADPH, která byla vyšší oproti 10 min inkubaci.

HQ v inkubacích bez NADPH ovlivňoval aktivitu P450 2E v závislosti na koncentraci, zatímco aktivita P450 3A zůstala po 60 min inkubace s HQ v koncentracích do 0,5 mM stabilní. V přítomnosti NADPH byla aktivita P450 2E méně ovlivněna než v jeho nepřítomnosti, zatímco aktivita P450 3A byla naopak výrazněji ovlivněna HQ za přítomnosti NADPH. Bez NADPH pouze nejvyšší použitá koncentrace HQ (1 mM) způsobila významné snížení aktivity P450 3A ($P=0,012$), zatímco v přítomnosti NADPH aktivita P450 3A klesala vlivem HQ rychleji a bez závislosti na koncentraci.

4.3.4 Vliv NADPH, hydrochinonu a benzochinonu na obsah proteinu P450 2E a 3A v jaterních mikrosomech miniprasat

Množství P450 2E apoproteinů stanovené pomocí imunoblotingu bylo sníženo ve vzorcích inkubovaných s BQ bez NADPH (Obr. 16). NADPH ani HQ obsah P450 2E významně neovlivnily.

Množství P450 3A apoproteinů bylo rovněž nejvíce sníženo v inkubacích s BQ a to v závislosti na koncentraci BQ. NADPH ani HQ obsah P450 3A významně neovlivnily.

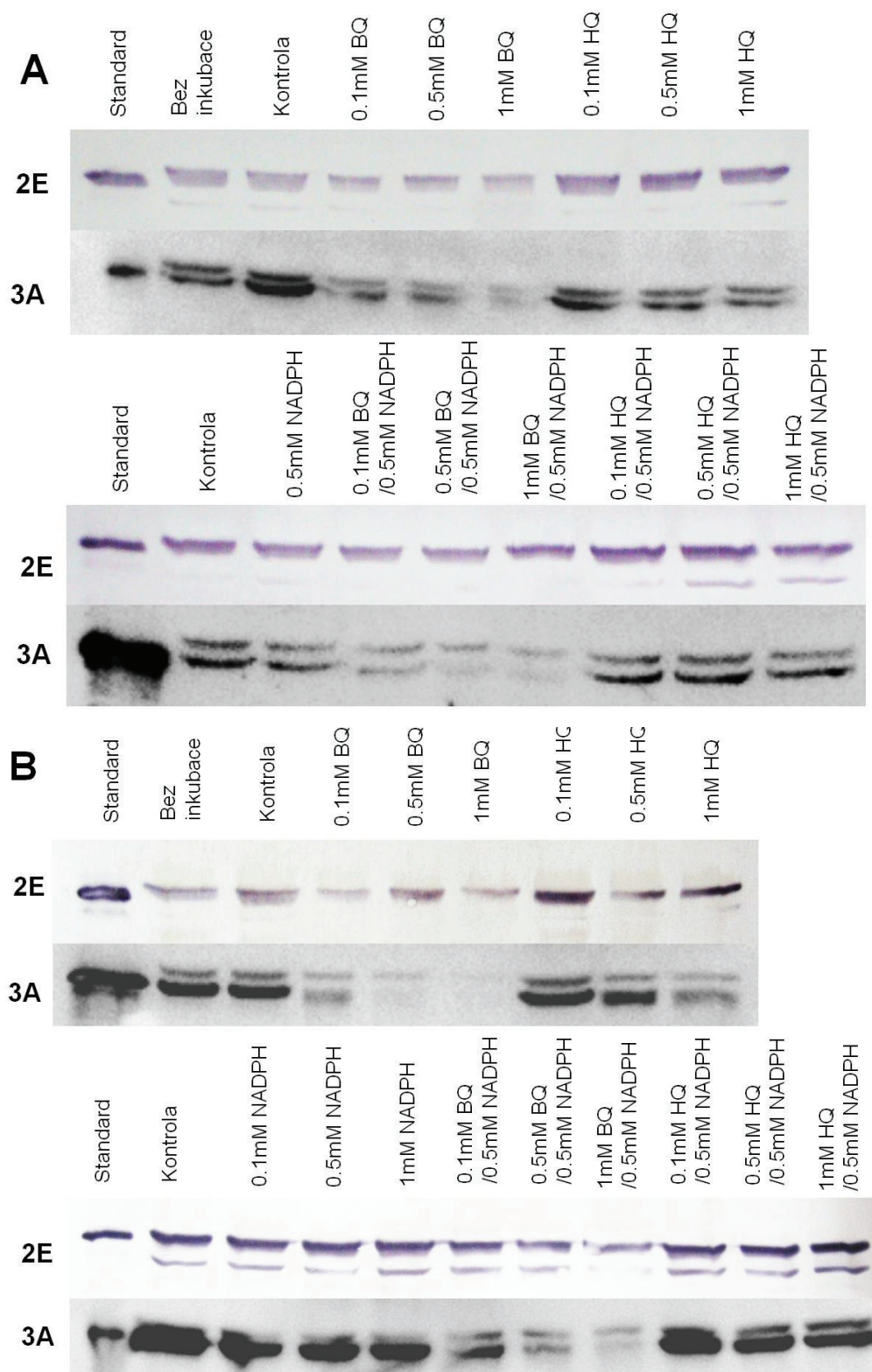
4.3.5 Produkce hydroxylových radikálů vlivem působení NADPH, katecholu, benzochinonu a hydrochinonu v jaterních mikrosomech miniprasat

Jako další možný mechanismus destrukce P450 byl sledován vznik hydroxylových radikálů během inkubace mikrosomálních preparátů s metabolity benzenu.

Na Obr. 17 je zobrazeno typické spektrum ESR zaznamenané po inkubaci mikrosomů MP1 s NADPH (A), HQ s NADPH (B) a BQ s NADPH (C). Kvartetová soustava signálů se středem na $g=2,0041$, poměrem intenzit 1:2:2:1 a štěpící konstantou $a_N=a_H=14,71$ G odpovídá aduktu hydroxylových radikálů s DMPO (DMPO- \cdot OH) [55]. Dále byl pozorován triplet se středem na $g=2,0042$ s poměrem intenzit 1:1:1 a štěpící konstantou $a_N=14,88$ G a šestičarové spektrum se středem na $g=2,0039$ s poměrem intenzit 1:1:1:1:1:1 a štěpícími konstantami $a_N=15,85$ G a $a_H=22,37$ G (Obr. 16 B a C). Tripletový signál může být připisován nitroxidovému radikálu vzniklému z DMPO po ataku neznámým radikálem. Šestičarové spektrum pravděpodobně patřilo alkylovým

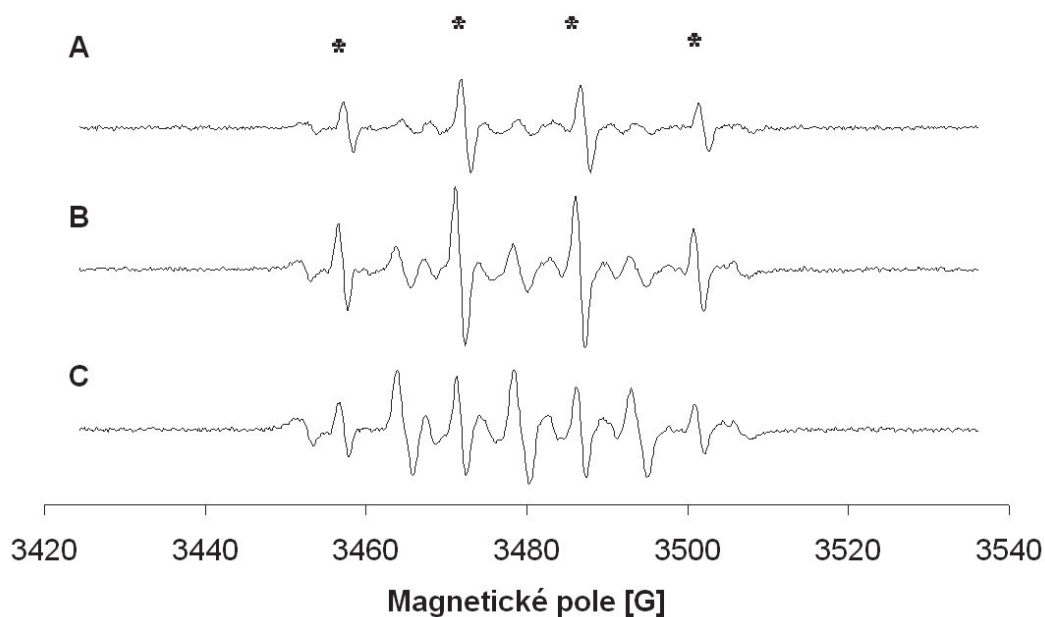
nebo alkoxylovým radikálům (DMPO- \cdot R/ \cdot OR), které mohou být tvořeny z malých fragmentů proteinů nebo aminokyselin [56].

Při inkubaci pouze s NADPH byla pozorována tvorba hydroxylových radikálů v závislosti na koncentraci NADPH (Obr. 18, $P < 0,001$). HQ stimuloval produkci hydroxylových radikálů v přítomnosti i nepřítomnosti NADPH (Obr. 19A, B) a byl jedinou testovanou látkou, která měla významný účinek ($P = 0,034$ pro 1 mM HQ). BQ v přítomnosti NADPH neměl statisticky významný vliv na tvorbu hydroxylových radikálů, i když bylo možné pozorovat mírnou stimulaci u 0,1 mM BQ a naopak inhibici při vyšších koncentracích (Obr. 19B). C nezvyšoval produkci hydroxylových radikálů nad úroveň samotného 0,5 mM NADPH. 1 mM C vykazoval obrácený efekt než samotné NADPH, tvorba hydroxylových radikálů byla totiž vyšší v nepřítomnosti než v přítomnosti NADPH (Obr. 19A, B).

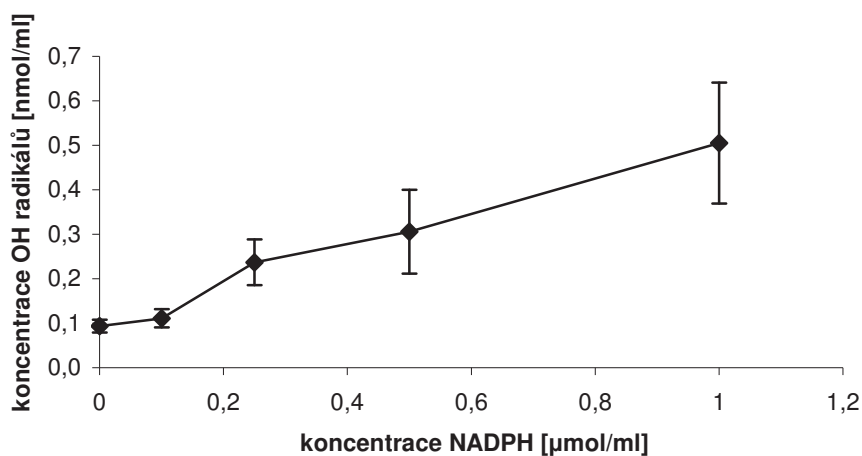


Obr. 16 Obsah proteinu P450 2E a P450 3A stanovený pomocí imunoblottingu v miniprasečích mikrosomech MP1

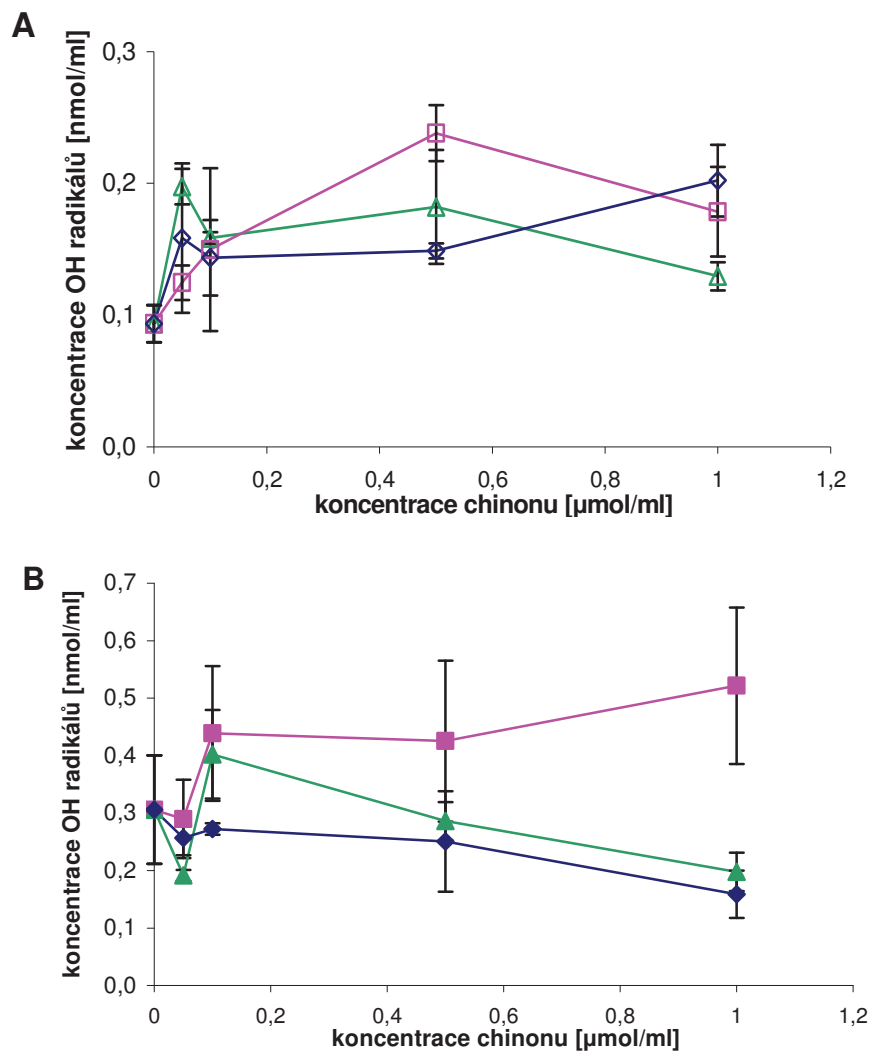
Vzorky byly připraveny a zpracovány metodou popsanou v kapitole 3.5.4. Inkubace s HQ a BQ probíhala za nepřítomnosti či v přítomnosti NADPH po dobu 10 min (A) nebo 60 min (B).



Obr. 17 Typická spektra ESR naměřená po inkubaci mikrosomů miniprasečích MP1 s NADPH a metabolity benzenu v přítomnosti DMPO
 Mikrosomy MP1 byly inkubovány s 1 mM NADPH (A), 0,5 mM HQ a 0,5 mM NADPH (B) nebo s 0,5 mM BQ a 0,5 mM NADPH (C) v přítomnosti 400 mM DMPO. Signály hydroxylových radikálů jsou označeny hvězdičkami.



Obr. 18 Tvorba hydroxylových radikálů v miniprasečích mikrosomech MP1 vlivem NADPH
 Mikrosomy MP1 byly inkubovány s 0, 0,1, 0,25, 0,5 a 1 mM NADPH jak bylo popsáno v kapitole 3.5.5.



Obr. 19 Tvorba hydroxylových radikálů v miniprasečích mikrosomech MP1 vlivem metabolitů benzenu

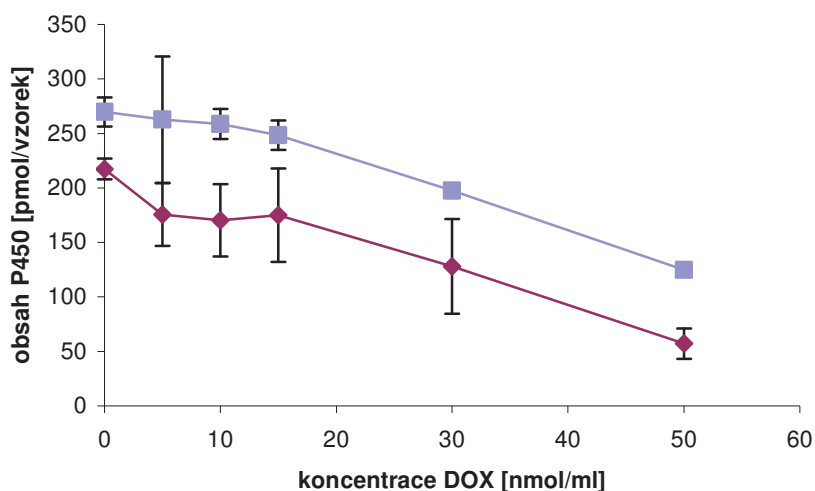
Mikrosomy MP1 byly inkubovány s C (♦), HQ (■) nebo BQ (▲) v nepřítomnosti NADPH (A) nebo s 0,5 mM NADPH (B).

4.4 Destrukce cytochromů P450 a vznik oxidativního stresu vlivem působení doxorubicinu v jaterních mikrosomech miniprasat, jeho ovlivnění fenolickými antioxidanty

Jaterní mikrosomy miniprasete byly dále využity jako modelový systém nežádoucích účinků klinicky významných látek obsahujících v molekule chinonický motiv. Jako zástupce těchto látek bylo studováno anthracyklinové cytostatikum DOX.

4.4.1 Destrukce P450 vlivem působení doxorubicinu v jaterních mikrosomech miniprasat

DOX působil statisticky významnou destrukci P450 v přítomnosti ($P=0,0002$) i nepřítomnosti ($P=0,0013$) NADPH (Obr. 20).



Obr. 20 Destrukce P450 v miniprasečích mikrosomech MP2 vlivem doxorubicinu
Mikrosomy MP2 byly inkubovány 60 min s 0, 5, 10, 15, 30 a 50 μM DOX v nepřítomnosti (■) nebo s 0,5 mM NADPH (◆).

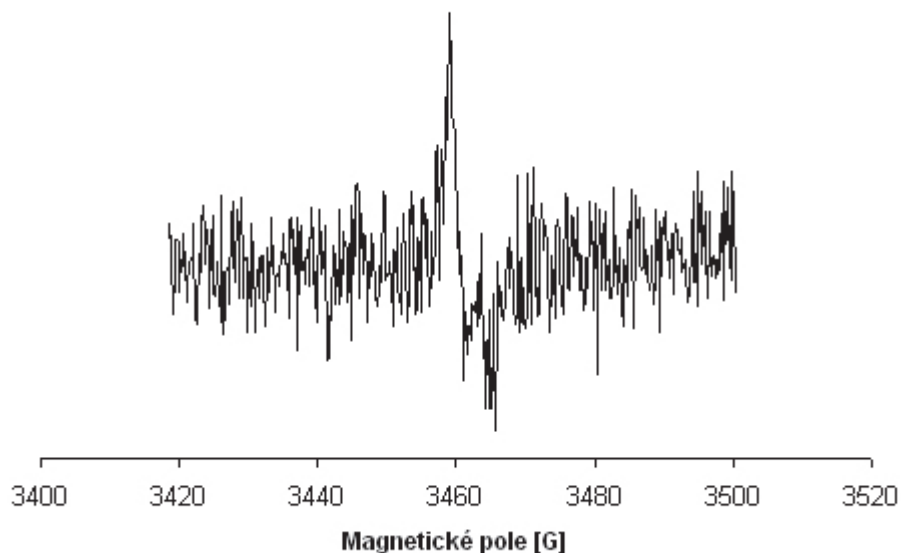
4.4.2 Vliv doxorubicinu na aktivity a obsah proteinu P450 2E a 3A v jaterních mikrosomech miniprasat

Aktivity ani obsah proteinu P450 2E a 3A v mikrosomech MP2 nebyly významně ovlivněny inkubací s DOX v rozmezí koncentrací 5-50 μM v nepřítomnosti ani v přítomnosti NADPH (výsledky nezobrazeny).

4.4.3 Tvorba semichinonu doxorubicinu a superoxidových radikálů

Tvorba semichinonového radikálu a následná aktivace kyslíku jsou považovány za důležitý mechanismus toxicity DOX. V přítomnosti DOX ve výše uvedených modelových systémech byla proto sledována tvorba tří typů radikálů – semichinonového radikálu DOX, který je iniciačním krokem, superoxidových radikálů, které jsou výsledkem přímé reakce semichinonu s molekulárním kyslíkem a tedy prvními vznikajícími kyslíkovými radikály, a hydroxylových radikálů, které jsou konečným reaktivním agens celé této kaskády.

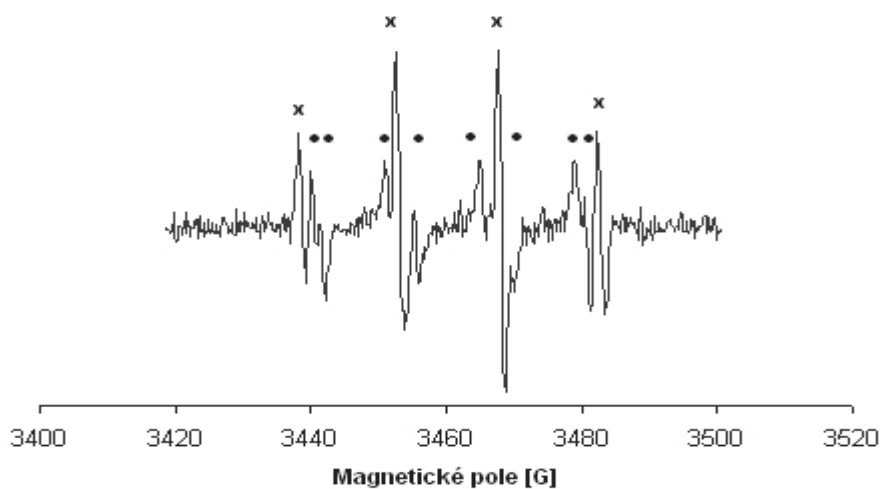
Tvorba radikálu semichinonu DOX byla sledována v bakteriálních membránách s obsahem CPR a v jaterních mikrosomech miniprasat za anaerobních podmínek, přičemž v mikrosomech inkubovaných s NADPH a DOX semichinon detekován nebyl. Nejnižší koncentrace DOX, při které byl semichinon detekován v systému s membránami CPR, DOX a NADPH, byla 300 μM . Spektrum ESR se signálem semichinonu DOX je zobrazeno na Obr. 21. Oproti tomu, již v mnohem nižší koncentraci DOX (30 μM), byl



Obr. 21 Spektrum ESR se signálem semichinonu DOX

Membrány obsahující CPR byly inkubovány s 300 μM DOX a 1 mM NADPH v anaerobním prostředí bez DMPO.

v systému s membránami CPR pozorován vznik spektra složeného z kvartetu náležejícího hydroxylovým radikálům a dalšího spektra se středem na $g=2,014$ a štěpícími konstantami $a_N=14,4$ G, $a_H(\beta)=11,8$ G a $a_H(\gamma)=1,72$ G (Obr. 22). Toto spektrum odpovídá aduktu superoxidových radikálů s DMPO [57]. Ve vzorcích s CPR a



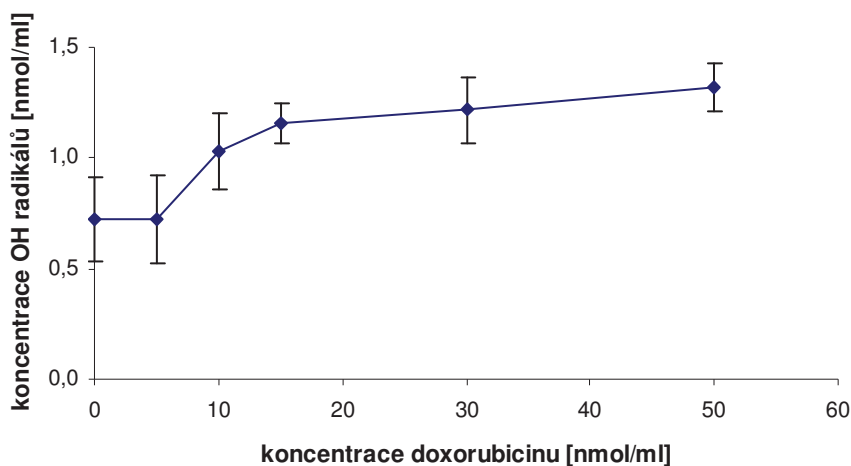
Obr. 22 Spektrum ESR se signály superoxidových a hydroxylových radikálů

Membrány obsahující CPR byly inkubovány s 30 μM DOX a 0,5 mM NADPH v aerobním prostředí v přítomnosti 400 mM DMPO. Výsledné spektrum je složeno ze signálů hydroxylových radikálů (x) a superoxidových radikálů (•).

NADPH bez DOX bylo zaznamenáno pouze spektrum hydroxylových radikálů. Jejich koncentrace přibližně odpovídala hodnotám naměřeným v systému s jaterními mikrosomy a NADPH (výsledky nezobrazeny).

4.4.4 Tvorba hydroxylových radikálů vlivem doxorubicinu v jaterních mikrosomech miniprasat

V systému s mikrosomy MP2, 0,5 mM NADPH a DOX byl detekován pouze kvartet signálů odpovídající aduktu $\text{DMPO}\cdot\text{OH}$. DOX stimuloval tvorbu hydroxylových radikálů v závislosti na koncentraci ($P=0,002$, Obr. 23). Ve stejném systému bez NADPH nebyla zaznamenána významná tvorba hydroxylových radikálů (výsledky nezobrazeny).



Obr. 23 Tvorba hydroxylových radikálů v miniprasečích mikrosomech MP2 vlivem doxorubicinu

Mikrosomy MP2 byly inkubovány s 0, 5, 10, 15, 30 a 50 μM DOX v přítomnosti 0,5 mM NADPH.

4.4.5 Vliv polyfenolických antioxidantů na tvorbu hydroxylových radikálů v systému doxorubicinu a jaterních mikrosomů miniprasat

Přírodní a syntetické polyfenoly byly použity ke sledování antioxidační aktivity vůči působení DOX v modelovém systému miniprasečích mikrosomů

Z testovaných polyfenolických antioxidantů byl významný inhibiční účinek na tvorbu hydroxylových radikálů vlivem DOX zaznamenán u fisetinu, kaempferolu a myricetinu v nejvyšší použité koncentraci (100 μM , Tab. 3)

Tab.3 Vliv fenolických antioxidantů na tvorbu hydroxylových radikálů v mikrosomech MP2 s 30 μM doxorubicinem a NADPH

Testované antioxidanty	Koncentrace hydroxylových radikálů [nmol/ml]		
	30 μM	50 μM	100 μM
Fisetin	1,28 \pm 0,19	1,22 \pm 0,01	0,79 \pm 0,02*
Kaempferol	1,49 \pm 0,19	1,18 \pm 0,27	0,79 \pm 0,10*
Morin	1,41 \pm 0,06	1,18 \pm 0,16	1,01 \pm 0,19
Kvercetin	1,50 \pm 0,18	1,20 \pm 0,43	1,09 \pm 0,18
Myricetin	1,18 \pm 0,08	1,10 \pm 0,08	0,64 \pm 0,06*
Eriodictyol	1,39 \pm 0,06	1,52 \pm 0,18	1,32 \pm 0,09
4-hydroxy-6-methoxyauron	1,49 \pm 0,12	1,27 \pm 0,08	1,12 \pm 0,24
Kontrola (methanol)	1,33 \pm 0,07	1,29 \pm 0,18	1,17 \pm 0,15

Hodnoty které se statisticky významně liší od kontroly jsou označeny hvězdičkami

Kapitola 5

Diskuze

Jedním z cílů předkládané práce byla příprava stabilního membránového systému pro použití k testování destrukčních účinků xenobiotik na P450 a úlohy oxidativního stresu v tomto působení. Stabilita izolovaných bakteriálních membrán s obsahem pěti významných lidských P450 byla nejprve otestována inkubací při 37 °C bez přídavku NADPH nebo v přítomnosti různých koncentrací NADPH. V tomto systému byly zjištěny velké rozdíly ve stabilitě mezi jednotlivými preparáty P450. Nalezené rozdíly mohly být zapříčiněny odlišnou strukturou vlastních molekul enzymů (rozdíly v náchylnosti jednotlivých lidských rekombinantních P450 k denaturaci vlivem tlaku či teploty byly již popsány – [58], [59]) nebo specifickými a zatím nedefinovanými vlastnostmi membránových preparátů. Pro účely testování destrukčních účinků xenobiotik na P450 však nebyl žádný z výsledných preparátů vhodný, neboť v přítomnosti běžně laboratorně používané koncentrace NADPH (0,5 mM) téměř všechny exprimované P450 (kromě P450 1A2) degradovaly během 60-ti minutové inkubace z více než 70 %. V případě P450 1A2 se projevil opačný účinek vyšší koncentrace NADPH než v případě ostatních preparátů, přítomnost 0,5 mM NADPH měla protektivní účinek na obsah P450 během inkubace. Nicméně, vzhledem k vysokému stupni degradace P450 při inkubaci bez NADPH ani tento membránový preparát nebyl vhodný pro testování destrukčních účinků xenobiotik. U vybraných membrán (P450 2E1) byl prověřen časový průběh degradace P450. P450 2E1 byl takto dále testován, neboť hraje důležitou roli v metabolismu benzenu a dalších substrátů o nízké molekulové hmotnosti a byl považován za potenciálně nejzajímavější pro testování interakcí s BQ a HQ. Avšak časový průběh destrukce P450 2E1 potvrdil, že možnost použití těchto membrán pro kratší inkubační časy je rovněž omezená, neboť

přítomnost 0,5 mM NADPH zde působila velmi výraznou destrukci P450 již po 10 min inkubace.

Výrazná destrukce P450 exprimovaných v membránových systémech během inkubace v přítomnosti NADPH byla pravděpodobně způsobena tzv. cyklem naprázdno bez substrátu (P450 futile cycle), během něhož vznikají ROS a který již byl popsán v podmínkách *in vitro* v přítomnosti NADPH u purifikovaných P450 i v mikrosomech [60], [61]. Úbytek celkového obsahu P450 v lidských mikrosomech inkubovaných s 1 mM NADPH byl 0-30 % [33]. Důvodem, proč se účinek NADPH projevil výrazněji právě v membránových systémech oproti mikrosomům, může být vyšší poměr CPR : P450, který může být příčinou vyššího hromadění ROS [62], a zároveň nepřítomnost ostatních mikrosomálních enzymů s antioxidační funkcí. Membránové systémy připravené v rámci této práce byly rovněž použity pro studium metabolismu nové generace protinádorových léčiv ze skupiny taxanů [63]. Membrány P450 3A4 po 30 min inkubaci s 1 mM NADPH a substrátem účinně metabolizovaly studované taxany. Rovněž P450 2A6 byl v naší laboratoři již dříve podrobně charakterizován včetně studie enzymové kinetiky i záznamu substrátových spekter pomocí markerového substrátu kumarinu [49]. V přítomnosti substrátu, kdy neprobíhal cyklus naprázdno, byly tedy P450 exprimované v membránových systémech metabolicky aktivní, což se potvrdilo i při testování aktivity vybraných P450 (P450 2E1) pomocí jejich markerových substrátů. Vzhledem k nevyhovujícím výsledkům testování P450 2E1 systému (viz výše) byl pro studium mechanismu toxického působení metabolitů benzenu, které bylo jedním z hlavních cílů této práce, použit nejstabilnější z membránových systémů (P450 2C9). Při inkubaci studovaných látek s membránami obsahujícími P450 2C9 a CPR se projevil výrazný destruktivní účinek BQ a HQ zejména v nepřítomnosti NADPH, což odpovídá

dříve sledovanému trendu s potkaními i lidskými mikrosomy [33], [64]. Přítomnost pouze 0,5 mM NADPH měla výraznější vliv na úbytek P450 než přítomnost metabolitů benzenu a i tento výsledek rovněž odpovídal našim zkušenostem s potkaními mikrosomy [64].

Pro další studium účinků metabolitů benzenu byly použity mikrosomy z jater pokusných miniprasat, jejichž podobnost s lidskými jaterními mikrosomy v oblasti hladin a aktivit jednotlivých P450 již byla prokázána [23], [24]. Tyto mikrosomální preparáty jsou z těchto důvodů a především vzhledem k velmi omezené dostupnosti lidských jater doporučovány jako vhodný modelový systém pro studium lidské biotransformace. Rozsah destrukce P450 vlivem NADPH v jaterních mikrosomech miniprasat byl větší než v případě lidských mikrosomů [33], během inkubace v přítomnosti 1 mM NADPH degradovalo 49 % celkového P450. Jaterní P450 miniprasat byly tedy citlivější vůči působení oxidativního stresu generovaného cyklem P450 naprázdno. Předpokládáme, že důvodem tohoto rozdílu může být nižší antioxidační kapacita jaterních mikrosomů miniprasat. Přestože jaterní P450 miniprasat byly již poměrně detailně charakterizovány, o obsahu ostatních enzymů, které mohou hrát roli v tvorbě oxidativního stresu, není v literatuře k dispozici dostatek informací. Z mikrosomálních enzymů by se mohlo jednat např. o α -glutathion-S-transferázu [65], CPR nebo prostaglandin-H-syntázu [66]. Miniprasečí mikrosomy byly však při inkubaci s NADPH významně stabilnější než všechny sledované bakteriální systémy (kde se destrukce jednotlivých P450 pohybovala mezi 60-80 %) a při inkubacích bez NADPH potom nedocházelo ke snížení celkového obsahu P450 prakticky vůbec. Časový průběh destrukce P450 vlivem NADPH byl u mikrosomů podobný jako v případě membrán P450 2E1-CPR avšak s tím rozdílem, že degradace byla v případě membrán výraznější a

probíhala i bez přídavku NADPH. Tento rozdíl byl pravděpodobně ovlivněn i stabilitou samotného systému membrán. Tyto detailní experimenty opět potvrdily nižší odolnost P450 v bakteriálních membránách vůči oxidativnímu stresu ve srovnání s mikrosomy. Při dalším používání bakteriálních membrán pro studium vlastností P450 je tedy třeba tuto skutečnost respektovat.

Ze studovaných metabolitů benzenu způsoboval BQ nejrozsáhlejší destrukci celkového P450 v mikrosomech inkubovaných bez NADPH i v jeho přítomnosti. Koncentrační závislost jeho působení se podobala i účinkům BQ na P450 2C9 v membránách, kdy bez NADPH došlo k výrazné destrukci již v nejnižší použité koncentraci (0,1 mM), zatímco ve vyšších koncentracích již nebylo zvýšení destrukce výrazné. I v tomto případě však byly membrány významně citlivější než mikrosomy (téměř totální destrukce vlivem 1 mM BQ v membránách oproti 60 % destrukci v mikrosomech). Destrukční účinek HQ na celkový P450 v mikrosomech byl také méně výrazný než na P450 2C9 v membránách a lišil se i průběhem koncentrační závislosti. V membránách se projevil účinek HQ již u 0,1 mM HQ, zatímco v mikrosomech působil destrukci až 0,5 mM HQ a účinek srovnatelný s BQ se objevil až u 1 mM HQ. C byl v obou systémech nejméně destruktivní z testovaných látek, v membránách s P450 2C9 působil dokonce mírně protektivně. V obou systémech také platilo, že v přítomnosti NADPH byl destrukční účinek testovaných chinonů méně výrazný než v jeho nepřítomnosti.

Výrazný rozdíl mezi účinkem chinonů v nepřítomnosti a přítomnosti NADPH byl zaznamenán v případě membrán obsahujících pouze CPR, které byly sledovány za účelem zjištění možných příčin výše zmíněné nestability membrán obsahujících P450 spolu s CPR. CPR byla při inkubaci se samotným NADPH stabilní. Během inkubace HQ

i BQ v přítomnosti NADPH se projevil destrukční účinek obou látek, a to zejména v případě BQ. Zajímavým výsledkem ovšem byla úplná destrukce aktivity CPR exprimované v membránách při inkubaci s HQ nebo BQ bez NADPH, přítomnost NADPH tedy při inkubaci s chinony na aktivitu CPR působila protektivně. Během inkubace chinonů s membránami v nepřítomnosti NADPH se pravděpodobně uplatnil kovaletní mechanismus inaktivace, který je vzhledem k ostatním výsledkům této studie velmi pravděpodobný hlavně u BQ. V případě HQ mohla hrát roli jeho samovolná oxidace na BQ, která je v nepřítomnosti NADPH významnější než v jeho přítomnosti [31]. Vzájemné přeměny HQ a BQ byly ovšem v rámci této práce i dřívějších studií [31] sledovány pouze ve vodném roztoku nebo v přítomnosti mikrosomů. Podrobnější studium těchto přeměn v přítomnosti membrán s CPR by mohlo být námětem pro další výzkum. Hlavním předmětem zájmu v rámci této práce byly ovšem membránové systémy s obsahem P450 a proto detailnější studium nebylo prováděno. Nicméně, porovnáním s výsledky stanovení aktivit P450 v mikrosomech po inkubaci s HQ a BQ se zdá, že úplná inaktivace CPR vlivem těchto látek probíhá pouze v membránách, neboť v mikrosomech byla v nepřítomnosti NADPH zachována aktivita MFO systému, jehož nedílnou součástí je CPR.

Na základě výsledků této práce se lidské P450 exprimované v membránách *E. coli* a izolované v podobě membrán nezdají být vhodné pro testování destrukčního účinku xenobiotik na P450. Jejich využití pro metabolické studie, zejména pro identifikaci specifického P450 zodpovědného za metabolismus xenobiotik však tímto závěrem není zpochybněno.

Za účelem objasnění mechanismu pozorované destrukce P450 byly provedeny experimenty sledující vzájemné přeměny mezi BQ a HQ v prostředí mikrosomů.

Zároveň byl sledován vliv těchto látek na aktivity a hladiny významných P450 a tvorbu markerů oxidativního stresu (hydroxylových radikálů) v jaterních mikrosomech pokusných miniprasat. V rámci této práce byly sledovány aktivity P450 2E a 3A, neboť markerové substráty a aktivity u těchto miniprasečích enzymů odpovídají jejich protějškům u lidí [23]. Pro ostatní z P450 přítomných v lidských játrech a identifikovaných také u miniprasat (např. 1A, 2A, 2C a 2D) markerové substráty a aktivity nekorelují tak dobře.

Úbytek celkového obsahu P450 vlivem samotného NADPH v jaterních mikrosomech miniprasat nekoreloval se snížením aktivit P450 2E a 3A. Na tomto úbytku se pravděpodobně podílely ve větší míře jiné P450, které byly vůči působení NADPH citlivější a tudíž přispěly k celkovému snížení obsahu P450.

Tvorba hydroxylových radikálů v mikrosomech inkubovaných 10 min s NADPH byla koncentračně závislá a korelovala s destrukcí P450. Časový průběh destrukce P450 naznačuje, že tvorba hydroxylových radikálů může hrát roli v destrukci P450 vlivem NADPH, přestože v předchozích publikacích tyto dva efekty nekorelovaly [33]. Tento rozpor lze vysvětlit tím, že v současné práci byla ke stanovení tvorby hydroxylových radikálů použita metoda ESR, která je specifická a ve srovnání se spektrofotometrickým stanovením použitým ve zmíněné práci [33] i citlivější.

Při inkubacích s metabolity benzenu byla tvorba hydroxylových radikálů nejvíce stimulována HQ, zatímco BQ produkoval hydroxylové radikály na srovnatelné úrovni pouze v nízkých koncentracích. Obdobné působení těchto látek bylo již pozorováno při použití potkaních jaterních mikrosomů [31] a podporuje předpoklad, že tvorba ROS hraje roli v toxicitě HQ [67], [68]. C ve srovnání s kontrolními vzorky tvorbu hydroxylových radikálů významně nestimuloval. Toto pozorování je v souladu

s publikovanými výsledky, ze kterých vyplývá, že tvorba ROS není pravděpodobně hlavním mechanismem jeho genotoxicity [69].

Při srovnání účinku BQ na aktivity jednotlivých P450 se ukázalo, že aktivita P450 2E byla citlivější vůči jeho působení než aktivita 3A. Vzhledem k tomu, že aktivita P450 2E po 60 min inkubace s 0,1 mM BQ a NADPH byla vyšší než po 10 min inkubace, je možné spekulovat o povaze interakcí mezi BQ a P450 2E. Tento výsledek naznačuje, že tyto interakce jsou dynamické a reversibilní, alespoň u nízkých koncentrací BQ. Jak jsme ukázali, BQ byl velmi efektivně přeměňován na méně destruktivní HQ a po 60 min inkubace jeho koncentrace v tomto vzorku byla jen 13 % koncentrace HQ. BQ také zřetelně snižoval elektroforeticky stanovený obsah apoproteinu P450 2E i 3A. V případě P450 2E probíhala inaktivace rychleji než destrukce apoproteinu, což by mohlo znamenat, že BQ interaguje s molekulou tohoto enzymu více způsoby. Předpokládáme, že BQ atakuje přednostně hem a s nižší afinitou se potom váže i na apoprotein. Účinek na apoprotein P450 3A odpovídal účinku na jeho aktivitu. P450 2E byl tedy inaktivován rychleji než 3A, ale účinek na jeho apoprotein byl pomalejší než tato inaktivace.

Srovnání citlivosti aktivit P450 2E a 3A vůči HQ ukázalo, že převládající mechanismus účinku HQ se liší od BQ. To bylo potvrzeno i výsledky imunoblotingu, kde HQ na rozdíl od BQ nesnižoval obsah apoproteinu P450 2E nebo 3A. Srovnání destrukčních účinků HQ a BQ je v souladu s názorem, že u BQ převládá jako mechanismus toxicity kovalentní vazba na proteiny, zatímco toxické účinky HQ jsou pravděpodobně způsobeny převážně stimulací tvorby ROS [33], [67]. ROS jsou schopné navodit destrukci hemu P450 [60], což bylo také nejpravděpodobnějším mechanismem destrukce P450 v inkubacích s HQ v našich experimentech. Jelikož se při vzájemných přeměnách HQ a BQ tvoří semichinonový radikál [70], může docházet i k aktivaci

kyslíku a tvorbě ROS [67]. Podle našich výsledků přítomnost NADPH podporuje v prostředí mikrosomů průběh redukčních reakcí. Přesto však, vzhledem k přítomnosti oxidas, zřejmě dochází k enzymaticky podmíněnému redoxnímu cyklu HQ, jehož oxidace probíhá pouze do stádia semichinonu a ne až na BQ. To vysvětluje proč NADPH s HQ tvořily významné množství hydroxylových radikálů a naznačuje, že P450 3A by mohl být citlivější vůči inaktivaci vlivem ROS než P450 2E. Nicméně, destrukce P450 3A v přítomnosti samotného NADPH (bez HQ), kdy se tvořilo velké množství ROS, byla zanedbatelná. Možným vysvětlením pro tento rozdíl v citlivosti P450 3A vůči oxidativnímu stresu stimulovanému pouze NADPH oproti stresu vznikajícímu vlivem HQ v přítomnosti NADPH může být právě role průběžně vznikajícího semichinonového radikálu. Úlohu může hrát i čistě kvantitativní hledisko, neboť HQ stimuloval produkci ROS ještě více oproti samotnému NADPH.

Destrukční účinek reaktivních metabolitů benzenu na P450 byl pravděpodobně způsoben částečně kovalentní vazbou BQ na protein a částečně působením ROS vznikajícími při vzájemných přeměnách BQ a HQ nebo během redoxního cyklu HQ. Toto schéma jejich působení již bylo navrženo s použitím potkaních jaterních mikrosomů a spektrofotometrické metody měření oxidativního stresu [33]. Celková destrukce P450 vlivem BQ a HQ v miniprasečích mikrosomech nedosáhla hodnot zaznamenaných u lidských mikrosomů [33]. Tento rozdíl může být připsán buď rozdílným vlastnostem jednotlivých enzymů vyplývajícím ze strukturálních odlišností nebo odlišným zastoupením těchto enzymů v jaterní tkáni lidí a miniprasat. Odhadovaný průměrný obsah P450 2E v játrech miniprasat použitých v této studii je nižší než u lidí [23], což může mít vliv na celkový rozsah destrukce P450 vlivem metabolitů benzenu. Je také důležité připomenout, že lidská populace je mnohem více heterogenní vzhledem

k obsahu a aktivitám jednotlivých P450 než jakýkoli laboratorně využívaný modelový druh. Také u námi použitého druhu miniprasat byla interindividuální variabilita aktivit hlavních P450 relativně malá [23]. Co se týče obsahu a vlastností jednotlivých P450, jako jsou např. polymorfismy, indukce nebo inhibice P450, mohou tedy miniprasata odpovídat pouze určité části lidské populace.

Dalším významným cílem této práce bylo vytvoření dostupného *in vitro* modelového systému vhodného k testování látek potenciálně prospěšných pro zmírnění nežádoucích účinků anthracyklinových cytostatik. Závažným nežádoucím účinkem limitujícím terapeutické využití této skupiny cytostatik je jejich akutní i chronická kardiotoxicita. Za významný mechanismus vzniku kardiotoxicity anthracyklinů je považována nadměrná produkce ROS, jako potenciálně prospěšné látky jsou proto testovány mj. flavonoidy, které mají antioxidační i jiné potenciálně prospěšné účinky [71]. Jako zástupce anthracyklinů byl pro tuto studii vybrán DOX. Mechanismus jeho interakcí s enzymy obsaženými v miniprasečích jaterních mikrosomech byl studován analogicky s jednoduchými chinony BQ a HQ, přičemž cílem této části studie bylo otestovat možnost použití jaterních mikrosomů miniprasat jako modelového systému k testování vlivu polyfenolických antioxidantů na tvorbu ROS stimulovanou DOX.

DOX působil destrukci celkového P450 v jaterních mikrosomech miniprasete v závislosti na koncentraci, zatímco aktivity P450 2E a 3A neovlivňoval. Zároveň ve stejném rozmezí koncentrací stimuloval tvorbu hydroxylových radikálů v závislosti na koncentraci. Jeho účinky v testovaném rozmezí koncentrací tudíž připomínaly působení samotného NADPH. Na rozdíl od HQ, DOX (analogicky s NADPH) v koncentracích, ve kterých stimuloval tvorbu hydroxylových radikálů, neovlivňoval aktivity P450 2E a 3A. Je pravděpodobné, že účinky DOX byly zprostředkovány stejnými mechanismy jako

účinky NADPH, tedy produkcí ROS. Předpokládáme, že v použitém systému s jaterními mikrosomy miniprasete docházelo k jednoelektronové redukci pomocí CPR na semichinon DOX a následné aktivaci kyslíku s tvorbou superoxidového radikálu a hydroxylových radikálů. Ionty železa schopné katalyzovat produkci hydroxylových radikálů [43] mohly pocházet z poškozeného hemu P450. Jelikož semichinon DOX velice rychle reaguje s kyslíkem za tvorby superoxidu, jeho stanovení pomocí ESR vyžaduje speciální zařízení umožňující udržet naprosto anaerobní podmínky po celou dobu měření vzorku pomocí stálého proudu argonu. V podmínkách našeho měření (bez možnosti uchovat vzorek pod argonem i během měření) se podařilo detekovat semichinon DOX až v relativně vysoké, klinicky *in vivo* nedosažitelné, koncentraci DOX (300 μM). Superoxidové radikály je však možné stanovit v aerobním prostředí po adukci s DMPO, což se v námi použitém systému s membránami CPR a NADPH potvrdilo. Prokázali jsme tedy nepřímo, že CPR redukuje DOX a tím spouští celou kaskádu redukce kyslíku a tvorby ROS. Jelikož spektrum superoxidu se překrývá se spektrem hydroxylových radikálů a je příliš složité na to, aby ho bylo možné kvantitativně vyhodnotit, zvolili jsme pro kvantitativní analýzu spektrum hydroxylových radikálů, které jsou konečným reaktivním agens celé této kaskády. Jako modelový systém byly pro toto hodnocení použity mikrosomy, neboť oproti membránám s CPR představují komplexnější systém obsahující oxidační i redukční enzymy a lépe simulují situaci *in vivo*. Ve spektrech hydroxylových radikálů získaných ze vzorků s mikrosomy nebyly žádné interferující signály a také proto byl tento systém vhodnější pro kvantitativní analýzu.

Ve vyšších koncentracích DOX (30 μM a vyšší) docházelo k destrukci P450 i v inkubacích bez NADPH. Pravděpodobně se zde uplatnil neenzymatický mechanismus, neboť ROS mohou být tvořeny i následkem přímé reakce DOX s ionty železa. DOX předává jeden elektron Fe^{3+} za tvorby Fe^{2+} , které následně může redukovat molekulární kyslík [41], [43]. V přítomnosti NADPH však byla zaznamenána tvorba ROS i destrukce P450 v nižších koncentracích, které více odpovídají klinicky dosahovaným koncentracím (7,5-10 μM , [36]). Považujeme proto tvorbu ROS, v souladu s literaturou, za významný mechanismus toxicity DOX.

Polyfenolické antioxidanty testované v rámci této práce byly vybrány z početné skupiny flavonoidů na základě své schopnosti inhibovat peroxidaci lipidů v systému s potkaními jaterními mikrosomy a NADPH [72]. Z testovaných flavonoidů byl pozorován významný inhibiční účinek na tvorbu hydroxylových radikálů stimulovanou DOX v mikrosomech u fisetinu, kaempferolu a myricetinu, avšak pouze v nejvyšší použité koncentraci (100 μM). Tato koncentrace je *in vivo* pomocí nutriční intervence prakticky nedosažitelná [73].

Námi použitý modelový systém s jaterními mikrosomy a 30 μM DOX lze, vzhledem k toxicitě DOX, považovat pouze za screeningový, neboť se liší od situace *in vivo* koncentrací DOX i cílovou tkání toxicity DOX. Nicméně pro odhad interakcí mezi DOX a polyfenolickými látkami, zejména z hlediska schopnosti vylučování ROS, se tento systém zdá vhodným. Další validace pomocí studia vztahů mezi strukturou a účinkem sledovaných látek je účelná. Fisetin, kaempferol a myricetin lze doporučit k dalšímu studiu v jiných modelových systémech jako potenciálně prospěšné pro zmírnění nežádoucích účinků doxorubicinu.

Kapitola 6

Závěry

Cílem této práce bylo prozkoumat možnost využití bakteriálních systémů exprimujících lidský monooxygenázový systém pro studium interakcí mezi látkami s motivem chinonu ve struktuře a cytochromy P450 a následně aplikovat získané znalosti na vývoj modelového systému pro testování vedlejších účinků anthracyklinových cytostatik.

Na základě analýzy získaných výsledků a s využitím publikované vědecké literatury, lze uzavřít:

1) Lidské cytochromy P450 exprimované v bakteriích *Escherichia coli* a izolované jako bakteriální membrány představují užitečný nástroj pro studium metabolismu xenobiotik exprimovaným enzymem, ale nejsou příliš vhodné pro studium oxidativního stresu a destruktivního působení xenobiotik na cytochromy P450.

Díky limitované dostupnosti lidské jaterní tkáně je třeba využívat alternativní modelové systémy a modelové zvířecí druhy pro studium interakcí biotransformačních enzymů s xenobiotiky. Vzhledem k tomu, že u nejběžnějšího laboratorního druhu, potkana, nejsou bez chemické indukce přítomny aktivity nejvýznamnějších lidských cytochromů P450, informace získané s použitím miniprasat jako modelového druhu mohou být velmi přínosné. Z tohoto důvodu byly k dalším experimentům využity miniprasečí jaterní mikrosomy.

2) Experimenty s miniprasečími mikrosomy ukázaly, že mechanismy buněčné toxicity hydrochinonu (produkce hydroxylových radikálů) a benzochinonu (kovalentní vazba na makromolekuly) se u miniprasat a lidí neliší. Navrhujeme proto jaterní mikrosomy miniprasat jako vhodný in vitro modelový systém pro testování oxidativního stresu a molekulární toxicity indukované látkami obsahujícími ve své struktuře chinon.

Výhodou tohoto systému je poměrně časově nenáročná příprava a lepší dostupnost v porovnání se systémy používajícími modelové buněčné linie nebo primokultury.

- 3) Při interakci miniprasečích mikrosomů s doxorubicinem docházelo k aktivaci doxorubicinu s následnou zvýšenou tvorbou hydroxylových radikálů. Za aktivaci doxorubicinu byla pravděpodobně zodpovědná NADPH:cytochrom P450 reduktáza.

Studie vlivu polyfenolů na toxicitu doxorubicinu v systému s jaterními mikrosomy miniprasat ukázala, že tento modelový systém umožňuje jejich interakce s doxorubicinem studovat a mohl by sloužit pro účely primárního screeningu biologických, zejména antioxidačních, vlastností těchto látek. Jako vhodné kandidáty pro tyto studie se zdají být fisetin, kaempferol a myricetin

Literatura:

- [1] **Testa B., Krämer S.D.**, The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 1. Principles and overview, *Chem Biodivers.* 2006; 3(10):1053-101.
- [2] **Nebert D.W., Dalton T.P.**, The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis, *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(12):947-60.
- [3] **Plant N.**, The human cytochrome P450 sub-family: transcriptional regulation, inter-individual variation and interaction networks, *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1770(3):478-88.
- [4] **Nebert D.W., Adesnik M., Coon M.J., Estabrook R.W., Gonzalez F.J., Guengerich F.P., Gunsalus I.C., Johnson E.F., Kemper B., Levin W., et al.**, The P450 gene superfamily: recommended nomenclature, *DNA.* 1987; 6(1):1-11.
- [5] <http://drnelson.utmem.edu/P450.statsfile.html>, 10.2.2008.
- [6] **Stark K., Guengerich F.P.**, Characterization of orphan human cytochromes P450, *Drug Metab Rev.* 2007; 39(2-3):627-37.
- [7] **Guengerich F.P.**, Cytochromes P450, drugs, and diseases, *Mol Interv.* 2003; 3(4):194-204.
- [8] **Isin E.M., Guengerich F.P.**, Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes, *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1770(3):314-29.
- [9] **Gonzalez F.J.**, Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1, *Mutat Res.* 2005; 569(1-2):101-10.
- [10] **Wang M., Roberts D.L., Paschke R., Shea T.M., Masters B.S., Kim J.J.**, Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(16):8411-6.
- [11] **Gutierrez A., Grunau A., Paine M., Munro A.W., Wolf C.R., Roberts G.C., Scrutton N.S.**, Electron transfer in human cytochrome P450 reductase, *Biochem Soc Trans.* 2003; 31(Pt 3):497-501.
- [12] **Vile G.F., Winterbourn C.C.**, Microsomal lipid peroxidation induced by adriamycin, epirubicin, daunorubicin and mitoxantrone: a comparative study, *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989; 24(2):105-8.

- [13] **Munro A.W., Noble M.A., Robledo L., Daff S.N., Chapman S.K.**, Determination of the redox properties of human NADPH-cytochrome P450 reductase, *Biochemistry*. 2001; 40(7):1956-63.
- [14] **Backes W.L., Kelley R.W.**, Organization of multiple cytochrome P450s with NADPH-cytochrome P450 reductase in membranes, *Pharmacol Ther*. 2003; 98(2):221-33.
- [15] **Hagen N., Olsen A.K., Andersen J.V., Tjørnelund J., Hansen S.H.**, Characterization of mixtures of recombinant human cytochrome P450s as a screening model for metabolic stability in drug discovery, *Xenobiotica*. 2002; 32(9):749-59.
- [16] **Yun C.H., Yim S.K., Kim D.H., Ahn T.**, Functional expression of human cytochrome P450 enzymes in *Escherichia coli*., *Curr Drug Metab*. 2006;7(4):411-29.
- [17] **Brandon E.F., Raap C.D., Meijerman I., Beijnen J.H., Schellens J.H.**, An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons, *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003; 189(3):233-46.
- [18] **Pelkonen O., Kaltiala E.H., Larmi T.K., Kärki N.T.**, Cytochrome P-450-linked monooxygenase system and drug-induced spectral interactions in human liver microsomes, *Chem Biol Interact*. 1974; 9(3):205-16.
- [19] **Van der Hoeven T.A., Coon M.J.**, Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes., *J Biol Chem*. 1974; 249(19):6302-10.
- [20] **Hariparsad N., Sane R.S., Strom S.C., Desai P.B.**, In vitro methods in human drug biotransformation research: implications for cancer chemotherapy, *Toxicol In Vitro*. 2006; 20(2):135-53.
- [21] **Maron DM, Ames BN**, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat Res*. 1983;113(3-4):173-215.
- [22] **Nedelcheva V., Gut I.**, P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer, *Xenobiotica*. 199; 24(12):1151-75.
- [23] **Anzenbacher P., Souček P., Anzenbacherová E., Gut I., Hrubý K., Svoboda Z., Květina J.**, Presence and activity of cytochrome P450 isoforms in minipig liver microsomes. Comparison with human liver samples, *Drug Metab Dispos*. 1998; 26(1):56-9.

- [24] **Souček P., Zuber R., Anzenbacherová E., Anzenbacher P., Guengerich F.P.**, Minipig cytochrome P450 3A, 2A and 2C enzymes have similar properties to human analogs, *BMC Pharmacol.* 2001;1:11.
- [25] **Turpeinen M., Ghiciuc C., Opritoui M., Tursas L., Pelkonen O., Pasanen M.**, Predictive value of animal models for human cytochrome P450 (CYP)-mediated metabolism: a comparative study in vitro., *Xenobiotica.* 2007;37(12):1367-77.
- [26] **Guengerich F.P.**, A malleable catalyst dominates the metabolism of drugs, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(37):13565-6.
- [27] **Bolton J.L., Trush M.A., Penning T.M., Dryhurst G., Monks T.J.**, Role of quinones in toxicology, *Chem Res Toxicol.* 2000; 13(3):135-60.
- [28] **Snyder R., Hedli C.C.**, An overview of benzene metabolism, *Environ Health Perspect.* 1996; 104 Suppl 6:1165-71.
- [29] **Lan Q., Zhang L., Li G., Vermeulen R., Weinberg R.S., Dosemeci M., Rappaport S.M., Shen M., Alter B.P., Wu Y., Kopp W., Waidyanatha S., Rabkin C., Guo W., Chanock S., Hayes R.B., Linet M., Kim S., Yin S., Rothman N., Smith M.T.**, Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene, *Science.* 2004; 306(5702):1774-6.
- [30] **Ross D.**, The role of metabolism and specific metabolites in benzene-induced toxicity: evidence and issues, *J Toxicol Environ Health A.* 2000; 61(5-6):357-72.
- [31] **Souček P., Gut I., Stopka P.**, Effect of the microsomal system on interconversions between hydroquinone, benzoquinone, oxygen activation, and lipid peroxidation, *Chem Biol Interact.* 2000; 126(1):45-61.
- [32] **Gut I., Nedelcheva V., Souček P., Stopka P., Tichavská B.**, Cytochromes P450 in benzene metabolism and involvement of their metabolites and reactive oxygen species in toxicity, *Environ Health Perspect.* 1996; 104 Suppl 6:1211-8.
- [33] **Souček P.**, Cytochrome P450 destruction by quinones: comparison of effects in rat and human liver microsomes, *Chem Biol Interact.* 1999; 121(3):223-36.
- [34] **Henderson C.J., Otto D.M., Carrie D., Magnuson M.A., McLaren A.W., Rosewell I., Wolf C.R.**, Inactivation of the hepatic cytochrome P450 system by conditional deletion of hepatic cytochrome P450 reductase, *J Biol Chem.* 2003; 278(15):13480-6.

- [35] **Dobbs N.A., Twelves C.J., Gillies H., James C.A., Harper P.G., Rubens R.D.**, Gender affects doxorubicin pharmacokinetics in patients with normal liver biochemistry, *Cancer Chemother Pharmacol.* 1995;36(6):473-6.
- [36] **Minotti G., Recalcati S., Menna P., Salvatorelli E., Corna G., Cairo G.**, Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms, *Methods Enzymol.* 2004;378:340-61.
- [37] **Ramji S., Lee C., Inaba T., Patterson A.V., Riddick D.S.**, Human NADPH-cytochrome p450 reductase overexpression does not enhance the aerobic cytotoxicity of doxorubicin in human breast cancer cell lines, *Cancer Res.* 2003; 63(20):6914-9.
- [38] **Cutts S.M., Nudelman A., Rephaeli A., Phillips D.R.**, The power and potential of doxorubicin-DNA adducts, *IUBMB Life.* 2005; 57(2):73-81.
- [39] **Gewirtz D.A.**, A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin, *Biochem Pharmacol.* 1999; 57(7):727-41.
- [40] **Hortobágyi G.N.**, Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview, *Drugs.* 1997;54 Suppl 4:1-7.
- [41] **Singal P.K., Li T., Kumar D., Danelisen I., Iliskovic N.**, Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation, *Mol Cell Biochem.* 2000; 207(1-2):77-86.
- [42] **Xu X., Persson H.L., Richardson D.R.**, Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron, *Mol Pharmacol.* 2005; 68(2):261-71.
- [43] **Horenstein M.S., Van der Heide R.S., L'Ecuyer T.J.**, Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention, *Mol Genet Metab.* 2000; 71(1-2):436-44.
- [44] **Conklin K.A.**, Coenzyme q10 for prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity, *Integr Cancer Ther.* 2005; 4(2):110-30.
- [45] **Wouters K.A., Kremer L.C., Miller T.L., Herman E.H., Lipshultz S.E.**, Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies, *Br J Haematol.* 2005; 131(5):561-78.
- [46] **Barnabé N, Zastre JA, Venkataram S, Hasinoff BB**, Deferiprone protects against doxorubicin-induced myocyte cytotoxicity, *Free Radic Biol Med.* 2002 15;33(2):266-75.

- [47] **Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C.**, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol Rev.* 2000; 52(4):673-751.
- [48] **Gillam E.M., Baba T., Kim B.R., Ohmori S., Guengerich F.P.**, Expression of modified human cytochrome P450 3A4 in *Escherichia coli* and purification and reconstitution of the enzyme, *Arch Biochem Biophys.* 1993; 305(1):123-31.
- [49] **Souček P.**, Expression of cytochrome P450 2A6 in *Escherichia coli*: purification, spectral and catalytic characterization, and preparation of polyclonal antibodies, *Arch Biochem Biophys.* 1999; 370(2):190-200.
- [50] **Omura T., Sato R.**, The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature, *J Biol Chem.* 1964; 239:2370-8.
- [51] **Peter R., Böcker R., Beaune P.H., Iwasaki M., Guengerich F.P., Yang C.S.**, Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1, *Chem Res Toxicol.* 1990; 3(6):566-73.
- [52] **Brian W.R., Sari M.A., Iwasaki M., Shimada T., Kaminsky L.S., Guengerich F.P.**, Catalytic activities of human liver cytochrome P-450 IIIA4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry.* 1990; 29(51):11280-92.
- [53] **Laemmli U.K.**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 1970; 227(5259):680-5.
- [54] **Towbin H., Staehelin T., Gordon J.**, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76(9):4350-4.
- [55] **Buettner G.R.**, Spin trapping: ESR parameters of spin adducts, *Free Radic Biol Med.* 1987; 3(4):259-303.
- [56] **Rinalducci S., Pedersen J.Z., Zolla L.**, Formation of radicals from singlet oxygen produced during photoinhibition of isolated light-harvesting proteins of photosystem II., *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1608(1):63-73.
- [57] **Yoshioka H., Senba Y., Saito K., Kimura T., Hayakawa F.**, Spin-trapping study on the hydroxyl radical formed from a tea catechin-Cu(II) system, *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001; 65(8):1697-706.
- [58] **Anzenbacherová E., Bec N., Anzenbacher P., Hudeček J., Souček P., Jung C., Munro A.W., Lange R.**, Flexibility and stability of the structure of cytochromes P450 3A4 and BM-3, *Eur J Biochem.* 2000;267(10):2916-20.

- [59] **Anzenbacher P., Hudeček J.**, Differences in flexibility of active sites of cytochromes P450 probed by resonance Raman and UV-Vis absorption spectroscopy, *J Inorg Biochem.* 2001;87(4):209-13.
- [60] **Schaefer W.H., Harris T.M., Guengerich F.P.**, Characterization of the enzymatic and nonenzymatic peroxidative degradation of iron porphyrins and cytochrome P-450 heme, *Biochemistry.* 1985; 24(13):3254-63.
- [61] **Guengerich F.P., Strickland T.W.**, Metabolism of vinyl chloride: destruction of the heme of highly purified liver Microsomal cytochrome P-450 by a metabolite, *Mol Pharmacol.* 1977; 13(6):993-1004.
- [62] **Crespi C.L., Miller V.P.**, The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes--state of the art and prospects for the future, *Pharmacol Ther.* 1999;84(2):121-31.
- [63] **Gut I., Ojima I., Václavíková R., Šimek P., Horský S., Linhart I., Souček P., Kondrová E., Kuznetsova L.V., Chen J.**, Metabolism of new-generation taxanes in human, pig, minipig and rat liver microsomes, *Xenobiotica.* 2006; 36(9):772-92.
- [64] **Souček P., Filipcová B., Gut I.**, Cytochrome P450 destruction and radical scavenging by benzene and its metabolites, Evidence for the key role of quinones, *Biochem Pharmacol.* 1994 Jun 15;47(12):2233-42.
- [65] **Prabhu K.S., Reddy P.V., Jones E.C., Liken A.D., Reddy C.C.**, Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes, *Arch Biochem Biophys.* 2004; 424(1):72-80.
- [66] **Kulmacz R.J., van der Donk W.A., Tsai A.L.**, Comparison of the properties of prostaglandin H synthase-1 and -2, *Prog Lipid Res.* 2003; 42(5):377-404.
- [67] **DeCaprio A.P.**, The toxicology of hydroquinone--relevance to occupational and environmental exposure, *Crit Rev Toxicol.* 1999; 29(3):283-330.
- [68] **do Céu Silva M., Gaspar J., Duarte Silva I., Leão D., Rueff J.**, Mechanisms of induction of chromosomal aberrations by hydroquinone in V79 cells, *Mutagenesis.* 2003; 18(6):491-6.
- [69] **do Céu Silva M., Gaspar J., Silva I.D., Leão D., Rueff J.**, Induction of chromosomal aberrations by phenolic compounds: possible role of reactive oxygen species, *Mutat Res.* 2003; 540(1):29-42.

- [70] **Zang L.Y., Stone K., Pryor W.A.**, Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance, *Free Radic Biol Med.* 1995; 19(2):161-7.
- [71] **Václavíková R., Kondrová E., Ehrlichová M., Boumendjel A., Kovář J., Stopka P., Souček P., Gut I.**, The effect of flavonoid derivatives on doxorubicin transport and metabolism., *Bioorg Med Chem.* 2008;16(4):2034-42
- [72] **Kondrová E., Ozgová Š., Gut I.**, Přirozené fenolické látky jako antioxidanty a prooxidanty a mechanismy jejich působení, *České pracovní lékařství*, 2006; 4: 19-24.
- [73] **Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C.**, Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, *Am J Clin Nutr.* 2005; 81(1 Suppl):230S-242S.

Seznam příloh:

Publikace, které jsou podkladem dizertace:

- a) **Kondrová E., Stopka P., Souček P.**, Cytochrome P450 destruction by benzene metabolites 1,4-benzoquinone and 1,4-hydroquinone and the formation of hydroxyl radicals in minipig liver microsomes., *Toxicol In Vitro*. 2007; 21(4):566-75, **IF= 1,754**
- Gut I., Ojima I., Václavíková R., Šimek P., Horský S., Linhart I., Souček P., Kondrová E., Kuznetsova L.V., Chen J.**, Metabolism of new-generation taxanes in human, pig, minipig and rat liver microsomes, *Xenobiotica*. 2006; 36(9):772-92., **IF=1,427**
- Václavíková R., Kondrová E., Ehrlichová M., Boumendjel A., Kovář J., Stopka P., Souček P., Gut I.**, The effect of flavonoid derivatives on doxorubicin transport and metabolism., *Bioorg Med Chem*. 2008;16(4):2034-42., **IF=2,624**
- b) **Kondrová E., Ozgová Š., Gut I.**, Přirozené fenolické látky jako antioxidanty a prooxidanty a mechanismy jejich působení, *České pracovní lékařství*, 2006; 4: 19-24.