

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BIOCHEMIE



# Vliv cytochromu $b_5$ na oxidaci protinádorového léčiva ellipticinu cytochromem P450 3A4

*Bakalářská práce*

**Radek Indra**

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Přírodovědecká fakulta UK  
KNIHOVNA CHEMIE



3233148871

Praha 2009

**UNIVERZITA KARLOVA v Praze**

Přírodovědecká fakulta

Oborová knihovna chemie

Albertov 6, 128 43 Praha 2

IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208

UK 21

*ř. č. 156/69 stud*

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod odborným vedením Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 3. června 2009

*Radek Indra*  
.....  
Radek Indra

Rád bych poděkoval své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání tohoto tématu, odborné vedení a za laskavý a trpělivý přístup při vypracovávání této bakalářské práce.

Dále bych chtěl poděkovat celému kolektivu naší laboratoře a zvláště pak RNDr. Barboře Mrázové za odborné rady, všestrannou pomoc a vytvoření příjemných pracovních podmínek.

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk</b>	6
<b>1. Úvod</b>	7
1.1. Podstata karcinogeneze	7
1.2. Faktory ovlivňující karcinogenesi	8
1.3. Metody léčení nádorových onemocnění	9
1.4. Chemoterapie	10
1.5. Farmakokinetika cytostatik	10
1.6. Mechanismus účinku cytostatik	11
1.7. Mikrosomální monooxygenásový systém	11
1.7.1. Cytochrom P450	12
1.7.2. Reakční mechanismus monooxygenasové reakce	13
1.7.3. Nomenklatura cytochromu P450	14
1.8. Cytochrom b <sub>5</sub>	15
1.8.1. Mechanismy působení cytochromu b <sub>5</sub>	15
1.8.2. Vliv cytochromu b <sub>5</sub> na reakce katalyzované cytochromy P450	16
1.9. Ellipticin	17
1.9.1. Biotransformace ellipticinu	17
1.9.2. Mechanismy protinádorového působení ellipticinu	18
1.9.3. Tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA	19
<b>2. Cíl bakalářské práce</b>	21
<b>3. Materiál a metody</b>	22
3.1. Materiál a chemikálie	22
3.2. Použité přístroje	23
3.3. Metody	24
3.3.1. Stanovení koncentrace proteinu metodou se 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou (BCA)	24
3.3.2. Premedikace laboratorních potkanů pregnenolon-karbonitrilem	24
3.3.3. Isolace mikrosomální frakce z jaterní tkáně laboratorního potkana	25
3.3.4. Stanovení obsahu cytochromu P450	26
3.3.5. Oxidace ellipticinu cytochromy P450 za přítomnosti různých proteinů	26
3.3.6. Oxidace ellipticinu cytochromy P450 za přítomnosti cytochromu b <sub>5</sub> – závislost na koncentraci různých forem cytochromu b <sub>5</sub>	27

3.3.7. Oxidace ellipticinu cytochromy P-450 za přítomnosti NADPH a NADPH-generujícího systému	28
3.3.8. Separace metabolitu ellipticinu pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC)	28
<b>4. Výsledky</b>	<b>30</b>
4.1. Isolace jaterních mikrosomů potkana premedikovaného induktorem cytochromu P450 3A4 pregnenolon-karbonitrilem (PCN)	30
4.2. Oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4	30
4.3. Oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4 za přítomnosti NADPH nebo NADPH-generujícího systému	31
4.4. Vliv cytochromu b <sub>5</sub> na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A4	32
4.5. Vliv dalších proteinů na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A4	34
<b>5. Diskuse</b>	<b>36</b>
<b>6. Závěr</b>	<b>38</b>
<b>Seznam použité literatury</b>	<b>39</b>

## Seznam použitých zkratek

AIDS	syndrom získané imunodeficiencie
ATP	adeosintrifosfát
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
CYP	cytochrom P450
cyt b <sub>5</sub>	cytochrom b <sub>5</sub>
cyt c	cytochrom c
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
EDTA Na <sub>2</sub>	ethylendiaminoctová kyselina ve formě dvojmocné soli
HIV	„human imunodeficiencie virus“
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
M	mol/l
M1-M5	metabolity ellipticinu
MFO	system monooxygenas se smíšenou funkcí
NADP <sup>+</sup> (NADPH)	nikotinamidadeninukleotid oxidovaný (redukovaný)
PCN	pregnenolon-karbonitril
PMSF	fenylmethanesulfonylfluorid
RPM	počet otáček za minutu
SOD	superoxiddismutasa
vit E	vitamín E

# 1. Úvod

Nádorová onemocnění jsou považována za jedny z nejzávažnějších problémů, se kterými se potýká současná medicína. V dnešní době jsou nádorová onemocnění na druhém místě mezi příčinami úmrtí v průmyslově vyspělých zemích. Hlavní příčinou většiny nádorů bývá kombinace nepříznivých **vnitřních faktorů**, tedy faktorů geneticky podmíněných, a **faktorů vnějších**, mezi které řadíme, kromě expozice člověka karcinogenním látkám, rovněž životní styl člověka. Avšak jedním z nejdůležitějších rizikových faktorů je věk. S prodlužováním věku jedince roste incidence některých nádorů. Dochází ke kumulaci spontánních mutací, genetické nestabilitě, čímž se rovněž zvyšuje riziko výskytu spontánních a indukovaných mutací. Výskyt nádorových onemocnění vykazuje nemalou korelaci i s geografickou polohou a velmi časté rozdíly jsou pozorovány i mezi jednotlivými populačními skupinami žijícími odlišným způsobem života [80].

**Léčba nádorových onemocnění** je komplikována zejména skutečností, že léčbou potřebujeme zcela zničit buňky nikoli cizorodé, jako je tomu například u bakteriálních infekcí, ale tělu vlastní. Nádorové buňky se sice více či méně liší od normálních buněk, ze kterých vznikly, a proto by teoreticky měly být rozpoznány imunitními mechanismy a eliminovány. Odlišnosti od normálních buněk jsou však buď natolik malé, že jsou imunitním systémem opomíjeny, nebo nádorové buňky využívají právě mechanismy umožňující paralyzovat některé zbraně imunitního systému [26]

## 1.1. Podstata karcinogenese

K tvorbě nádorů dochází vlivem narušení regulačního mechanismu dělení buňky a vlivem diferenciacních schopností buňky. Nádor je nově vytvořená abnormální tkáň, která se dělí neregulovaným způsobem [62]. Proces vzniku nádoru se označuje jako karcinogenese [62]. Nádory jsou klasifikovány podle schopnosti vnikat do jiné tkáně na dva typy:

- Benigní (nezhoubné) nádory – nešíří se do jiných tkání, dají se snadno odstranit chirurgicky, jsou ohraničené
- Maligní (zhoubné) nádory – tvoří metastase v dalších tkáních

Frekvence spontánních mutací je nízká (asi  $10^{-6}$  na jedno buněčné dělení). Vzhledem k celkovému počtu buněčných dělení během života je riziko vzniku nádoru vlivem spontánní mutace zanedbatelné. Na vzniku mutací se však podílí i mnohé vnější faktory např.



karcinogenní mutageny. Pokud by neexistovaly žádné opravné a eliminační prostředky pro poškozené geny, bylo by množství nádorů velmi vysoké. Karcinogeneze je složitý proces, jenž dosud není zcela objasněn [33].

Geny kódující proteiny, které se zapojují do regulace buněčného růstu a diferenciaci jsou označovány jako protoonkogeny. Produkty těchto genů jsou protoonkoproteiny [62]. Vedle protoonkogenů se na regulaci buněčného cyklu podílí i tumor supresorové geny. Produkty tumor supresorových genů mají vliv na proliferaci normálních somatických buněk a udržují tyto buňky v klidovém stádiu [62]. K maligní transformaci tedy dochází na základě změny v těchto dvou skupinách genů [62].

## 1.2. Faktory ovlivňující karcinogenesi

Na vzniku nádorů se podílí celá řada vnějších faktorů. Tyto faktory se dají rozdělit na tři základní typy [62]:

- Biologické faktory – genetické dispozice a některé viry. Změna imunity vlivem změny genetické informace.
- Fyzikální faktory – hlavním fyzikálním faktorem je záření (UV a ionizující). Dále sem patří některé velmi jemné částice.
- Chemické faktory – k nim se řadí karcinogeny

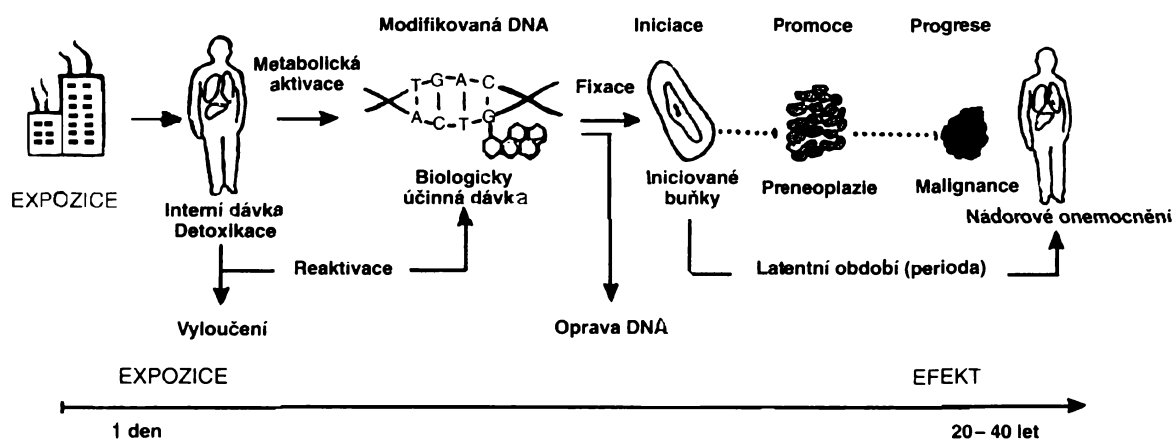
Mezinárodní organizací pro výzkum rakoviny (IARC) bylo označeno více jak 50 látek za prokázané karcinogeny člověka [62]. Podle mechanismu působení je lze rozdělit na [62]:

- Genotoxické karcinogeny – váží se kovalentní vazbou na DNA
- Epigenetické karcinogeny – nekovalentní vazba na DNA

Další skupinou jsou ještě karcinogeny vyvolávající změny struktury DNA, jako je např. „cross-linking.“ Mnohé karcinogeny způsobují modifikace DNA až po metabolické aktivaci [62].

Proces karcinogeneze je možno rozdělit do tří fází (Obr. 1.) [62]:

- Iniclace
- Promoce
- Progrese



**Obrázek 1.** Schéma vícestupňového procesu karcinogenese [62]

Při iniciaci dochází ke změně genetické informace zdravé buňky. Tato změna vede ke vzniku modifikace v DNA. Mutace může přinést iniciované buňce výhodu [38]. Mutace může zůstat bez důsledků řadu let nebo může být eliminována opravnými mechanismy [33]. Pokud není iniciovaná buňka zničena imunitním systémem, může se vyvinout v nádor.

Ve fázi promoce, která může trvat řadu let i desetiletí, se zvyšuje proliferace primárně pozměněných buněk. Většina promotorů je tkáňově specifická [62]. Při jejich metabolismu dochází ke vzniku aktivních forem kyslíku, které mohou vyvolat oxidační změny v DNA, a tak aktivovat protoonkogen. Promoční aktivitu mají např. produkty kouření [73].

V progresní fázi se působením progresorů mění částečně kontrolovaný růst benigního nádoru na růst nekontrolovaný. Vzniká maligní nádor. Buňky z něj odštěpené mohou doputovat do jiných tkání a vytvořit tak metastase [62]. Podmínkou pro růst nádoru je dostatečný přísuv kyslíku a živin.

### 1.3. Metody léčení nádorových onemocnění

V současnosti existují léčebné metody (chirurgický zákrok, radioterapie a chemoterapie), které při vhodné kombinaci mohou vést až k úplnému vyléčení.

Ohraničené nádory, jenž nezasahují do životně důležitých struktur, lze odstranit chirurgicky. Pozůstatky po chirurgickém zákroku lze eliminovat radiotherapií. U nádorů při niž dochází ke vzniku metastasí je nutné užít chemoterapii. Velmi perspektivní z pohledu budoucnosti se jeví genová terapie [32,33].

## 1.4. Chemoterapie

Na tento způsob léčby se klade velký důraz, přesto však nejsou možnosti léčby uspokojivé. Vzhledem k rozdílnosti nádorových onemocnění nejde najít univerzální léčivo, které by fungovalo proti všem typům nádorů [31,32].

Chemoterapie je založená na působení cytostatik. Citlivost nádorů je však pro různé typy nádorů rozdílná. Podle tohoto kritéria může být chemoterapie rozdělena do následujících kategorií [31,32]:

- Primární – základní léčba
- Adjuvantní – doplňuje základní léčbu (chirurgický zákrok, ozáření)
- Neadjuvantní – pro zlepšení operovatelnosti nádoru
- Paliativní – doplňková metoda, umožňuje prodloužení života pacienta

## 1.5. Farmakokinetika cytostatik

Farmakokinetika cytostatik zahrnuje řadu dílčích procesů, které spolu úzce souvisí a vzájemně na sebe navazují [32]:

- Resorpce – rychlost a stupeň resorpce jsou nejvíce ovlivněny aplikační cestou a formou
- Distribuce – Koncentrace cytostatika je dána prokrvením příslušné tkáně. V intravaskulárním prostoru může docházet k vazbě na bílkoviny krevní plasmy nebo jiné krevní elementy a tím snižovat dostupnost léčiva v cílové tkáni.
- Biotransformace – mění účinnost a fyzikálně chemické vlastnosti látky, vznikají polárnější produkty. Metabolické přeměny se účastní jednak enzymy intermediálního metabolismu a jednak enzymy přítomné např. v tzv. mikrosomální frakci buněk. Současné podávání léků může ovlivnit aktivitu biotransformačních enzymů.
- Vylučování – převážně ledvinami. Vylučování ledvinami závisí na extrarenálních faktorech (biotransformace, povaha látky) a na renálních faktorech (glomerulární filtrace, tubulární sekrece a reabsorbce).

## 1.6. Mechanismus účinku cytostatik

Cytotoxický účinek je vysvětlován následujícími mechanismy [32,33]:

- Poškození struktury DNA – např. alkylace nebo rozštěpení, následuje ztráta biologické funkce
- Inhibice klíčových enzymů – následuje porucha biosynthesy nukleových kyselin a inhibice dělení. Látky takto působící se nazývají antimetabolity (např. analogy kyseliny listové či analogy nukleotidů)
- Porucha mikrotubulárního proteinu – látky působící tímto mechanismem se označují jako mitotické jedy, neboť uplatňují svůj účinek převážně v době mitosy. Poškození mikrotubulů poškodí funkci dělicího vřeténka.
- Inhibice proteosynthesy – kvůli značné toxicitě se uplatnilo jen použití L-asparaginasy
- Poškození buněčné membrány

## 1.7. Mikrosomální monooxygenasový systém

Klíčovým enzymovým systémem I. záze biotransformace cizorodých látek včetně karcinogenů a léčiv je systém oxygenas se smíšenou funkcí (MFO). Tento systém katalyzuje širokou škálu oxidačních, oxygenačních případně redukčních reakcí. Využívá přitom hlavně molekulární kyslík [1]. Mikrosomální monooxygenasový systém se skládá ze tří komponent:

- NADPH:cytochrom P450 reduktasy
- Cytochromu P450
- Biologické membrány

Monooxygenasový systém může být lokalizován[1,60]

- V mitochondriální membráně, např. v kůře nadledvin
- Na membráně hladkého i hrubého endoplasmatického retikula v orgánech exponovaných látkám cizorodé povahy (např. játra, plíce). Zde se účastní první fáze jejich biotransformace.

### 1.7.1. Cytochrom P450

Cytochrom P450 (EC 1.14.14.1.) je terminální oxidasou MFO systému [22,60,61]. Zprostředkovává aktivaci molekulárního kyslíku a zabudování jednoho kyslíku do molekuly substrátu [48]. Druhý atom je redukován na vodu [10]. K redukci jsou potřeba elektrony, které jsou dodávány NADPH:cytochrom P450 reduktasou [25,71], případně NADH:cytochrom b<sub>5</sub> reduktasou [71].

Garfinkel s Klingenbergem objevili v jaterních mikrosomech pigment, který po redukci vykazuje v komplexu s oxidem uhelnatým absorpční maximum při 450 nm [21,34]. Hemoproteinový charakter byl dokázán roku 1964 Omurou a Satem. Na základě podobnosti povahy vazby hemu cytochromů b a podle netypického maxima Soretova pásu jej nazvali cytochromem P450 [45].

Z evolučního hlediska je cytochrom P450 považován za velmi starý hemoprotein, který se objevil mnohem dříve než hemoglobin [42,43]. Je příkladem enzymu, který se vyvíjel cestou divergentní evoluce. Z jediného genu cytochromu P450 archebakterií se do současnosti vyvinulo velké množství genů kódujících cytochromy P450 organismů [60]. Systém cytochromu P450 je u eukaryot vázán na membráně endoplasmatického retikula nebo mitochondrií prostřednictvím transmembránového N-terminálního  $\alpha$ -helixu [14]. Bakteriální cytochromy P450 jsou rozpustné enzymy.

Porfyrinový skelet je v proteinové molekule enzymu vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu, která je proximálním ligandem iontu železa v hemu [23]. Jedná se tedy o hemthiolátový protein [60]. Uspořádání mu umožňuje výjimečné chování a odlišuje ho od ostatních hemoproteinů. Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody [16].

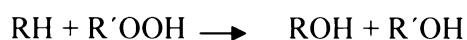
#### Enzymové funkce cytochromů P450

Cytochromy P450 katalyzují následující reakce:

- Oxidasová reakce – aktivace biatomické molekuly kyslíku [6]. Spontánní reakce atmosférického kyslíku s organickou molekulou je spinově zakázaná. Přesto však mají aerobní organismy proteiny, které jsou schopné oxidační potenciál kyslíku využít [6].
- Oxygenasová reakce – zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly málo reaktivního substrátu
- Redukční reakce – elektrony mohou přímo redukovat substrát (xenobiotikum) a nejsou pak využity k aktivaci molekuly kyslíku. Dochází k tomu zejména u

hydrofobních substrátů, které jsou současně i dobrým ligandem iontu železa porfyrinového skeletu, a tvoří šestý ligand místo kyslíku. Tento mechanismus je popsán *in vitro* a existují i nepřímé důkazy pro jeho průběh *in vivo* [60].

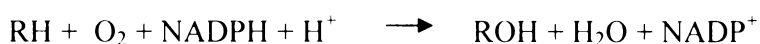
- Peroxidasová aktivita – místo kyslíku je druhým substrátem cytochromu P450 organický peroxid nebo peroxid vodíku [2,61]. Pro průběh reakce není potřeba NADPH jako zdroj elektronů [11,61].



- Produkce  $\text{H}_2\text{O}_2$  a aktivních forem kyslíku – MFO interaguje s látkou, která se obtížně hydroxyluje (tvoří komplex s enzymem, ale těžko se zabudovává kyslík). Proběhne oxidasová reakce cytochromu P450, ale neproběhne už reakce oxygenasová. Aktivní forma kyslíku je uvolněna do okolí [35,60].

### 1.7.2. Reakční mechanismus monooxygenasové reakce

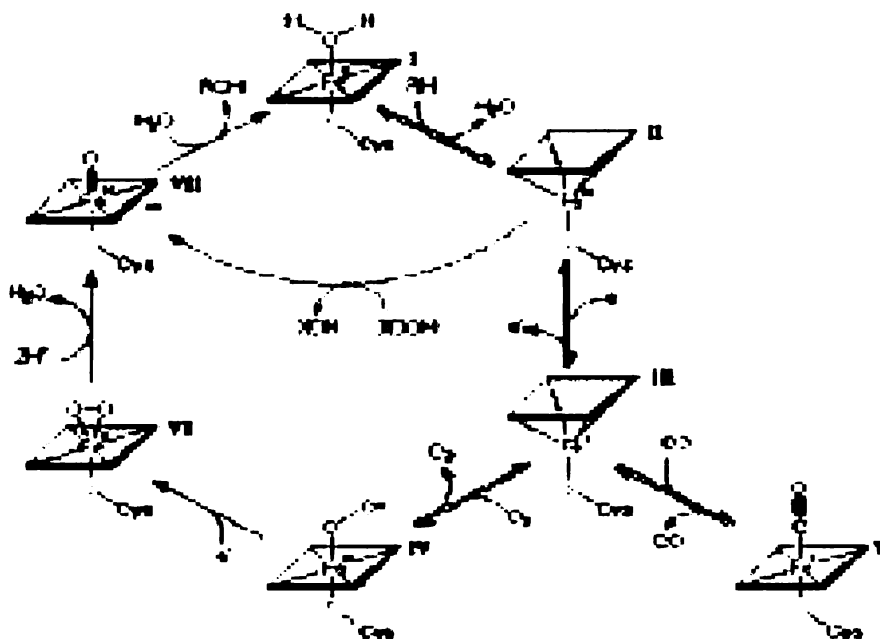
Nejtypičtější reakcí katalyzovanou cytochromy P450 je monooxygenasová reakce, která zahrnuje aktivaci molekulárního kyslíku a zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu. Aktivace kyslíku je umožněna dvěma elektrony pocházejícími z NADPH přenesených NADPH:cytochrom P450 reduktasou, ale donorem druhého elektronu může být i NADH, přenesený NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasou [23]. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Obecný průběh reakce katalyzované cytochromem P450 lze vyjádřit sumární rovnicí



Kde RH je substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce.

Reakční cyklus cytochromů P450 probíhá uspořádaným mechanismem a skládá se z osmi kroků. Schéma je znázorněno na Obr. 2.

- I. V klidovém stavu je hemové železo ve ferri formě (Fe III) a je hexakoordinováno.
- II. Po vniknutí substrátu do aktivního místa dochází k vytlačení šestého ligandu iontu železa, který se stane pentakoordinovaným a nastane konformační změna enzymu [23].
- III. Konformační změny a pokles redoxního potenciálu [23] způsobené navázáním substrátu, umožňují jedoelektronovou redukci cytochromu P450 prostřednictvím NADPH:cytochrom P450 reduktasou. Dochází k redukci železa na ferro formu (Fe II).



**Obrázek 2.** Schéma reakčního mechanismu monooxygenasové reakce [79]

IV. Navázáním molekulárního kyslíku se tvoří ferri-superoxidový komplex, kde je železo hexakoordinované. Tento komplex je dále redukován, díky čemuž dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion.

V. Vazbu kyslíku na formu III (Obr. 2.) jde inhibovat přítomností oxidu uhelnatého

VI. Komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku po druhé redukci je již aktivovanou formou cytochromu P450, v němž dochází k heterolytickému štěpení vazby O=O a vzniku ferrioxenového komplexu.

VII. Ferrioxenový komplex je stabilizován mezomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Tento reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylovaného radikálu vázaného na Fe hemu. Dochází k rekombinaci radikálů za uvolnění hydroxyderivátu substrátu (ROH) z enzymu. Obnovuje se nativní forma cytochromu P450 (I.) [60,68].

### 1.7.3. Nomenklatura cytochromů P450

Cytochromy P450 jsou enzymy s bohatou historií. Již před více jak 3,5 miliardy lety umožňovaly mikroorganismům využívat uhlovodíky jako zdroj energie. U vyšších organismů se postupně začaly podílet na syntéze životně důležitých endogenních látek jakou je

například cholesterol. Postupným vývojem se cytochromy P450 začaly u rostlin účastnit syntézy obranných látek (např. fytoalexinů a fytotoxinů). Naopak živočišné cytochromy P450 si osvojily schopnost jedovaté látky zneškodňovat [55,60].

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (isoenzimech, isoformách), které jsou na základě podobnosti aminokyselinové sekvence (nikoli dle podobnosti substrátů) řazeny do genetických rodin (sekvenční homologie větší než 40 %) a podrodin (homologie větší než 55 %) [78]. Rodiny cytochromů P450 jsou označovány prvním číslem za zkratkou cytochromu P450 (**CYP3**), následuje velké písmeno označující podrodinu (**CYP3A**) [43]. Jednotlivé isoenzymy jsou pak označeny číslem za písmenem podrodiny (**CYP3A4**) [43]. Současná nomenklatura byla navržena Nebertem a spolupracovníky [42].

U člověka byly dosud nalezené formy cytochromů P450 klasifikovány do 18 rodin [78]. Metabolismu léčiv (xenobiotik) se účastní pouze 4 rodiny cytochromů P450: CYP1, CYP2, CYP3, a v menší míře CYP4. Ostatní rodiny participují na metabolismu mastných kyselin, kyseliny arachidonové, biosynthese steroidů, cholesterolu či žlučových kyselin apod. [78].

## 1.8. Cytochrom $b_5$

MFO systém může fakultativně obsahovat také cytochrom  $b_5$ . Cytochrom  $b_5$  je protein, který je umístěn na vnější straně membrány endoplasmatického retikula. Součástí tohoto hemoproteinu je nekovalentně vázaná jedna či dvě molekuly hemu b [74]. Cytochrom  $b_5$  významně ovlivňuje přenos elektronů mnoha oxidačních reakcí: anabolismus lipidů, steroidů, a v neposlední řadě katabolismus xenobiotik a endogenních látek [52].

### 1.8.1. Mechanismy působení cytochromu $b_5$

Působení cytochromu  $b_5$  není zcela objasněné. Mechanismus je vysvětlován čtyřmi odlišnými způsoby [52]:

**1. První předpokládaný mechanismus** zahrnuje přímý přenos elektronu z cytochromu  $b_5$  do monooxygenasového cyklu. V monooxygenasové reakci cytochromů P450 se zdá být rychlost reakce limitována přijetím druhého elektronu, který je třeba k tvorbě více aktivovaného molekulárního kyslíku navázaného na cytochrom P450. Pokud není druhý elektron doručen



dostatečně rychle, dochází k rozpadu komplexu a uvolňuje se superoxidový anionradikál místo oxidovaného substrátu [9,52].

**2. Další variantou** tohoto mechanismu je předpoklad, že se cytochrom  $b_5$  chová jako pozitivní modifikátor monooxygenas tak, že snižuje četnost rozpojení komplexu se superoxidovým anionradikálem. Přes cytochrom  $b_5$  může druhý elektron rychleji vstoupit do monooxygenasové reakce, což zabrání rozpadu komplexu superoxidového aniontu. Vytvoří se tak aktivovaný kyslík, který reaguje se substrátem a tvoří se produkt [52].

**3. Třetí vysvětlení** navrhuje tvorbu dvou-hemoproteinového komplexu mezi cytochromem P450 a cytochromem  $b_5$ . Nekompletní cytochrom P450, tedy za absence cytochromu  $b_5$ , přijímá elektron od reductasy, disociuje vazbu s reduktasou, váže kyslík a znovu tuto vazbu reasociuje a přijímá druhý elektron. Vytvoření komplexu s cytochromem  $b_5$  by posilovalo rychlost formování aktivního kyslíku odstraněním dvojí interakce s reduktasou [52].

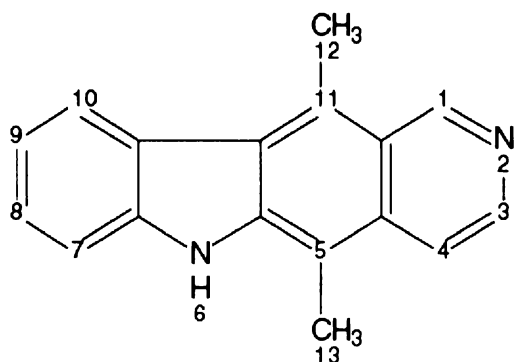
**4. Čtvrtý mechanismus** předpokládá skutečnost, že cytochrom  $b_5$  slouží jako efektor bez oxidačně-redukční role v monooxygenasové reakci. To by potvrzovalo stimulaci některých cytochromů P450 nejen cytochromem  $b_5$ , ale i cytochromem  $b_5$  postrádajícím hem (apocytochrom  $b_5$ ). Cytochrom  $b_5$  v takovém případě pravděpodobně posiluje rozklad oxygenovaného hemoproteinu na produkty nebo usnadní tok elektronů přes systém [52].

### 1.8.2. Vliv cytochromu $b_5$ na reakce katalyzované cytochromy P450

Interakce mezi cytochromem  $b_5$  a cytochromem P450 je vysoce ovlivněna typem cytochromu P450 i navázaným substrátem [77]. Cytochrom  $b_5$  stimuluje řadu reakcí katalyzovaných cytochromy P450 (např. 3A4, 2C9, 17A, 4A7) [76], ale v některých může působit i jako inhibitor. Funkce vlivu cytochromu  $b_5$  je zatím známá pouze u některých isoformů cytochromu P450 a jejich substrátů [52].

## 1.9. Ellipticin

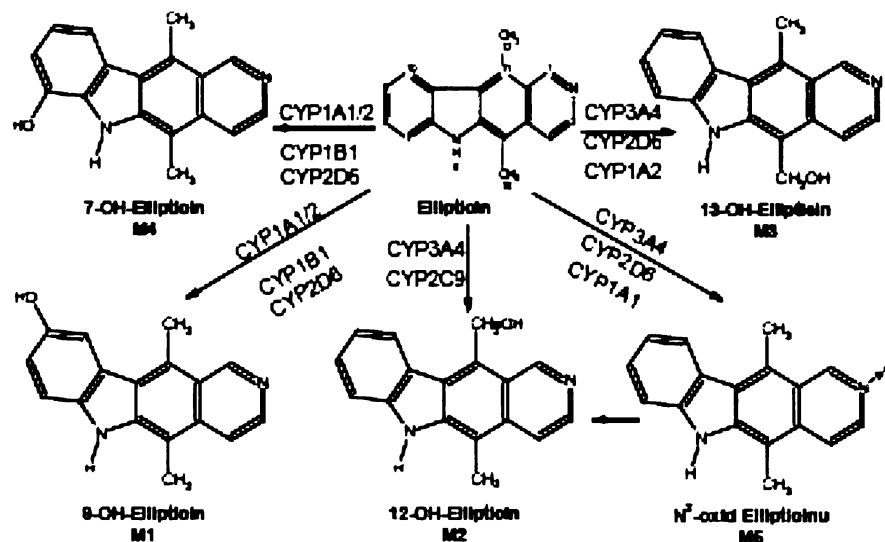
Ellipticin (5,11-dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*] karbazol, Obr. 3. patří mezi pyridokarbazoly a společně s některými jeho deriváty se řadí mezi alkaloidy rostlin čeledi *Apocyanaceae* (*Ochrosia elliptica*, *Ochrosia borbonica*, *Excavatia coccinea*) vykazující výraznou protinádorovou aktivitu [24,37,40,50]. Ellipticin a jeho polárnější deriváty 9-methoxy-ellipticin a 2-methyl-9-hydroxy-ellipticin jsou ve formě acetátu farmakologicky využívány již od 70. let minulého století. Používají se zejména k léčbě pokročilého karcinomu prsu s kostními metastasemi, sarkomů ledvin, karcinomu štítné žlázy a akutní myeloblastické leukémie [3,29,30,33,39]. Ellipticin vykazuje také anti-HIV aktivitu. Způsobuje inhibici retrovirové integrasy, proto se zkoumá i jeho možné použití při léčbě AIDS [40,51]. Předností tohoto protinádorového léčiva je jeho vysoká účinnost proti nádorovým onemocněním a současně nízké vedlejší toxické účinky. Projevují se jen jako nevolnost a zvracení [46]. Vzácně se může objevit nefrotoxicita, která je svým mechanismem podobná nefrotoxicitě cisplatinu [17,33]. Hematologická toxicita je dokonce prakticky nulová [13,33].



**Obrázek 3.** *Struktura ellipticinu [57]*

### 1.9.1. Biotransformace ellipticinu

Ellipticin je v organismech přeměňován na 5 metabolitů (Obr. 4.) [67]. Metabolity 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N<sup>2</sup>-oxid ellipticinu (M5) jsou tvořeny nejen cytochromy P450 lidských jaterních mikrosomů, ale rovněž byly tvořeny i u mikrosomů modelových organismů (potkan a králík) [56,57,58,64,67].



Obrázek 4. Schéma metabolismu ellipticinu lidskými cytochromy P-450 [67]

### 1.9.2. Mechanismy protinádorového působení ellipticinu

Předpokládaný protinádorový účinek ellipticinu je vysvětlován několika mechanismy:

**Interkalace do dvoušroubovicové molekuly DNA** [4,5,7,12,33], která vyplývá z velikosti a tvaru molekuly ellipticinu. Vzájemné interakce ellipticinu s DNA jsou způsobeny slabými reversibilními hydrofobními interakcemi s bázemi molekuly DNA [5]. Pro orientaci této sloučeniny v DNA je rozhodující interakce mezi methylovou skupinou ellipticinu a thyminem v interkalačním místě [28,54]. Díky své fluorescenci je ellipticin používán i jako modelová interkalační sloučenina [28,54,55].

**Inhibice topoisomerasy II** je stále předmětem intenzivního výzkumu [18,20,41]. Ellipticin interaguje buď s molekulou DNA nebo s proteinem topoisomerasy II za tvorby ternárního komplexu, který je katalyticky neaktivní a vede ke stimulaci tvorby řetězových zlomů v DNA [18,20,27,41,49,72].

**Selektivní inhibice fosforylace proteinu p53** [44,69] je zapříčiněna inhibicí specifické cyklín-dependentní kinasy ellipticinem. Nahromadění defosforylovaného proteinu p53 může vyústit v indukci apoptosy.

**Inhibice oxidační fosforylace** [15,53] je způsobena ellipticinem, který je akumulován kromě jádra také v mitochondriích [70]. Inhibuje zde oxidační fosforylaci, což vede k drastickému snížení obsahu ATP v buňce.

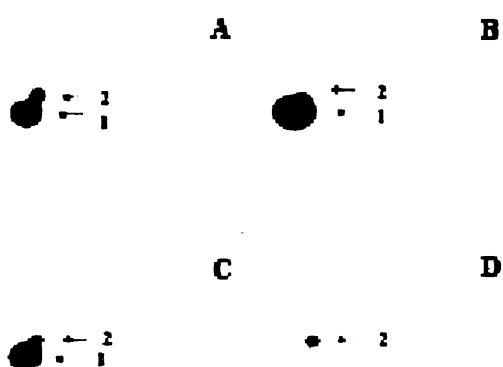
**Inhibice telomerasy** [5].

Všechny výše zmíněné mechanismy účinku jsou založeny na nespecifickém působení ellipticinů, což je v rozporu s jejich poměrně úzkou specifitou účinku vůči určitým typům neoplasie [59]. Velmi důležitým aspektem pozorovaným při terapii ellipticiny je navíc individuální variabilita v odpovědi pacientů na podané léčivo [59]. Je tudíž vysoce pravděpodobné, že specifické působení ellipticinu musí být odvozeno ještě z dosud neznámých principů [59]. Jedním z vysvětlení specifity chemoterapeutického účinku i selektivní odpovědi na podané léčivo může být rozdílná enzymová výbava lidského organismu takovými enzymy, které jsou důležité pro biotransformaci ellipticinu [59]. Příslušné enzymy mohou aktivovat léčivo na terapeuticky účinnější derivát, který pak buňky novotvaru poškozuje efektivněji, popřípadě vede až k jejich likvidaci [59].

### 1.9.3. Tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA

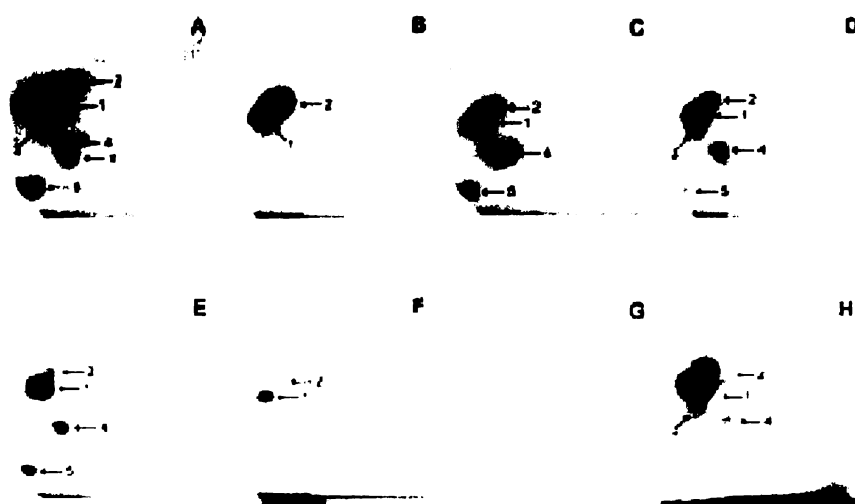
Mechanismem působení ellipticinu objeveným nedávno je tvorba kovalentních aduktů s DNA [19,56,58,64,67]. V průběhu biotransformace ellipticinu vznikají metabolity schopné kovalentní vazby s DNA. Tato skutečnost byla potvrzena pomocí dvou nezávislých metod, vazbou [<sup>3</sup>H] ellipticinu a metodou „<sup>32</sup>P-postlabeling“ [65].

Ve všech testovaných systémech [67] v podmínkách *in vitro* se tvoří dva adukty s DNA (Obr. 5.): majoritní adukt 1 a minoritní adukt 2 [56]. Tvorba majoritního aduktu 1 je závislá na metabolické aktivaci cytochromy P450, minoritní adukt 2 vzniká i v nepřítomnosti enzymového systému, pravděpodobně aktivací ellipticinu autooxidací [56,64].



**Obrázek 5.** Autoradiografie aduktu ellipticinu s DNA separovaných metodou „<sup>32</sup>P-postlabeling“. K aktivaci byly použity (A) mikrosomy potkana, (B) králíka, (C) mikrosomy lidské a (D) vzorek bez mikrosomu [64].

K tvorbě kovalentních aduktů ellipticinu s DNA (viz výše) dochází také v plicích fibroblastických buňkách křečka (V-79) transfekovaných lidskými CYP [19]. Ellipticin dále generuje kovalentní adukty *in vivo* v některých orgánech (játra, slezina, plíce, ledviny, srdce, mozek) potkana exponovaného tomuto protinádorovému léčivu (Obr. 6. ) [58] a i v buněčných liniích lidského prsního adenokarcinomu (buňky MCF-7) [8]. V těchto případech vznikají i další minoritní adukty. „Kochromatografií“ tvořených aduktů pomocí TLC a HPLC bylo zjištěno, že se ve všech případech jedná o shodné adukty 1 a 2 [8,19,58,64]. Cílovým deoxynukleotidem modifikovaným aktivovaným ellipticinem v DNA je deoxyguanosin [64]. Jako metabolity zodpovědné za tvorbu kovalentních aduktů byly určeny 13-hydroxyellipticin (M3), který tvoří majoritní adukt 1 vazbou s deoxyguanosinem v DNA, a 12-hydroxyellipticin (M2) eventuálně N<sup>2</sup>-oxid ellipticinu (M5), z něhož vzniká 12-hydroxyellipticin Polonowského přesmykem [67], jejichž vazbou na DNA vzniká adukt minoritní [67].



**Obrázek 6.** Autoradiografie aduktu tvořených v DNA (A) jater, (B) sleziny, (C) plic, (D) ledvin, (E) srdce, (F) mozku, (G) testes potkanu vystavených působení ellipticinu a (H) kontrola znázorňující adukty v DNA tvořené ellipticinem aktivovaným lidským CYP3A4 *in vitro*. Adukt X není generován ellipticinem [58].

## **2. Cíl bakalářské práce**

Cílem předkládané bakalářské práce bylo studium oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4. Konkrétně se jednalo o poznání vlivu cytochromu b<sub>5</sub> na tuto oxidaci. Cytochrom b<sub>5</sub> je protein, který je fakultativní složkou systému oxidas se smíšenou funkcí a mechanismus jeho působení v tomto systému není ještě plně osvětlen. Cílem práce bylo rovněž izolovat mikrosomální frakci z jater laboratorních potkanů premedikovaných induktorem cytochromů P450 3A, pregnenolon-karbonitrilem, a seznámit se tak se základní metodikou využitelnou pro další isolační postupy těchto cytochromů P450.

Bakalářská práce byla vypracována jako součást grantových projektů GAČR (303/09/0472) a MŠMT ČR (MSM 0021620808 a 1M0505).

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Materiál a chemikálie

Materiál a chemikálie, použité při vypracování bakalářské práce, pocházejí z následujících zdrojů.

Fluka (Švýcarsko)

Methanol

Linde (Česká Republika)

Oxid uhelnatý

Lachema Brno (Česká Republika)

CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O, dithioničitan sodný, EDTA Na<sub>2</sub>, ethylacetát, glycerol, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, kyselina octová, methanol, MgCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH, tartarát sodný

Merck (Německo)

Ethylacetát

Reanal Budapešť (Maďarsko)

Glukosa-6-fosfát

Sevapharma, a.s. (Česká Republika)

Hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma (USA)

4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), dimethylsulfoxid (DMSO), cytochrom c, ellipticin, fenacetin, heptansulfonát sodný, NADPH, NADP<sup>+</sup>, superoxiddismutasa (SOD), pregnenolon-karbonitril (PCN), fenylmethanesulfonylfluorid (PMSF), glukosa-6-fosfát dehydrogenasa

Použité isoformy cytochromu P450, další enzymové preparáty a králičí jaterní cytochrom b<sub>5</sub> byly izolovány v laboratořích katedry biochemie PřF UK. Apo cytochrom b<sub>5</sub> byl připraven v laboratoři katedry biochemie PřF UK postupem popsaným v práci [36].

### 3.2. Použité přístroje

#### Automatické pipety

BioHit (Finsko), Nichiryu (Japonsko)

#### Centrifugy

Sanyo Microntaur MSE (Velká Británie), Beckman LE-80K (USA), Janetzki K-23 (Německo)

#### Spektrofotometry

Hewlett Packard E8453 (USA), Spektronom 195 D (Maďarsko), Specord M40 (Německo)

#### System HPLC

Dionex: P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S, kolona Ultrasphere, ODS, C18, 250 x 4.6 mm, 5 μm, Beckman (USA)

#### Váhy

Analytické váhy PESA 40SM-200A (Švýcarsko), předvážky KERN EW600-2M (Německo)

#### Další přístroje

pH metr ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (USA), sonikátor Ultrasonic Compact Cleaner Teson1 Tesla (Česká Republika), vortex MS 1 Minishaker (Německo), „třepačka“ IKA VX2 Janke & kunkel (Německo), thermomixer Eppendorf (Německo), termostatová lázeň Julabo TW8 Schoeller Instruments (Německo), magnetická míchačka Variomag Monotherm (Německo)



### 3.3. Metody

#### 3.3.1. Stanovení koncentrace proteinu metodou se 4,4'-dikarboxy-2,2'- bicinchoninovou kyselinou (BCA)

Koncentrace proteinu byla určována metodou dle Wiechelmana [75], při které se využívá tvorby modře zabarveného komplexu měďných iontů s BCA v alkalickém prostředí. Postranní skupiny některých aminokyselin totiž redukují měďnaté ionty přítomné v činidle (stabilizované jako vínanový komplex) na měďné, intenzita zabarvení ( $A_{562}$ ) je pak přímo úměrná koncentraci bílkoviny.

Činidlo pro stanovení koncentrace proteinu bylo těsně před použitím připraveno rozpuštěním BCA ve 49 dílech **roztoku A** (0,4% NaOH; 0,95% NaHCO<sub>3</sub>; 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,16 % tartarát sodný; pH 11,25) tak, aby výsledná koncentrace byla 1% BCA v 50 dílech. Dále byl přidán 1 díl **roztoku B** (4% CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O v destilované vodě).

Ke 20 μl vzorku (ředěného podle potřeby destilovanou vodou) bylo přidáno do pečlivě vyžíhaných zkumavek 480 μl činidla. Pro sestrojení kalibrační křivky bylo pipetováno 20 μl roztoku BSA o známé koncentraci a přidáno 20 μl destilované vody. Dále se pokračovalo ředěním tzv. „dvojkovou řadou,“ přičemž se vždy odebralo 20 μl z předchozího roztoku a přidalo se 20 μl destilované vody. Takto připravené roztoky byly přidány k 480 μl činidla. Připravené roztoky byly inkubovány při teplotě 60°C po dobu 45 minut. Po jejich ochlazení byla měřena absorbance standardních roztoků BSA při 562 nm proti „slepému“ vzorku, který obsahoval místo roztoku bílkoviny 20 μl destilované vody. Shodným způsobem byla proměřena i absorbance vzorků. Z hodnot získaných měření byla sestrojena kalibrační křivka. Ta dále sloužila k určení koncentrace proteinu ve vzorcích. Měření bylo provedeno na přístroji Spektromom 195 D v 0,5 ml kyvetě o optické dráze 1 cm.

#### 3.3.2. Premedikace laboratorních potkanů pregnenolon-karbonitrilem

Premedikace a další manipulace s laboratorními potkany byly prováděny v komerčním zařízení 1. LF UK v Praze. K premedikaci byli použiti samci laboratorních potkanů kmene Wistar o hmotnosti 100-120 g, kteří byli drženi při teplotě 22±2°C. Voda a granulovaná strava jim byla podávána ad libitum. Premedikace byla zahájena zhruba týdenní aklimatizací. Den před zabitím byla strava potkanům odebrána.

Pregnenolon-karbonitril (PCN) byl rozpuštěn v rostliném oleji Vegetol (4 mg/ml). Premedikace byla prováděna intraperitoneálně, po dobu tří za sebou následujících dnů v dávkách 60 mg PCN na 1 kg hmotnosti zvířete. Čtvrtý den byla zvířata usmrcena a provedena izolace subcelulárních frakcí z jaterní tkáně.

### **3.3.3. Isolace mikrosomální frakce z jaterní tkáně laboratorního potkana**

Vyjmutá a opláchnutá játra byla vložena do předem zváženého ledového roztoku pufru P1 (153 mM KCl, 10 mM EDTANa<sub>2</sub>, 0,5 mM PMSF, 50 μM vit E, pH 7,5) a z nárůstu hmotnosti byla určena hmotnost tkáně. Jaterní tkáň byla rozstříhána na malé kousky a několikrát promyta pufrům P1 pro co nejdokonalejší odkrvení. Poté byla po malých dávkách homogenisována dle Pottera a Elvehjema s roztokem P1, jehož celkový objem v ml odpovídal 4krát hmotnosti jaterní tkáně (g). Homogenát byl filtrován přes čtyřikrát složenou gázu. Získané homogenáty byly odstředěny 10 min při 2000 RPM (centrifuga Janetzki K-23, Německo) ve výkyvném rotoru 4 x 70 ml za chlazení na 4°C. Supernatant byl uchován v chladu a sediment rehomogenisován s ¼ původního objemu roztoku P1 a zpracován za výše uvedených podmínek. Spojené supernatanty byly centrifugovány po dobu 20 min při 13000 RPM (centrifuga Janetzki K-24, Německo) v úhlovém rotoru 6 x 35 ml za chlazení na 4°C. Kyvety mohou být plněny maximálně do 2/3 výšky. Supernatant byl velmi opatrně odlit přes sediment bez kontaminace tzv. lehce sedlou vrstvou (mitochondrie). Z takto získaného supernatantu byla připravena mikrosomální frakce ultracentrifugací 65 min při 45000 RPM (centrifuga Beckman LE-80K, úhlový rotor 45 Ti, 6 x 94 ml). Supernatant po centrifugaci je cytosolární frakce. Bílý tukový povlak ze stěn kyvet byl setřen smotkem gázy. Peleta mikrosomů byla resuspendována v asi dvojnásobném množství pufru P2 (100 mM Na<sub>2</sub>P<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 100 mM KCl, 1 mM EDTANa<sub>2</sub>, pH 7,5). Z homogenní suspenze byla připravena finální mikrosomální frakce ultracentrifugací 65 min za výše uvedených podmínek. Mikrosomální sediment byl resuspendován v pufru P3 (0,25 mM sacharosa, 10 mM EDTANa<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 250 μM vit E, 1 mM DTT, pH 7,5) v objemu odpovídajícím 1/5 původní hmotnosti jater a rehomogenisován pomocí malého homogenisátoru. Výsledný mikrosomální preparát byl pipetován po alikvotech (1 ml) do mikrozkuvek eppendorf a zmražen v kapalném dusíku. Následně byly alikvoty uloženy do mrazicího boxu a skladovány při -80°C.

### 3.3.4. Stanovení obsahu cytochromu P450

Protože cytochromy P450 nemají žádný společný substrát, který by umožnil stanovení aktivity celkového cytochromu P450, využívá se k určení jeho specifického obsahu charakteristické absorpce jeho komplexu v redukovaném stavu s oxidem uhelnatým při 450 nm [45].

Ke 40  $\mu\text{l}$  vzorku doplněných 1960  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru (0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; obsahující 2% glycerol; pH 7,5) bylo přidáno malé množství (~5 mg) dithioničitanu sodného, čímž došlo k redukci cytochromu P450. Po promíchání byl vzorek rozdělen do dvou kyvet o optické dráze 1 cm a na dvoupráskovém přístroji Specord M40 proměřena základní linie („base line“) v rozmezí vlnových délek 400 až 510 nm. Vzorková kyveta byla následně sycena po dobu 45 sekund proudem oxidu uhelnatého a poté měřeno diferenční spektrum.

Koncentrace cytochromu P450 byla vypočtena ze vzorce:

$$c_{\text{P450}} = (A_{450} - A_{490} / \epsilon_{\text{P450}}) \cdot \text{ředění } [\mu\text{M}]$$

$c_{\text{P450}}$  .....koncentrace cytochromu P450

$A_{\lambda}$  .....absorbance při vlnové délce  $\lambda$  nm

$\epsilon_{\text{P450}}$  .....molární absorpční koeficient cytochromu P450 ( $\epsilon = 0,091 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ )

### 3.3.5. Oxidace ellipticinu cytochromy P450 za přítomnosti různých proteiny

Inkubační směs o objemu 0.25 ml byla vždy připravena ve dvou paralelních vzorcích a obsahovala:

- 50 nM cytochrom P450
- 10  $\mu\text{M}$  ellipticin (2.5 mM zásobní roztok v DMSO)
- 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM  $\text{NADP}^+$ ; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-generující systém)
- fosfátový pufr (100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7.4)
- 250 nM protein (cytochrom  $b_5$ , rekombinantní apo-cytochrom  $b_5$ , rekombinantní apo-cytochrom  $b_5$  rekonstituovaný s hemem, lidský sérový albumin, cytochrom c, myoglobin, lysozym nebo SOD) nebo hemin

Reakce byla startována přidáním 25  $\mu$ l NADPH-generujícího systému, roztoky byly inkubovány za stálého míchání (450 RPM) v Eppendorfových zkumavkách za přístupu kyslíku po dobu 20 minut při teplotě 37 °C. Následně bylo do každé zkumavky přidáno 5  $\mu$ l fenacetinu (1 mM roztok v methanolu) jako vnitřního standardu pro HPLC a reakce byla terminována extrakcí 2 x 1 ml ethylacetátu. Po intenzivním třepání (MS 1 Minishaker) byly obě fáze odděleny centrifugací při 13 000 RPM po dobu 3 minut (Sanyo Microcentaur MSE).

Organická fáze byla odebrána a odpařena dosucha proudem  $N_2$ . Vzorky byly před další analýzou uchovávány při teplotě -20°C.

### **3.3.6. Oxidace ellipticinu cytochromy P450 za přítomnosti cytochromu $b_5$ – závislost na koncentraci různých forem cytochromu $b_5$**

Inkubační směs o objemu 0,25 ml byla vždy připravena ve dvou paralelních vzorcích a obsahovala:

- 50 nM cytochrom P450
- 10  $\mu$ M ellipticin (2,5 mM zásobní roztok v DMSO)
- 10 mM  $MgCl_2$ ; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM  $NADP^+$ ; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-generující systém)
- fosfátový pufr (100 mM  $KH_2PO_4$ ; pH 7.4)
- 50, 150 nebo 250 nM protein (cytochrom  $b_5$ , rekombinantní apo-cytochrom  $b_5$  nebo rekombinantní apo-cytochrom  $b_5$  rekonstituovaný s hemem)

Reakce byla startována 25  $\mu$ l NADPH-generujícího systému, roztoky byly inkubovány za stálého míchání (450 RPM) v Eppendorfových zkumavkách za přístupu kyslíku po dobu 20 minut při teplotě 37 °C. Následně bylo do každé zkumavky přidáno 5  $\mu$ l fenacetinu (1 mM roztok v methanolu) jako vnitřního standardu pro HPLC a reakce byla terminována extrakcí 2 x 1 ml ethylacetátu. Po intenzivním třepání (MS 1 Minishaker) byly obě fáze odděleny centrifugací při 13 000 RPM po dobu 3 minut (Sanyo Microcentaur MSE).

Organická fáze byla odebrána a odpařena dosucha proudem  $N_2$ . Vzorky byly před další analýzou uchovávány při teplotě -20°C.

### 3.3.7. Oxidace ellipticinu cytochromy P450 za přítomnosti NADPH a NADPH-generujícího systému

Inkubační směs o objemu 0,25 ml byla vždy připravena ve dvou paralelních vzorcích a obsahovala:

- 50 nM cytochrom P450
- 10  $\mu$ M ellipticin (2,5 mM zásobní roztok v DMSO)
- fosfátový pufr (100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,4)
- 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM  $\text{NADP}^+$ . 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-generující systém) nebo 1 mM NADPH
- Polovina vzorků obsahovala navíc 250 nM cytochrom  $b_5$ .

Reakce byla startována 25  $\mu$ l NADPH-generujícího systému nebo NADPH, roztoky byly inkubovány za stálého míchání (450 RPM) v Eppendorfových zkumavkách za přístupu kyslíku po dobu 20 minut při teplotě 37 °C. Následně bylo do každé zkumavky přidáno 5  $\mu$ l fenacetinu (1 mM roztok v methanolu) jako vnitřního standardu pro HPLC a reakce byla terminována extrakcí 2 x 1 ml ethylacetátu. Po intenzivním třepání (MS 1 Minishaker) byly obě fáze odděleny centrifugací při 13 000 RPM po dobu 3 minut (Sanyo Microcentaur MSE).

Organická fáze byla odebrána a odpařena dosucha proudem  $\text{N}_2$ . Vzorky byly před další analýzou uchovávány při teplotě -20°C.

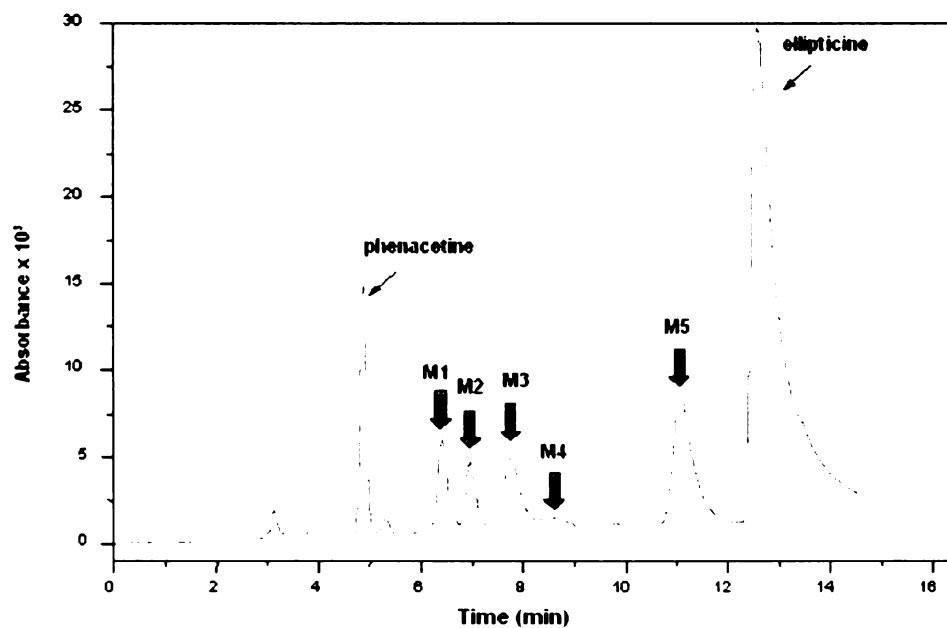
### 3.3.8. Separace metabolitů ellipticinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)

Vzorky, obsahující jednotlivé metabolity ellipticinu připravené postupy popsány v kapitolách 3.3.5., 3.3.6. a 3.3.7., byly rozpuštěny ve 25  $\mu$ l methanolu a ellipticin a jeho metabolity byly separovány pomocí HPLC za použití mobilní fáze s 1-heptansulfonovou kyselinou. Sonikací byly vždy před použitím z mobilní fáze odstraněny vzduchové bubliny. Podmínky pro HPLC jsou uvedeny v *tabulce 1*.

Tabulka 1. Podmínky HPLC pro separování ellipticinu a jeho metabolitů

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

Příklad separace ellipticinu a jeho metabolitů tvořených cytochromem P450 3A4 pomocí HPLC je uveden na Obr. 7.



Obrázek 7. HPLC ellipticinu a jeho metabolitu tvořených oxidací cytochromy P450 [57].

## 4. Výsledky

### 4.1. Isolace jaterních mikrosomů potkana premedikovaného induktorem cytochromu P450 3A4 pregnenolon-karbonitrilem (PCN)

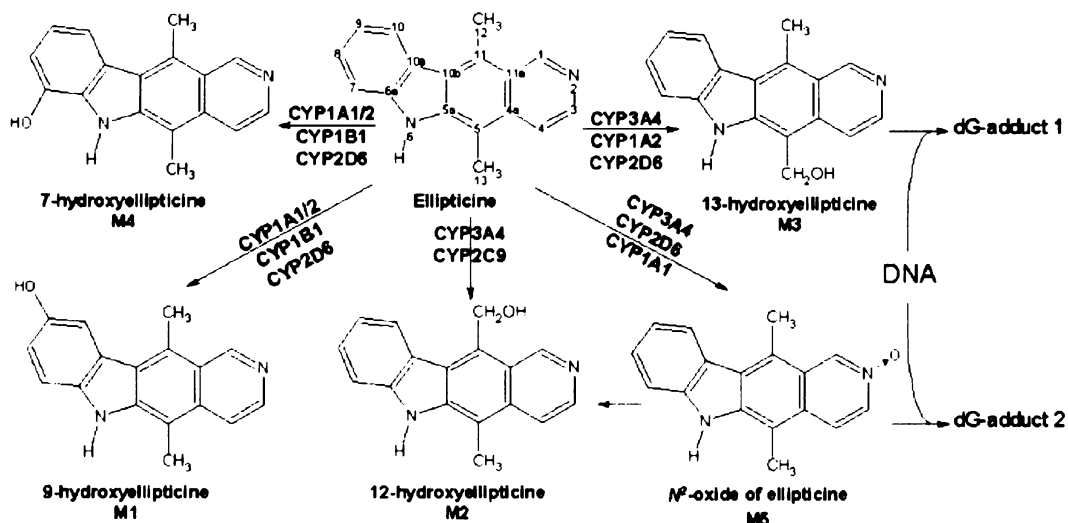
Jaterní mikrosomy byly izolovány z jater potkanů premedikovaných PCN postupem popsaným v kapitole 3.3.3. Z hlediska jejich charakterisace je nutné určit specifický obsah cytochromu P450. Princip a postupy stanovení celkového množství proteinů i koncentrace cytochromu P450 použité pro určení specifického obsahu cytochromu P450 jsou uvedeny v kapitolách 3.3.1. a 3.3.4.

Celková koncentrace proteinů v mikrosomální frakci bylo stanoveno na základě reakce s BCA [75] a má hodnotu 11,6 mg/ml. Stanovení proběhlo 3 měsíce po izolaci mikrosomů. Koncentrace cytochromu P450 byla stanovena dvakrát v různých časových intervalech po izolaci mikrosomální frakce. Ihned po jejich izolaci a opakovaně 3 měsíce po izolaci. Koncentrace cytochromu P450 zjištěná ihned po izolaci mikrosomů byla 65,5  $\mu\text{M}$ . Koncentrace zjištěná při měření 3 měsíce po izolaci mikrosomů byla však nižší, 45,2  $\mu\text{M}$ . Rozdíl v koncentraci cytochromu P450 může být dán ztrátou biologicky funkčního stavu proteinu během jeho zmrazení a opětovném rozmrazení. Druhou zjištěnou hodnotu koncentrace cytochromu P450 lze považovat za skutečnou (finální) koncentraci enzymu. Specifický obsah cytochromu P450 v jaterních mikrosomech potkana premedikovaného PCN má hodnotu 3,9 nmol cytochromu P450 na mg proteinu. Isolované mikrosomy budou dále využity pro další experimenty v laboratoři, kde byla bakalářská práce vypracována.

### 4.2. Oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4

Jak bylo zjištěno v předchozích studiích [57,66,67], je ellipticin jaterními cytochromy P450 oxidován na pět metabolitů: 9-hydroxyellipticin(M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N<sup>2</sup>-oxid ellipticinu (M5), (Obr. 8.). V těchto studiích bylo rovněž zjištěno, že se na vzniku 7-hydroxyellipticinu (M4) a 9-hydroxyellipticinu (M1) podílí především cytochromy P450 1A1 a 1A2 [57,67]. Další tři metabolity 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a N<sup>2</sup>-oxid ellipticinu (M5) jsou produkovány především za katalýzy cytochromem P450 3A4 [57,67]. Jak je však patrné z Obr. 8., existují i další jaterní cytochromy P450, které se na oxidaci ellipticinu na tyto metabolity podílí, nejsou ale v tomto směru tak významné jako cytochrom P450 3A4.

Předkládaná bakalářská práce se proto zabývá oxidací ellipticinu cytochromem P450 3A4 detailně.



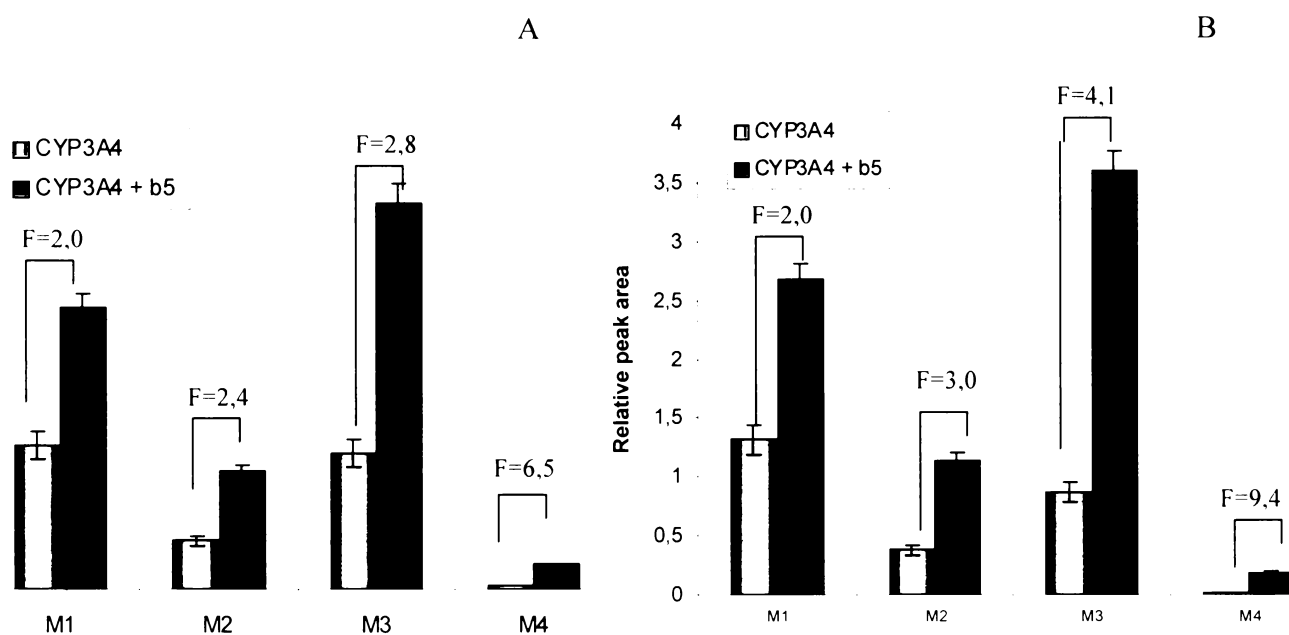
Obrázek 8. Oxidace ellipticinu cytochromy P-450 [66,67].

### 4.3. Oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4 za přítomnosti NADPH nebo NADPH-generujícího systému

V první fázi výzkumu jsme sledovali, zda oxidaci ellipticinu systémem cytochromu P450 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou, jak bez cytochromu b<sub>5</sub>, tak tímto enzymovým systémem za přítomnosti tohoto proteinu (cyt b<sub>5</sub>), ovlivňuje přítomnost NADPH jako chemické sloučeniny nebo této sloučeniny kontinuálně tvořeného systémem, který NADPH generuje (NADPH-generující systém). Na produkci 9-hydroxyellipticinu (M1) cytochromem P450 3A4 nemá záměna NADPH NADPH-generujícím systémem žádný vliv, a to jak v systému samotného cytochromu P450 3A4 či za přítomnosti cyt b<sub>5</sub>. U dalších metabolitů, 12-hydroxyellipticinu (M2), 13-hydroxyellipticinu (M3) a 7-hydroxyellipticinu (M4), není poměr jejich tvorby samotným cytochromem P450 3A4 a tímto enzymem za přítomnosti cyt b<sub>5</sub> stejný. V systému obsahujícím NADPH svědčí poměr mezi jejich tvorbou samotným cytochromem P450 3A4 a cytochromem P450 3A4 s cyt b<sub>5</sub> o zvýšení jejich produkce za přítomnosti cyt b<sub>5</sub> (Obr. 9.). Tento výsledek je patrný také v případě metabolitu 13-hydroxyellipticinu, jehož množství tvořeného cytochromem P450 3A4 za účasti NADPH je 4.1krát větší v přítomnosti cyt b<sub>5</sub> než bez tohoto proteinu. Za účasti NADPH-generujícího systému je jeho produkce za přítomnosti cyt b<sub>5</sub> vyšší pouze 2.8krát než bez tohoto proteinu.



Uvedený výsledek lze vysvětlit skutečností, že protein glukosa-6-fosfátdehydrogenasy přítomný v NADPH generujícím systému může být cílem vazby tohoto reaktivního metabolitu ellipticinu. Tím pak dochází ke snížení jeho měřeného množství. Tvorba metabolitu M5 (N<sup>2</sup>-oxid ellipticinu) nebyla kvantifikována vzhledem k tomu, že retenční čas jeho eluce pomocí HPLC byl velmi blízký elučnímu času ellipticinu. Píky obou sloučenin se částečně překrývaly.

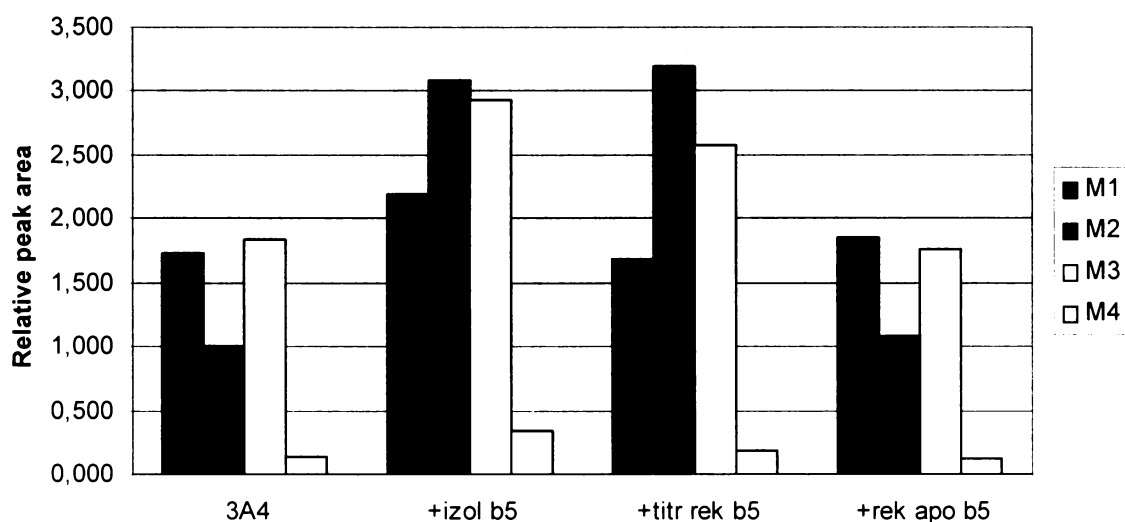


**Obrázek 9.** Vliv NADPH a NADPH-generujícího systému na oxidaci ellipticinu lidským cytochromem P450 3A4 za přítomnosti cytochromu b<sub>5</sub> a bez tohoto proteinu. Reakce byly iniciovány A) NADPH generujícím systémem a B) NADPH. Výsledky uvedené v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních měření.

#### 4.4. Vliv cytochromu b<sub>5</sub> na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A4

Cytochrom P450 3A4 vyžaduje v řadě reakcí pro jejich optimální průběh spoluúčast cytochromu b<sub>5</sub>. Zajímalo nás tedy, jaký bude mít tento protein vliv na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A4. Testovali jsme vliv několika forem tohoto proteinu [nativního cyt b<sub>5</sub>, izolovaného z jater králíka, rekombinantního apo-cyt b<sub>5</sub> (cytochrom b<sub>5</sub> bez hemu) a rekombinantního cyt b<sub>5</sub> rekonstituovaného s hemem. Proteiny cytochromu b<sub>5</sub> byly použity v pětinasobných koncentracích vůči cytochromu P450 3A4.

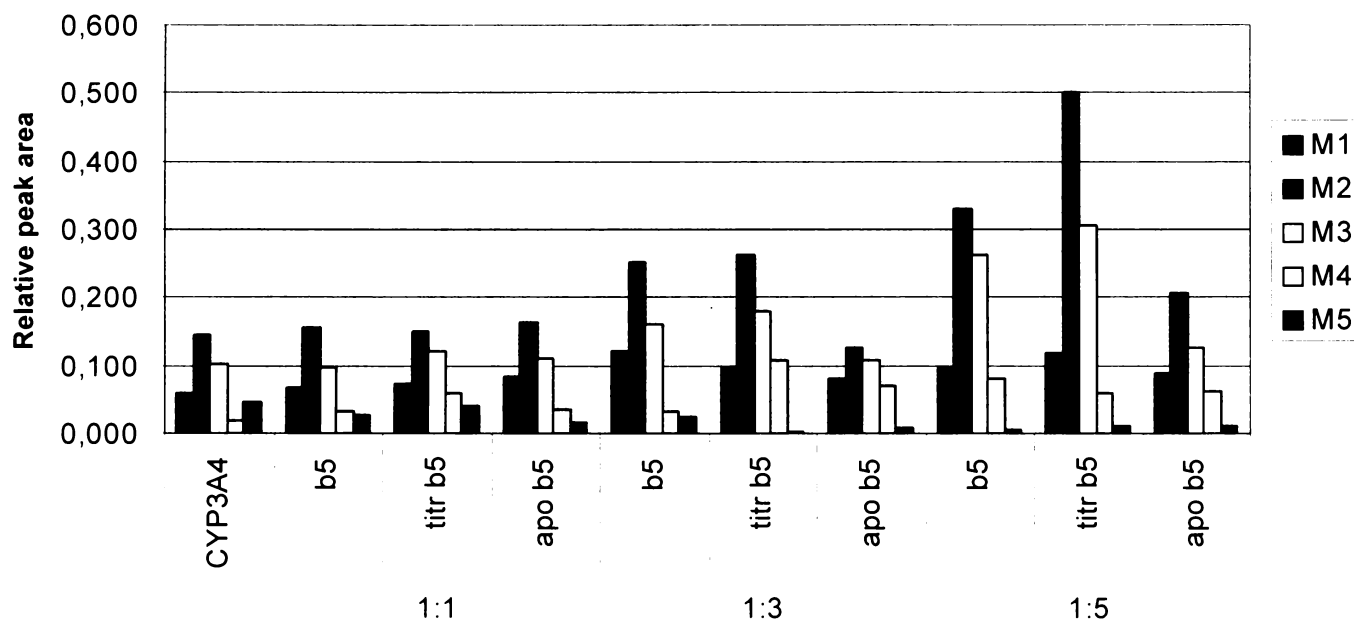
Z Obr. 10 je patrné, že nativní cyt  $b_5$  stimuloval tvorbu všech čtyř sledovaných metabolitů. Nejvíce však byla potencována tvorba 12-hydroxyellipticinu a 13-hydroxyellipticinu. Jak již bylo uvedeno výše, oba tyto metabolity jsou přednostně tvořeny právě cytochromem P450 3A4, a oba se podílí na vzniku aduktů s DNA. Rekombinantní cyt  $b_5$  připravený rekonstitucí apo-cyt  $b_5$  s hemem vykazoval podobný efekt. Pouze množství dalších dvou metabolitů 9-hydroxyellipticinu a 7-hydroxyellipticinu tento cyt  $b_5$  nezvyšoval. Rekombinantní apo forma cyt  $b_5$  oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A4 prakticky neovlivňovala (Obr. 10.).



**Obrázek 10.** Vliv různých forem cytochromu  $b_5$  na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A4. Vzorek označený jako 3A4 je kontrolní vzorek, který obsahoval pouze cytochrom P450 3A4 o celkovém látkovém množství 12,5 pmol. Izol  $b_5$  - CYP3A4 a 62,5 pmol nativního cytochromu  $b_5$ . Titr rek.  $b_5$  - CYP3A4 a 62,5 pmol rekombinantního apo-cytochromu  $b_5$  rekonstituovaného s hemem. Rek. apo  $b_5$  - CYP3A4 a 62,5 pmol rekombinantní apo-cytochrm  $b_5$ . 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a 7-hydroxyellipticin (M4). Výsledky uvedené v obrázku jsou průměry ze dvou měření.

Vzhledem ke stimulačnímu vlivu cyt  $b_5$ , a to jak nativního tak jeho rekombinantní apo-formy rekonstituované s hemem, bylo v dalších experimentech sledováno, za jakých koncentrací cyt  $b_5$  ke stimulaci oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4 dochází. Při poměru cytochromu P450 3A4:cyt  $b_5$  1:1 nebyla stimulace oxidace ellipticinu pozorována, a to žádnou formou cyt  $b_5$ . Při poměru těchto proteinů 1:3, cyt  $b_5$  stimuloval tvorbu především 12-hydroxyellipticinu a 13-hydroxyellipticinu. Za použití rekombinantního cyt  $b_5$

rekonstituovaného s hemem byl tento nárůst rovněž zřetelný. Byl-li poměr CYP3A4 a cyt b<sub>5</sub> 1:5 pozorujeme nárůst tvorby 9-hydroxyellipticinu a především 12-hydroxyellipticinu a 13-hydroxyellipticinu. V případě rekombinantního cyt b<sub>5</sub> rekonstituovaného s hemem byl tento stimulační efekt analogický. Naproti tomu vliv apo-formy cyt b<sub>5</sub> na oxidaci ellipticinu byl oproti nativní formě tohoto proteinu mnohem nižší (Obr. 11.).

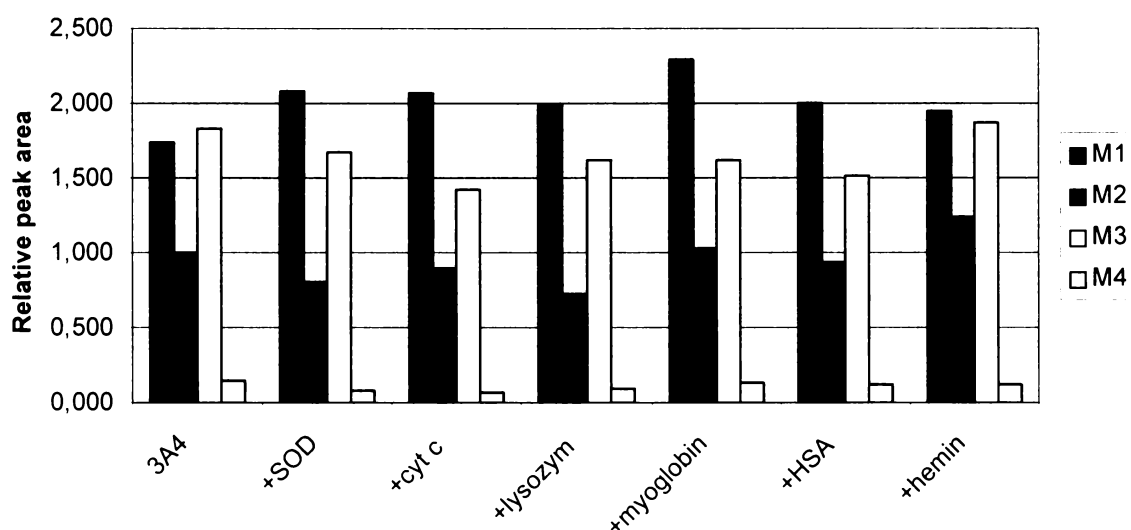


**Obrázek 11.** Vliv cyt b<sub>5</sub> na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A za přítomnosti rozdílných forem tohoto proteinu a jeho různých koncentrací. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N2-oxid (M5). Vzorek označený jako CYP3A4 je kontrolní vzorek bez cyt b<sub>5</sub> v inkubační směsi. B<sub>5</sub> - CYP3A4 a nativní cytochrom b<sub>5</sub>. Titr b<sub>5</sub> - CYP3A4 a rekombinantní apo-cytochrom b<sub>5</sub> rekonstituovaný s hemem. Apo b<sub>5</sub> - CYP3A4 a rekombinantní apo-cytochrom b<sub>5</sub>. Výsledky uvedené v obrázku jsou průměry dvou měření.

#### 4.5. Vliv dalších proteinů na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A4

V dalších experimentech jsme sledovali, zda-li stimulační efekt oxidace ellipticinu nemůže být způsoben též dalšími proteiny. Z tohoto hlediska jsme testovali vliv cytochromu c, lysozymu, myoglobinu, lidského sérového albuminu a superoxiddismutasa (SOD). Vedle toho jsme testovali vliv heminu na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A4. Všechny tyto proteiny a hemin byly v experimentech používány v množství 62.5 pmol, tedy v poměru k cytochromu P450 3A4 1:5.

Jak je patrné z Obr. 12. vliv těchto proteinů a heminu na oxidaci ellipticinu je zanedbatelný. Ačkoliv můžeme pozorovat mírný nárůst tvorby metabolitu 9-hydroxyellipticin (M1) u všech testovaných proteinů, u metabolitů, které jsou odpovědné za tvorbu aduktů s DNA, 12-hydroxyellipticinu (M2) a 13-hydroxyellipticinu (M3), je jejich tvorba srovnatelná s tvorbou samotným cytochromem P450 3A4 nebo je dokonce nižší. Tento efekt může být vysvětlen tím, že 12-hydroxyellipticin a 13-hydroxyellipticin mohou být jako reaktivní sloučeniny vázány na proteiny přítomné v inkubační směsi.



**Obrázek 12.** Vliv proteinu a heminu na oxidaci ellipticinu cytochromem P-450 3A4. Vzorek označený jako 3A4 je kontrolní vzorek, který obsahoval pouze cytochrom P-450 3A4 o celkovém látkovém množství 12,5 pmol. Ostatní vzorky již obsahují přidané proteiny [SOD, cytochrom c, lysozym, myoglobin, lidský sérový albumin (HSA)] a hemin. Proteiny a hemin byly ve svých vzorcích přítomny ve výsledném množství 52,5 pmol. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a 7-hydroxyellipticin (M4). Výsledky uvedené v obrázku jsou průměry ze dvou měření.

## 5. Diskuse

Ellipticin je protinádorové agens, jehož farmakologický účinek silně závisí na jeho metabolismu v organismu. Metabolicky je ellipticin cytochromy P450 buď detoxikován na metabolity 9-hydroxyellipticin a 7-hydroxyellipticin, které jsou z organismu ve formě sulfátových konjugátů snadno vyloučitelné [5], nebo aktivován na deriváty s vyšší biologickou účinností [19,56,57,58,64,66,67]. Dva z metabolitů, 12-hydroxyellipticin a 13-hydroxyellipticin jsou reaktivními sloučeninami tvořícími spontánně karbeniové ionty, které se kovalentně váží na DNA cílových i necílových tkání [56,58,64,66,67]. Na jejich tvorbě participují dva typy hemových enzymů, cytochromy P450 a peroxidasy [47,63,66,67]. Z cytochromů P450 je pak pro jejich tvorbu nejvýznamnější cytochrom P450 3A4.

Cytochrom P450 3A4 je jedním z enzymů jejichž aktivita je ovlivněna fakultativní složkou systému oxidas se smíšenou funkcí, cytochromem  $b_5$  [76].

V rámci této bakalářské práce byl tedy studován vliv cytochromu  $b_5$  na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A4.

Jak bylo zjišťováno v předchozích studiích vypracovaných na katedře biochemie PřFUK, cytochrom P450 3A4 oxiduje ellipticin na pět metabolitů. Jedná se o čtyři hydroxylační metabolity, 7-hydroxyellipticin, 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin a 13-hydroxyellipticin, pátým metabolitem je  $N^2$ -oxid ellipticinu [57,66,67]. Pomocí HPLC jsme v předkládané práci jednoznačně separovali (a stanovili) čtyři z těchto metabolitů.  $N^2$ -oxid ellipticinu byl však eluován v retenčním čase blízkém retenčnímu času ellipticinu samotnému. Jeho množství tedy vzhledem k možnému zatížení velkou chybou nebylo kvantifikováno.

Ke studiu vlivu cyt  $b_5$  na oxidaci ellipticinu jsme použili tři rozdílné preparáty tohoto proteinu (nativní cyt  $b_5$ , rekombinantní apo-cyt  $b_5$  a rekombinantní apo-cyt  $b_5$  rekonstituovaný s hemem). Nativní cytochrom  $b_5$  byl izolován v laboratoři, kde byla bakalářská práce vypracována z jater králíka. Abychom však vysvětlili mechanismus, jakým cytochrom  $b_5$  působí, bylo nutné poznat i vliv cytochromu  $b_5$ , který neobsahoval hemový kofaktor. Taková molekula apo-cytochromu  $b_5$  totiž nemůže předávat elektrony enzymům systému oxidas se smíšenou funkcí, a tedy ani cytochromu P450. Apo-forma cytochromu  $b_5$  byla připravena originálním postupem, jmenovitě heterologní expresí rekombinantního proteinu v *Escherichia coli*, v růstovém médiu, které neobsahovalo kyselinu  $\delta$ -aminolevulovou jako prekursor biosynthesy hemu [36]. Tento protein byl pro experimentální účely této bakalářské práce dále převeden do stavu, který odpovídá nativnímu cytochromu  $b_5$ . Rekonstituovaný cytochrom  $b_5$  byl plně biologicky funkční [36].

Cytochrom  $b_5$  v nativní formě stimuloval tvorbu všech čtyř metabolitů ellipticinu. Především nárůst tvorby 12-hydroxyellipticinu a 13-hydroxyellipticinu byl zcela evidentní. Rekombinantní apo-cytochrom  $b_5$  rekonstituovaný s hemem, simulující strukturu a funkci nativního proteinu, také jednoznačně vykazoval patrný nárůst tvorby těchto dvou metabolitů. Naopak rekombinantní apo-cytochrom  $b_5$  (bez hemu) měl na oxidaci ellipticinu malý nebo téměř žádný stimulační efekt. To nasvědčuje tomu, že je pro stimulaci oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4 prostřednictvím cytochromu  $b_5$  nezbytný hem obsažený v tomto proteinu, a že je tedy stimulace způsobena přenosem elektronů. Přesto se ovšem nedá vyloučit allosterická modulace cytochromu P450 3A4 prostřednictvím tohoto proteinu. Tomu totiž napovídá skutečnost, že cytochromem  $b_5$  je ovlivněna nejen rychlost oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4, ale že dochází ke změně i v množství a zastoupení jednotlivých jeho metabolitů.

Stimulační efekt cytochromu  $b_5$  se na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A4 projevil až při jeho koncentraci, která byla k CYP3A4 v poměru 3:1. Stimulační efekt cyt  $b_5$  na oxidaci studovaného léčiva se však zcela markantně projevil za koncentrace, kdy byl v poměru k cytochromu P450 3A4 5:1.

Vzhledem k pozitivnímu vlivu cytochromu  $b_5$  na oxidaci ellipticinu studovaným cytochromem P450 a velmi nízkému vlivu jeho apo-formy (bez hemu) nás zajímalo, zda nemohou mít i jiné proteiny (cytochrom c, myoglobin, lidský sérový albumin, lysozym a superoxididismutasa) stimulační efekt. Testován byl i vliv heminu. Všechny zkoumané proteiny i hemin byly použity v množství, které odpovídalo poměru 5:1 k cytochromu P450 3A4. Ani apo-forma cytochromu  $b_5$ , ani molekuly jiných proteinů (obsahujících či neobsahujících hem) oxidaci ellipticinu CYP3A4 signifikantně neovlivňovaly. Ze získaných výsledků je tedy patrné, že stimulaci oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4 zprostředkovává pouze cytochrom  $b_5$ , a to jeho forma obsahující hem.

## 6. Závěr

Výsledky získané v bakalářské práci prokazují, že stanovené cíle byly splněny. V práci bylo zjištěno:

1. Oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4 na jeho metabolity 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a 7-hydroxyellipticin (M4) je ovlivněna cytochromem  $b_5$ . V přítomnosti nativního cytochromu  $b_5$  a rekombinantní apo-formy cytochromu  $b_5$  rekonstituované s hemem vznikaly z ellipticinu tytéž metabolity, ale jejich vzájemný poměr byl odlišný. Nejvíce byla stimulována tvorba 12-hydroxyellipticinu (M2) a 13-hydroxyellipticinem (M3). Vliv rekombinantního apo-cytochromu  $b_5$  (neobsahujícího hem) na oxidaci ellipticinu byl minimální.

2. Oproti cytochromu  $b_5$ , jiné proteiny ať obsahující či neobsahující hem (lysozym, myoglobin, cytochrom c, lidský sérový albumin a superoxididmutasa) a hemin oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A4 prakticky neovlivňovaly.

Výsledky získané v bakalářské práci jsou základem pro další detailní studii poznání molekulárního působení cytochromu  $b_5$  na oxidaci substrátů cytochromů P450.

## Seznam použité literatury

1. Aimová D.: *Dizertační práce*. PřF UK, Praha (2005)
2. Anari M. R., Khan S., Jatoo S. D., O'Brien P. J.: *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 22, 305 (1997)
3. Arguello F., Alexander M. A., Greene J. F. Jr., Stinson S. F., Jordan J. L., Smith E. M., Kalavar N. T., Alvord W. G., Klabansky R. L., Sausville E. A.: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 124, 19 (1998)
4. Ashby J., Elliott B. M., Styles J. A.: *Cancer Lett.* 9, 21 (1980)
5. Auclair C.: *Arch. Biochem. Biophys.* 259, 1 (1987)
6. Bend J. R., Foureman C. L.: *Mar. Environ. Res.* 14, 405 (1984)
7. Bertrand J. R., Giacomoni P. U.: *Chemioterapia* 4, 445 (1985)
8. Bořek-Dohalská L., Frei E., Stiborová M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69, 603 (2004)
9. Březinová A.: *Diplomová práce*. PřF UK, Praha (2005)
10. Coon M. J., Persson A. V.: *Enzymatic basis of detoxification I*, Academic Press. New York (1980)
11. Dahl A. R., Hadley W. M.: *Toxicol. Appl. Pharm.* 67, 200 (1983)
12. DeMarini D. M., Abu-Shakra A., Gupta R., Hendee L. J., Levine J. G.: *Environ. Mol. Mutagen.* 20, 12 (1992)
13. Diop B., Toure P., Sow M. T., Toure M., Halliez M. L., Castaigner J. P., Mondestr J. M., DeJaeger R.: *Med. Afr. Noire* 31, 107 (1984)
14. Edwards R. J., Murray B. P., Singleton A. M., Boobis A. R.: *Biochemistry* 30, 71 (1991)
15. Faddeeva M. D., Beliaeva T. N.: *Tsitologia* 39, 181 (1997)
16. Felsted R. L., Chu A. E., Chaykin S.: *J. Biol. Chem.* 248, 2580 (1973)
17. Fillastre J. P., Moulin B., Godin M., Josse S.: *Pathol. Biol.* 34, 1013 (1986)
18. Fosse P., Rene B., Charra M., Paoletti C., Saucier J. M.: *Mol. Pharmacol.* 42, 590 (1992)
19. Frei E., Bieler Ch. A., Arlt V. M., Wiessler M., Stiborová M.: *Biochem. Pharmacol.* 64, 289 (2002)
20. Froelich-Ammon S. J., Patchan M. W., Osheroff N., Thompson R. B.: *J. Biol. Chem.* 270, 14998 (1995)
21. Garfinkel D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493 (1958)
22. Guengerich F. P.: *J. Biol. Chem.* 266, 10019 (1991)
23. Gut I., Souček P., Hodek P.: *Pracovní lékařství* 1, 15 (1992)



24. Hara T., Minakami S.: *J. Biochem.* 69, 325 (1971)
25. Heinemann F. S., Ozols J.: *J. Biol. Chem.* 258, 4195 (1983)
26. Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy imunologie*, Triton, Praha (2002)
27. Huff A. C., Kreuzer K. N.: *J. Biol. Chem.* 265, 20496 (1990)
28. Chu Y., Hsu M. T.: *Nucleic Acids Res.* 20, 4033 (1992)
29. Juret P., Heron J. F., Couette J. E., Delozier T., Letalaer J. Y.: *Cancer Treat. Rep.* 66, 1909 (1982)
30. Juret P., Tanguy A., Girard A., Le Talaer J. Y., Abbatucci J. S., Yuong D., Le Pecq J. B., Paoletti C.: *Nouv. Presse Med.* 8, 1495 (1979)
31. Klener P.: *Chemoterapie-minimum pro praxi*, Triton, Praha (1999)
32. Klener P.: *Klinická onkologie*, Galén, Praha (2002)
33. Klener P.: *Protinádorová chemoterapie*, Galén, Praha (1996)
34. Klingenberg M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376 (1958)
35. Kotrbová V.: *Diplomová práce*, PŘF UK, Praha (2005)
36. Kotrbová V., Aimová D., Ingr M., Bořek-Dohalská L., Martínek V., Stiborová M.: *Protein Expr Purif.*, 66, 203 (2009)
37. Le Pecq J. B., Dat Xuong N., Gosse C., Paoletti C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 5078 (1974)
38. Masopust J.: *Patobiochemie buňky*, 2. LF UK, Praha (2003)
39. Mathé G., Hayat M., De Vassal F., Schwarzenberg L., Schneider M., Schlumberger J. R., Jasmin C., Rosenfeld C.: *Rev. Eur. Etud. Clin. Biol.* 15, 541 (1970)
40. Mathé G., Triana K., Pontiggia P., Blanquet D., Hallard M., Morette C.: *Biomed. Pharmacother.* 52, 391 (1998)
41. Monnot M., Mauffret O., Simon V., Lescot E., Psaume B., Saucier J. M., Charra M., Belehradek J. Jr., Femandjian S.: *J. Biol. Chem.* 266, 1820 (1991)
42. Nebert D. W., Nelson D. R., Feyereisen R.: *Xenobiotica* 19, 1149 (1989)
43. Nelson D. R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J. J., Feyereisen R., Waxman D. J., Waterman M. R., Gotoh O., Coon M. J., Estabrook R. W., Gunsalus I. C., Nebert D. W.: *Pharmacogenetics* 6, 1 (1996)
44. Ohashi M., Sugikawa E., Nakanishi N.: *Jpn J. Cancer Res.* 86, 819 (1995)
45. Omura T., Sato R.: *J. Biol. Chem.* 239, 2370 (1964)
46. Paoletti C., Le Pecq J. B., Dat Xuong N., Juret P., Garnier H., Amiel J. L., Rouesse J.: *Recent Results Cancer Res.* 74, 107 (1980)
47. Poljaková J., Forsterová K., Šulc M., Frei E., Stiborová M.: *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ.*

- Palacky Olomouc Czech Repub. 149, 249 (2005)
48. Reid T. M., Morton K. C., Wang C. Y., King C. M.: *Environ. Mutagen.* 6, 705 (1984)
49. Ross W. E., Bradley M. O.: *Biochim. Biophys. Acta* 654, 129 (1981)
50. Rouesse J. G., Le Chevalier T., Caille F., Mondesir J. M., Sancho-Ganier H., May-Levin E., Spielman M., DeJager R., Amiel J. L.: *Cancer Treat. Rep.* 69, 707 (1985)
51. Sharples D., Hajós G., Riedl Z., Csányi D., Molnár J., Szabó D.: *Arch. Pharm. Med. Chem.* 334, 269 (2001)
52. Schenkman J. B., Jansson I.: *Pharmakol. Ther.* 97, 139 (2003)
53. Schwaler M. A., Allard B., Lescot E., Moreau F.: *J. Biol. Chem.* 270, 22709 (1995)
54. Singh M. P., Hill G. C., Peoc'h D., Rayner B., Imbach J. L., Lown J. W.: *Biochemistry* 33, 10271 (1994)
55. Souček P., Gut I.: *Čas. Lék. Čes.* 132, 353 (1993)
56. Stiborová M., Bieler C. A., Wiessler M., Frei E.: *Biochem. Pharmacol.* 62, 1675 (2001)
57. Stiborová M., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Kotrbová V., Kukačková K., Janouchová K., Rupertová M., Ryšlavá H., Hudeček J., Frei E.: *Gen. Physiol. Biophys.* 25, 245 (2006)
58. Stiborová M., Breuer A., Aimová D., Rupertová M., Wiessler M., Frei E.: *Int. J. Cancer* 107, 885 (2003)
59. Stiborová M., Frei E.: *Chem. Listy* 95, 549 (2001)
60. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: *Chem. Listy* 93, 229 (1999)
61. Stiborová M., Hudeček J., Páca J.: *Bull. Čs. Spol. Biochem. Mol. Biol.* 28, 57 (2000)
62. Stiborová M., Mikšanová M.: *Živa* 4, 146 (1999)
63. Stiborová M., Poljaková J., Ryšlavá H., Dračínský M., Eckschlager T., Frei E.: *Int. J. Cancer* 120, 243 (2007)
64. Stiborová M., Rupertová M., Bořek-Dohalská L., Wiessler M., Frei E.: *Chem. Res. Toxicol.* 16, 38 (2003)
65. Stiborová M., Rupertová M., Hodek P., Frei E., Schmeiser H. H.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69, 476 (2004)
66. Stiborová M., Rupertová M., Schmeiser H.H., Frei E.: *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 150, 13 (2006)
67. Stiborová M., Sejbal J., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Poljaková J., Forsterová K., Rupertová M., Wiesner J., Hudeček J., Wiessler M., Frei E.: *Cancer Res.* 64, 8374 (2004)
68. Stiborová M., Schmeiser H. H., Frei E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 63, 857 (1997)
69. Sugikawa E., Hosoi T., Yazaki N., Gamanuma M., Nakanishi N., Ohashi M.: *Anticancer Res.* 19, 3099 (1999)

70. Sureau F., Moreau F., Millot J. M., Manfait M., Allard B., Aubard J., Schwaller M. A.: *Biophys. J.* 65, 1767 (1993)
71. Taniguchi H., Imai Y., Sato R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 585 (1984)
72. Tewey K. M., Chen G. L., Nelson E. M., Liu L. F.: *J. Biol. Chem.* 259, 9182 (1984)
73. Turek B., Hrubý S., Černá M.: *Nutriční toxikologie*, Brno (1994)
74. Von Jagow G., Sebald W.: *Annu. Rev. Biochem.* 49, 281 (1980)
75. Wiechelman K. J., Braun R. D., Fitzpatrick J. D.: *Anal. Biochem.* 175, 231 (1988)
76. Yamazaki H., Shimada T., Martin M. V., Guengerich F. P.: *J. Biol. Chem.* 276, 30885 (2001)
77. Zhang H., Myshkin E., Waskell L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 499 (2005)
78. <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html> (20.4.2009)
79. [http:// www.metallo.scripps.edu/PROMISE/](http://www.metallo.scripps.edu/PROMISE/) (21.4.2009)
80. <http://ucebnice.euromise.cz/index-php?conn=0&section=epidem&node=node153> (20.5.2009)

Svoluji k zapůjčení této bakalářské práce pro studijní účely a žádám, aby byla vedena  
řádná evidence vypůjčovatelů a ti byli upozorněni na to, že musí pramen převzatých údajů  
řádně citovat.