

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**ROLE CYTOCHROMU P450 V METABOLISMU
POTENCIÁLNÍHO LIDSKÉHO
KARCINOGENU *o*-ANISIDINU**

**THE ROLE OF THE CYTOCHROMES P450 IN METABOLISM
OF POTENTIAL HUMAN CARCINOGEN *o*-ANISIDINE**

Diplomová práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2009

Bc. Hana Kourová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelů RNDr. Václava Martínka, Ph.D. a RNDr. Markéty Martínkové, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1.5. 2009

.....

podpis

Poděkování

Je mou milou povinností poděkovat svým školitelům RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. a RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D. za odborné vedení, laskavý přístup a rady, které mi ochotně po celou dobu řešení diplomové práce poskytovali.

Tato diplomová práce vznikla za podpory výzkumného záměru MSM0021620808 a grantů Grantové agentury České republiky 303/09/0472 a 203/09/0812.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
1 ÚVOD.....	9
1.1 KARCINOGENESE	9
1.1.1 Mechanismus karcinogenese	9
1.1.2 Vnější faktory karcinogenese	10
1.1.3 Fáze karcinogenese.....	11
1.2 METABOLISMUS CIZORODÝCH LÁTEK	12
1.2.1 První fáze biotransformace.....	13
1.2.2 Druhá fáze biotransformace	14
1.3 CYTOCHROMY P450	15
1.3.1 Funkce cytochromu P450	16
1.3.2 Struktura cytochromu P450	17
1.3.3 Reakční cyklus cytochromu P450	18
1.3.4 Nomenklatura cytochromů P450	19
1.3.5 Cytochromy P450 aktivující prekarcinogeny a protoxikanty	20
1.3.5.1 Cytochromy P450 1A1 a 1A2.....	20
1.3.5.2 Cytochrom P450 2E1	21
1.3.5.3 Cytochrom P450 3A4	22
1.3.6 Regulace hladiny cytochromu P450	23
1.4 NADPH:CYTOCHROM P450 REDUKTASA	24
1.5 DALŠÍ ENZYMY PODÍLEJÍCÍ SE NA METABOLISMU CIZORODÝCH LÁTEK	25
1.5.1 Peroxidasy	25
1.5.2 Reduktasy.....	26
1.6 AROMATICKÉ NITRO A AMINO SLOUČENINY.....	27
1.6.1 <i>o</i> -Nitroanisol.....	28
1.6.2 <i>o</i> -Anisidin.....	30
1.6.2.1 Výskyt a využití <i>o</i> -anisidinu	30
1.6.2.2 Účinky <i>o</i> -anisidinu na organismus	30
1.6.2.3 Mechanismus karcinogenese <i>o</i> -anisidinu	31
1.6.3 <i>N</i> -hydroxylační reakce karcinogenů (respektive aromatických aminů).....	35

2	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	37
3	MATERIÁL A METODY.....	38
3.1	POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE.....	38
3.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	39
3.3	METODY	40
3.3.1	<i>Charakterizace použitých enzymových preparátů</i>	<i>40</i>
3.3.1.1	Stanovení koncentrace cytochromu P450.....	40
3.3.1.2	Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy	40
3.3.1.3	Stanovení koncentrace proteinu metodou BCA.....	41
3.3.1.4	Příprava rekonstituovaného systému	42
3.3.2	<i>Časová závislost spotřeby NADPH během inkubace s o-anisidinem</i>	<i>43</i>
3.3.3	<i>Stanovení poměru mezi spotřebou NADPH a o-anisidinu.....</i>	<i>44</i>
3.3.3.1	Inkubace o-anisidinu s mikrosomy	44
3.3.3.2	Inkubace o-anisidinu s rekonstituovaným systémem	44
3.3.4	<i>Kolorimetrické stanovení N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu (původní metoda dle Kadlubar a kol.)^[70]</i>	<i>45</i>
3.3.4.1	Stanovení chyby způsobené extrakcí a zdánlivého extinkčního koeficientu pro výpočet koncentrace NOHA.....	47
3.3.4.2	Stanovení rušivého vlivu dalších látek přítomných v inkubační směsi ...	48
3.3.5	<i>Optimalizace kolorimetrického stanovení N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu .</i>	<i>48</i>
3.3.5.1	Ověření lineární odezvy optimalizované kolorimetrické metody pro stanovení N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu	49
3.3.6	<i>Kinetická studie tvorby N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu jako produktu oxidace o-A cytochromy P450 (kolorimetricky)</i>	<i>50</i>
3.3.6.1	Stanovení časové závislosti tvorby N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu ..	50
3.3.6.2	Stanovení kinetických konstant tvorby N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu jako produktu oxidace o-A cytochromy P450	51
3.3.6.3	Stanovení kinetických konstant úbytku N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu při jeho následné oxidaci cytochromy P450	52
4	VÝSLEDKY	53
4.1	CHARAKTERIZACE POUŽITÝCH ENZYMOVÝCH PREPARÁTŮ	53
4.2	STUDIUM REDOX. CYKLU V METABOLISMU O-ANISIDINU	54

4.2.1	Časová závislost spotřeby NADPH během inkubace <i>o</i> -anisidinu s CYP.....	54
4.2.2	Stanovení poměru mezi spotřebou NADPH a <i>o</i> -anisidinu.....	56
4.2.2.1	Inkubace <i>o</i> -anisidinu s mikrosomálním systémem.....	56
4.2.2.2	Inkubace <i>o</i> -anisidinu v přítomnosti rekonstituovaného systému.....	57
4.3	KOLORIMETRICKÉ STANOVENÍ N-(2-METOXYFENYL)HYDROXYLAMINU.....	58
4.4	OPTIMALIZACE KOLORIMETRICKÉHO STANOVENÍ NOHA.....	63
4.4.1	Ověření lineární odezvy optimalizované kolorimetrické metody pro stanovení <i>N</i> -(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu	66
4.5	KINETICKÁ STUDIE TVORBY N-(2-METOXYFENYL)HYDROXYLAMINU JAKO PRODUKTU OXIDACE <i>o</i> -ANISIDINU CYTOCHROMY P450	67
4.5.1	Časová závislost tvorby <i>N</i> -(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu	67
4.5.2	Stanovení kinetických parametrů tvorby NOHA jako produktu oxidace <i>o</i> - anisidinu cytochromy P450	68
4.5.3	Stanovení kinetických parametrů úbytku NOHA při jeho následné oxidaci cytochromy P450	71
5	DISKUSE.....	72
6	ZÁVĚR	77
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	79

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>A</i>	radikál substrátu
<i>a_{red}</i>	aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy
<i>A_x</i>	absorbance při vlnové délce x nm
<i>BCA</i>	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
<i>BSA</i>	hovězí sérový albumin
<i>c</i>	koncentrace
<i>CHAPS</i>	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonium]-1-propansulfonát
<i>CYP</i>	cytochrom P450
<i>cyt c</i>	cytochrom c
<i>DDTC</i>	dietyldithiokarbamát
<i>DLPC</i>	dilauroylfosfatidylcholin
<i>DNA</i>	deoxyribonukleová kyselina
<i>DPF</i>	4,7-difenyl-1,10-fenantrolin
<i>EC</i>	číselný kód enzymu
<i>EDTA Na₂</i>	ethylen diamintetraoctová kyselina ve formě dvojsodné soli
<i>ER</i>	endoplasmatické retikulum
<i>FAD</i>	flavinadeninukleotid (chinoidní forma)
<i>/FADH/FADH₂</i>	/semichinoidní radikál/hydrochinon
<i>FMN</i>	flavinadeninmononukleotid (chinoidní forma)
<i>/FMNH/FMNH₂</i>	/semichinoidní radikál/hydrochinon
<i>GIT</i>	gastrointestinální trakt
<i>HA</i>	výchozí substrát
<i>HAA</i>	heterocyklické aromatické aminy
<i>HEPES</i>	sodná sůl 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonové

	kyseliny
<i>K_m</i>	Michaelisova konstanta
<i>l</i>	délka kyvety
<i>M</i>	mol/l
<i>MFO</i>	system monooxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxygenases)
<i>mRNA</i>	mediátorová ribonukleová kyselina
<i>MS</i>	hmotnostní spektrometrie
<i>NAD⁺ (NADH)</i>	nikotinamidadenindinukleotid oxidovaný (redukovaný)
<i>NADP⁺ (NADPH)</i>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidovaný (redukovaný)
<i>NOHA</i>	N-(2-metoxyfenyl)hydroxylamin
<i>NPR</i>	cytochrom:P450 reduktasa
<i>P450</i>	pigment s maximem absorbance při 450 nm (cytochrom P450)
<i>RH</i>	substrát
<i>RN=O</i>	nitroso produkt
<i>ROH</i>	hydroxylovaný produkt
<i>RPM</i>	počet otáček za minutu
<i>SD</i>	směrodatná odchylka
<i>sm</i>	směrnice
<i>V_{max}</i>	maximální rychlost enzymové reakce
<i>XO</i>	xantinoxidasa
<i>ε</i>	molární absorpční koeficient
<i>ΔA</i>	změna absorbance
<i>Δt</i>	změna času

1 ÚVOD

1.1 Karcinogenese

Nádorová onemocnění se řadí v ekonomicky vyspělých státech mezi druhou nejčastější příčinu úmrtí. Počtu osob s touto diagnózou neustále přibývá. V roce 1990 vzniklo na světě přes 8 milionů nových případů tohoto onemocnění a odhaduje se, že v roce 2000 to bylo o 2 miliony více^{1,2}. Je to dáno převážně špatnou životosprávou a přítomností látek s karcinogenním účinkem v životním prostředí.

1.1.1 Mechanismus karcinogenese

Nádor je nová abnormální tkáň v mnohobuněčném organismu, která je charakteristická nadměrným autonomním růstem, s negativním dopadem na organismus.

Vznik takového novotvaru je postupný mnohastupňový proces³. Příčinou je kumulace poruch určitých genů, což vede k poruše funkce jimi kódovaných proteinů, které jsou zodpovědné za regulaci dělení a diferenciaci buňky⁴. Počet genů významných pro rozvoj karcinogenese je velmi malý. Činní méně než 0,1 % z celého genomu. Produkty těchto genů se podílejí na přenosu signálů, kontrole exprese genů, kontrole správnosti replikace DNA a chromozomů a regulaci buněčného cyklu¹. Pro vznik nádorového bujení je klíčová modifikace dvou typů genů. Nazývají se protoonkogeny a tumor supresorové geny.

Produkty protoonkogenů, neboli pronádorových genů, jsou označovány jako protoonkoproteiny (růstové faktory, proteinkinasy, transkripční faktory či cyklin dependentní kinasy). K jejich aktivaci (která může mít za následek rozvoj maligní transformace buňky) dochází v důsledku zvýšené exprese nebo strukturní modifikace. Tumor supresorové geny, neboli antionkogeny, buněčné dělení naopak brzdí. Mimo to se účastní oprav poškozené DNA a buněčné diferenciaci. U nádorové buňky se jedná o modifikaci ve smyslu jejich snížené exprese.

1.1.2 Vnější faktory karcinogenese

Podíl vrozené genetické poruchy na vznik nejběžnějších typů nádoru nepřesahuje obvykle 10 %. Samotná vrozená porucha genu důležitého pro vznik iniciované nádorové buňky je tedy nedostatečným předpokladem pro vznik nádoru¹. Podstatnou roli v rozvoji nádorového onemocnění hrají vnější faktory, které mohou být původu biologického, fyzikálního nebo chemického.

❖ Faktory biologické a fyzikální

Biologickými karcinogenními faktory jsou virové onkogeny. Mohou působit nejen jako iniciátory procesu karcinogenese, ale i jako promotory. Většinou ale nejsou samy schopny vznik nádoru iniciovat.

Mezi typické fyzikální karcinogeny patří různé druhy ionizujícího záření. Částice α a β reagují s DNA přímo, zatímco záření typu γ a X působí nepřímo tím, že po absorpci molekulou DNA uvolňují energeticky bohaté elektrony. Ty pak generují volné radikály, které indukují celou řadu poškození DNA. Dalším typem záření je záření ultrafialové, u kterého je prokázán přímý vliv vzniku rakoviny kůže. Jde o přechodnou excitaci buněčných molekul a tedy zvýšení jejich chemické reaktivity¹.

❖ Faktory chemické

Chemické karcinogeny lze rozlišit do tří skupin podle mechanismu jejich působení na :

- *genotoxické*
- *epigenetické*
- *látky způsobující změny struktury DNA*

Genotoxické karcinogeny poškozují genetickou informaci tvorbou kovalentních aduktů. Jedná se o nejvíce pravděpodobný mechanismus vzniku karcinogenese. Látky se váží na báze nebo deoxyribosu DNA. Chemické sloučeniny působící tímto mechanismem nejsou obvykle aktivní ve své nativní formě. Modifikaci DNA způsobí obvykle až po aktivaci některými z enzymů⁵.

Druhý mechanismus působení chemických karcinogenů je epigenetický. Jedná se o látky, tzv. interkalátory, které narušují DNA prostřednictvím nekovalentních interakcí. Jde například o jejich vmezezení do dvoušroubovicové struktury DNA³.

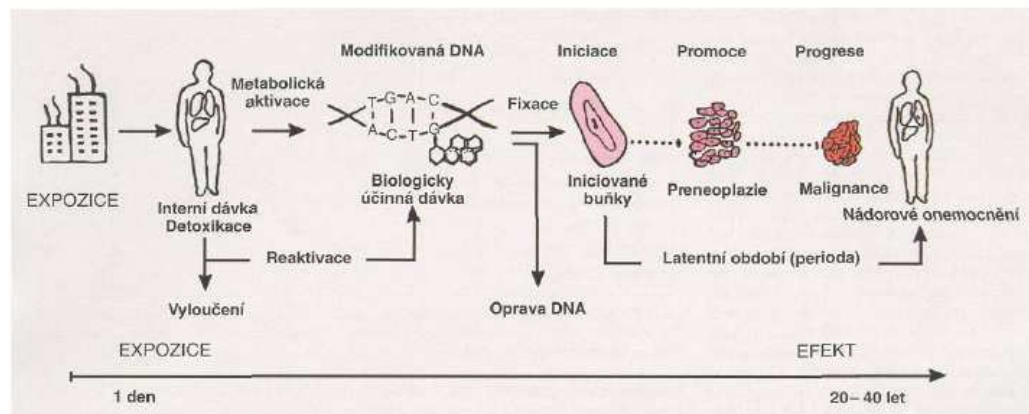
Třetí skupinou jsou karcinogeny, které vyvolávají změnu struktury molekuly DNA. Takovéto narušení může být uskutečněno jedno či dvou řetězcovými zlomy nebo propojením molekul (tzv. cross-linking)³.

1.1.3 Fáze karcinogenese

Chemická karcinogenese je složitý multifázový proces skládající se ze tří fází (obr. 1):

- *iniciace*
- *promoce*
- *progrese*

V iniciační fázi dochází k narušení genetické informace zdravých buněk. To je způsobeno například kovalentním navázáním karcinogenu na DNA nebo podobnými modifikacemi této makromolekuly (tvorba interkalátů či cyklických aduktů). V této fázi je ještě možná oprava poškozených genů reparačními buněčnými mechanismy. Jestliže tomu tak není, podléhá iniciovaná buňka dalším faktorům, které vedou k jejímu



Obr. 1 Schéma víceetapového procesu karcinogenese³

nekontrolovatelnému množení a ke vzniku benigního nádoru. Buňka se tak ocitá v promoční fázi karcinogenního procesu, který může trvat několik let až desetiletí. Mezi promoční faktory patří aktivita proteinkinasy a fosfatasy, dále například působení radikálových forem kyslíku na molekuly DNA způsobující tak jejich další narušení. Vznik kyslíkových radikálů je podmíněn činností enzymových systémů (peroxidasy, cytochromů P450), které tímto nepřímou zasažují do promoční karcinogenní fáze⁶. Dalším pozměněním

genetické informace buněk nastává již fáze progresní, tedy finální krok chemické karcinogeneze. Pro tuto fázi je charakteristické zvyšování rychlosti množení buněk související s poruchou tkáňové kontroly. Vzniká tak maligní nádor schopný tvořit metastázy⁶.

1.2 Metabolismus cizorodých látek

Proces metabolismu cizorodých látek v organismu se nazývá biotransformace. Jejím cílem je usnadnit vylučování xenobiotika, což se děje převážně přeměnou těchto látek na polárnější sloučeniny. Reakce se uskutečňují pomocí biotransformačních enzymů. Ty jsou nejvíce koncentrovány do jater, které tak představují hlavní detoxikační orgán těla.

Biotransformací nemusí být látky pouze detoxikovány. U některých sloučenin naopak dochází k reakcím aktivačním. Vznikají tak metabolity cizorodých látek, které mohou být pro organismus škodlivé. Prekarcinogeny je označení pro látky, které samy o sobě nejsou dostatečně reaktivní a které se stávají rizikovými až po vstupu do organismu. Během ranní fáze aktivace vznikají proximální karcinogeny, což jsou metabolity, které jsou předstupněm rozvoje nádorového bujení. Kaskádou metabolických či spontánních procesů se přeměňují na elektrofilny (ultimální karcinogeny), které jsou schopné reakce s nukleofilními skupinami nukleových kyselin¹.

Biotransformační reakce lze rozdělit do dvou fází:

- ❖ Mezi reakce I. fáze se zařazují pochody nesyntetické. Zavedením atomu kyslíku do molekuly, redukcí nebo jejím odkrytím dochází k tvorbě funkčních skupin (např. –OH, –COOH). Vzniklý produkt je polárnější, a je také schopný podstoupit reakce druhé fáze biotransformace. Pokud látka obsahuje již požadovanou funkční skupinu, může obejít metabolismus první fáze a vstoupit přímo do druhé⁷. Mezi enzymy této fáze patří oxidoreduktasy (např. monooxygenasy, alkoholreduktasy, aldehydreduktasy, peroxidasy) a hydrolasy (např. arylesterasy, karboxyesterasy).
- ❖ Reakce II. fáze se nazývají syntetické, neboli konjugační. Dochází k reakcím funkčních skupin (vzniklých v první fázi) s endogenními látkami⁸. Zvýší se tak polarita sloučeniny a usnadní se její vyloučení z organismu. Mezi konjugace patří reakce s kyselinou glukuronovou, glycinem, taurinem, aktivním sulfátem,

aktivním acetátem nebo glutathionem. Enzymy, které tyto pochody katalyzují, jsou glutathion-S-transferasa, sulfotransferasa, acyltransferasa.

- ❖ V některých případech může dojít k třetí fázi biotransformace. Myslí se tím další metabolické zpracování látek vycházejících z druhé fáze. Tento proces katalyzují enzymy první a druhé fáze biotransformace⁹.

1.2.1 První fáze biotransformace

Ve většině případů jde o oxidační reakce, méně časté jsou redukce nebo hydrolyza. V buňce probíhají děje první fáze nejčastěji v endoplasmatickém retikulu. Proto se někdy enzymy této fáze nazývají jako mikrosomální. Nejdůležitějším enzymovým systémem jsou cytochromy P450. Jedná se o monooxygenasy se smíšenou funkcí, které katalyzují celou řadu oxidačních, oxygenačních, popřípadě redukčních reakcí za účasti molekulárního kyslíku. Zatímco je jeden atom kyslíku vnesen do molekuly substrátu, druhý je zabudován do molekuly vody⁷.

Další skupinou biotransformačních enzymů první fáze jsou flavinové monooxygenasy. Pro člověka je to již méně důležitá skupina enzymů, svůj význam má ale například u mikroorganismů¹⁰.

Významnou roli při biotransformaci cizorodých látek hrají také peroxidasy. Vyskytují se v močovém měchýři, buňkách štítné žlázy, v kostní dřeni a mozku. Jde tedy o extrahepatální enzymy. Katalyzují redukci peroxidu vodíku za současné oxidace xenobiotika. Charakteristické pro tyto enzymy je katalýza velkého množství různých typů reakcí⁸.

Některé příklady reakcí první fáze biotransformace:

- ❖ *N-oxidace:*

Oxidací dusíku vznikají v závislosti na typu substrátu hydroxylaminy, oximy nebo N-oxidy. Metabolizuje se tak celá řada karcinogenních aromatických aminů. Vznikající produkty jsou většinou toxičtější než výchozí molekuly⁹.

❖ *Dealkylace:*

Dealkylací jsou metabolizovány sloučeniny, které ve své molekule obsahují alkylové skupiny vázané přes kyslík nebo dusík (O- nebo N- dealkylace). Skupina se v první fázi oxiduje na nestabilní intermediát, který se rozpadá za uvolnění molekuly formaldehydu⁹.

❖ *Epoxidace:*

Epoxidace je typická pro aromatické uhlovodíky nebo vinylchlorid. Zapříčiňuje zvýšení karcinogenity těchto látek. Typickým příkladem je původně nereaktivní benzo[a]pyren, který se aktivuje na diolepoxydy benzo[a]pyrenu⁹.

1.2.2 Druhá fáze biotransformace

Do konjugačních reakcí vstupují přirozené metabolity buňky. Jejich cílem je zvýšit polaritu substrátů a usnadnit tak jejich eliminaci. Vylučované látky odcházejí z těla močí, žlučí, potem a vydechovanou vodní parou⁸. Nejčastějšími konjugačními činidly jsou kyselina glukuronová, aktivní sulfát, glutathion, glycin, taurin a alanin. Reakce jsou nejvíce katalyzovány enzymy ze třídy transferas, které jsou poměrně málo specifické pro zmíněné endogenní molekuly⁸. V buňce tyto procesy probíhají v cytosolickém prostředí (na rozdíl od reakcí první fáze, kdy se děje uskutečňují v endoplasmatickém retikulu).

Některé příklady reakcí druhé fáze biotransformace:

❖ *Glukuronidace*

Jde o nejběžnější konjugáty vznikající v druhé fázi metabolismu. Reakci katalyzuje UDP-glukonosyltransferasa. Výslednými molekulami jsou ethery (výchozími substráty jsou alkoholy nebo fenoly) nebo estery (substráty jsou karboxylové kyseliny).

❖ *Sulfátová konjugace*

Při těchto reakcích je sulfát přenášen pomocí enzymu sulfottransferasy na nukleofilní skupiny (-OH, -NH₂, podobně jako u glukuronidace). Zbytek kyseliny sírové musí být ve formě aktivního sulfátu, kterým je 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfát¹⁰.

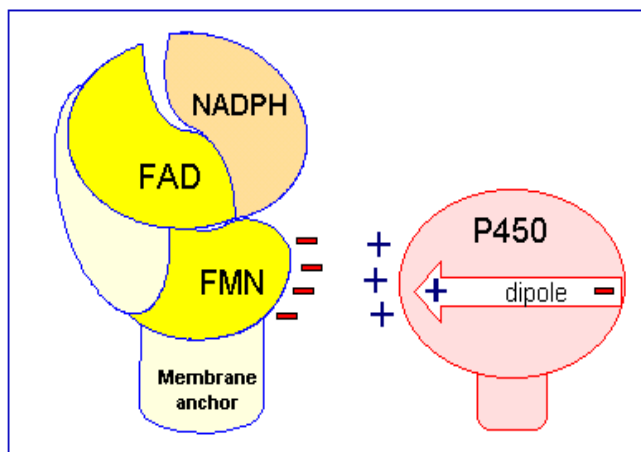
❖ *Acetylace*

Konjugace acetylací je typická pro aromatické a heterocyklické aminy. Enzymem této reakce je acetyltransferasa a zdrojem acetylu acetylkoenzym A.

1.3 Cytochromy P450

Cytochromy P450 je označení pro širokou skupinu hemthiolátových enzymů katalyzující řadu chemických reakcí za účasti molekulárního kyslíku. Díky své nesmírné variabilitě funkcí a struktur jsou jedním z nejvíce studovaných a nejlépe prostudovaných enzymových systémů. Cytochromy P450 se účastní první fáze biotransformace cizorodých látek spějící k jejich detoxikaci. Z toho vyplývá, že hrají velmi důležitou roli v životě každého živého organismu¹¹.

Cytochromy P450 se nacházejí ve všech žijících organismech s výjimkou enterobakterií. V lidském těle se vyskytují nejvíce v játrech, poté v plicích, ledvinách a v tenkém střevě. V buňkách je možné je nalézt v membránách hladkého endoplasmatického retikula (*obr. 2*), popřípadě v membránách mitochondrií¹¹.



Obr. 2 Uspořádání mikrosomálního monooxygenasového systému v membráně hladkého endoplasmatického retikula¹²

Cytochromy P450 jsou součástí tzv. mikrosomálního monooxygenasového systému, v němž fungují jako terminální oxidasy. Dalšími složkami toho systému jsou

enzym NADPH:P450 reduktasa (NPR), který slouží jako dělič elektronového páru, a biologická membrána, která je pro činnost těchto oxidas nezbytná.

1.3.1 Funkce cytochromu P450

Cytochromy P450 jsou schopny plnit dvě základní funkce:

❖ **Metabolismus xenobiotik**

Cytochromy P450 jsou zodpovědné za reakce první fáze biotransformace cizorodých látek. Katalyzují reakce oxidační, peroxidační a redukční. Označují se jako monooxygenasy se smíšenou funkcí (MFO, z angl. mixed function oxidases). Vyplývá to z jejich schopnosti aktivovat molekulu kyslíku a štěpit ji, přičemž jeden atom je začleněn do xenobiotika (monooxygenasová aktivita) a druhý je redukován na vodu (oxidasaová aktivita). Fungují tedy jako monooxygenasy a současně i jako oxidasy. Některé typy těchto enzymů však mohou plnit funkci dioxygenas. Pak jsou do substrátu začleněny oba atomy kyslíku a současně tak dochází k jeho štěpení¹¹.

Xenobiotika, která jsou substráty cytochromů P450, jsou metabolizována za vzniku polárnějších sloučenin. Výsledkem je eliminace těchto látek a zamezení jejich biokumulace v organismu. Některé původně nereaktivní cizorodé látky však mohou být na druhou stranu aktivovány a stát se tak toxickými pro organismus (například karcinogeny, kapitola 1.2).

V současné době je na metabolickou funkci cytochromů P450 kladen veliký důraz a to zejména v oboru léčiv, kdy je studiem těchto enzymů možné předběžně odhadnout reakci pacienta na podané léčivo.

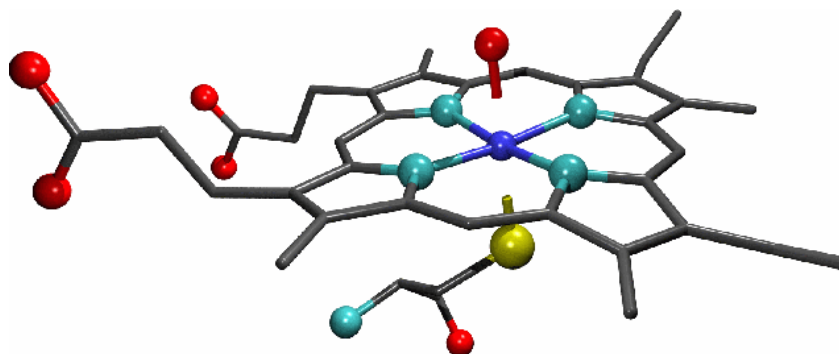
❖ **Biosyntetická funkce**

Zajišťují ji hlavně cytochromy P450 lokalizované v mitochondriích. Jde především o syntézu významných signalizačních molekul, jakými jsou například steroidní hormony. Dále se cytochromy P450 podílí na syntese vitamínů skupiny D, prostaglandinů a jiných endogenních sloučenin. Jsou zodpovědné za konverzi nenasycených mastných kyselin na biologicky aktivní molekuly. Neméně významná je jejich biosyntetická funkce také u rostlin. Rostlinné cytochromy P450 mohou vytvářet například mastné kyseliny, kyselinu

skořicovou nebo květní barviva. U hmyzu pak mají význam převážně při biosyntese hormonů pro kontrolu vývinu a napomáhání vzniku rezistence proti insekticidům¹³.

1.3.2 Struktura cytochromu P450

Cytochromy P450 se, podobně jako jiné cytochromy, řadí mezi hemové proteiny. Jádro je tvořeno ferriprotoporfyrinem IX, neboli hemem b (*obr. 3*), který obsahuje porfyrin se čtyřmi methylovými, dvěma propionátovými a dvěma vinylovými substituenty.

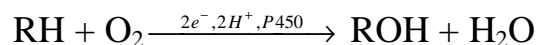


Obr. 3 Aktivní centrum cytochromu P450 bez přítomnosti substrátu. Kyslíkové atomy jsou znázorněny červeně, dusíkové světle modře, síra žlutě a atom železa tmavě modře¹⁴.

Součástí aktivního centra je koordinačně vázaný atom železa, který zprostředkovává navázání molekuly kyslíku. Pátým, proximálním ligandem železa, je cystein, který je na atom vázán prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny. Tímto se cytochromy P450 odlišují od ostatních hemoproteinů a to jak katalyticky, tak spektrálně^{15,16,17}. Právě tato thiolátová skupina je důvodem pro absorpční maximum komplexu $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ (tedy komplexu, ve kterém je šestým ligandem molekula oxidu uhelnatého) při 450nm¹⁸. Z tohoto zjištění vyplývá označení cytochromu P450. Může se říci, že by se tyto enzymy měly nazývat spíše hemthiolátové proteiny nežli cytochromy. A to z toho důvodu, že se neúčastní přenosu elektronů jako klasické cytochromy.

1.3.3 Reakční cyklus cytochromu P450

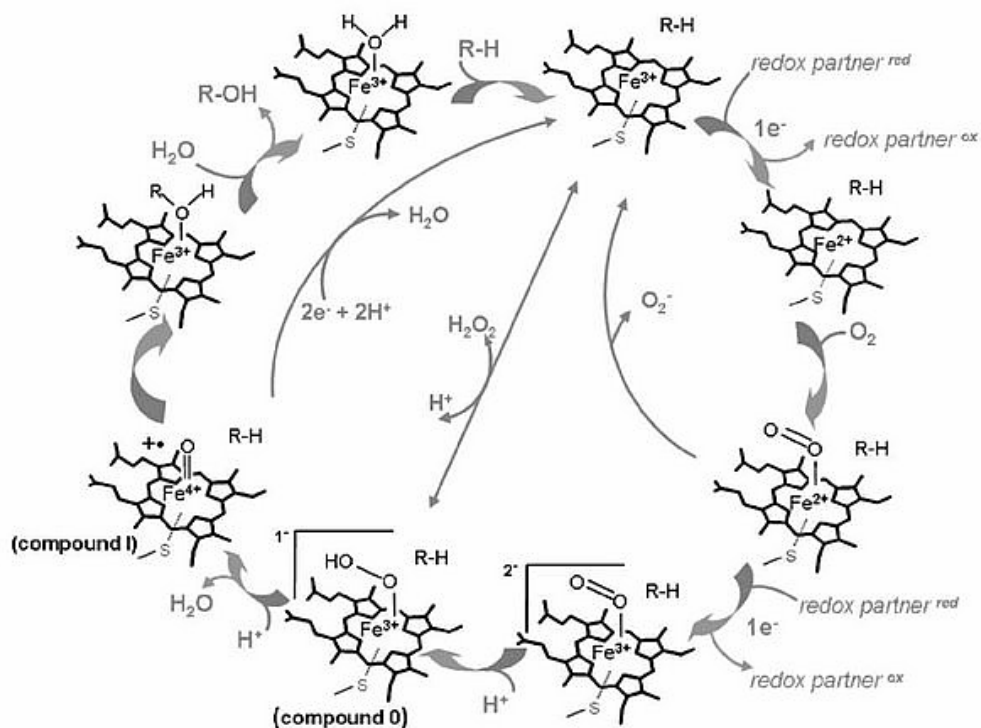
Katalytický cyklus cytochromu P450 je možné shrnout do následující rovnice:



kde RH představuje nepolární substrát a ROH substrát s již vloženým kyslíkem. Pro vytvoření polárního produktu je zapotřebí dvou redukčních kroků. Ty je možné uskutečnit pomocí NADPH:cytochrom P450 reduktasy nebo enzymů mitochondrií¹⁹. V mitochondriálních cytochomech je elektron přenášen z NADH na ferredoxin reduktasu, a to za účasti flavinových přenašečů na vlastní cytochrom P450. U mikrosomálních cytochromů je namísto ferredoxinu využita již zmíněná NPR. I v tomto případě je elektron transportován mezi enzymy prostřednictvím flavinových kofaktorů.

Reakční cyklus je možné rozdělit zhruba do osmi kroků (*obr. 4*)²⁰:

- ❖ První reakcí je navázání substrátu, při kterém dochází ke konformačním změnám v molekule enzymu. Tyto změny hrají podstatnou roli v reakčním mechanismu a to jak při navazování kyslíku tak i v redukčních pochodech²⁰.
- ❖ Dalším krokem je přenos elektronu z NADPH na Fe^{3+} uskutečněný pomocí NPR. Teprve po této redukci může kation železa navázat kyslík. V dalším stupni katalytického cyklu přechází vzniklý komplex P450-O₂-substrát autooxidační reakcí na ferri-superoxidový komplex, jehož poměrně vysoká stabilita je částečně podmíněna přítomností navázaného substrátu²⁰.
- ❖ Následkem druhé redukce atomu Fe^{3+} vzniká ferro-superoxidový komplex. Vazba v molekule kyslíku se stává natolik oslabenou, že dochází k odtržení jednoho z jejích atomů a ke vzniku molekuly vody. Tento krok je považován za finální tzv. aktivační fáze reakčního cyklu²⁰.
- ❖ Dále už jen dochází k tvorbě produktu. Tato fáze je doposud nejméně prozkoumána. Atom železa se zbylým kyslíkovým atomem, tzv. ferrioxenový komplex, je po reakci s radikálem substrátu přeměněn za vzniku hydroxylovaného produktu a volného cytochromu P450²⁰.



Obr. 4 Reakční cyklus cytochromu P450²¹

1.3.4 Nomenklatura cytochromů P450

Protože se jedná o velice širokou skupinu enzymů, kódovanou více než 4000 geny, bylo nezbytné zavedení systematického třídění. Současné názvosloví zavedené v roce 1996 Nerbertem a jeho spolupracovníky spočívá v přerozdělení jednotlivých forem cytochromu P450, tzv. izoenzymů, podle primární struktury proteinové molekuly (pořadí aminokyselin). Všechny cytochromy P450 jsou členy tzv. superrodiny neboli nadrodiny. Cytochromy P450, zkráceně označované jako CYP (zkratka vyjadřující příslušnost k superrodině), se tímto dělí do rodin a podrodin²². Pro označení rodiny P450 se používá číslice za zkratkou CYP (CYP 1), poté následuje velké písmeno jako označení podrodiny (CYP 1A). Poslední číslo pak označuje konkrétní cytochrom (CYP 1A2). Cytochromy P450 se řadí do stejné rodiny pokud mají sekvenční homologii větší jak 40 %. Stejnou podrodinu pak určuje primární struktura identická z více jak 60 %²².

1.3.5 Cytochromy P450 aktivující prekarcinogeny a protoxikanty

Cytochromy P450, jako jedny z nejdůležitějších metabolických enzymů, jsou zásadní pro zdravý stav a vývoj člověka. Určitou roli ale také hrají při navození patologických stavů. Důležitost konkrétních forem cytochromů P450 je nutné posuzovat z několika hledisek. Jedním z nich je podíl těchto enzymů na metabolismu cizorodých látek, které jsou ve většině případů toxické. V tomto smyslu lze za nejvýznamnější jaterní izoenzymy považovat CYP 1A2, 2A6, 2D6, 2C (2C8, 2C9, 2C18) 2E1 a 3A4. Z extrahepatálních jde pak především o CYP 1A1, 2B6, 2E1 a 3A4¹³.

Dalším důležitým aspektem je množství cytochromů P450 v jednotlivých lidských tkáních. V játrech je nejvíce zastoupena izoforma 3A4, dále 2C, 1A2 a 2E1, zatímco izoformy 1A1, 1B1, 2A6 a 2B6 jsou spíše extrahepatální. Význam jim lze přisoudit v orgánech, jako jsou ledviny, plíce, močové cesty, zažívací trakt nebo kůže¹³.

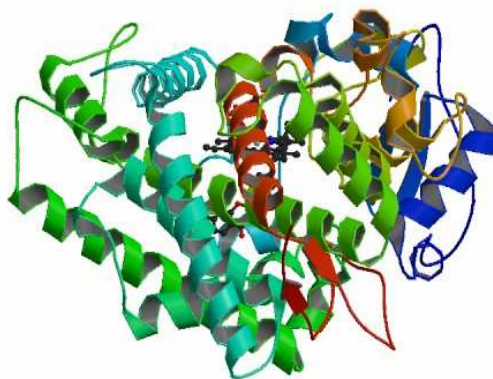
1.3.5.1 Cytochromy P450 1A1 a 1A2

Cytochromy P450 1A1 a 1A2 (*obr. 5*) jsou nejvýznamnějšími izoformami přeměňujícími prekarcinogeny (environmentální chemikálie, toxické látky, toxická léčiva) na ultimální formy za tvorby kovalentních aduktů^{13,23}. Podíl jejich činnosti na aktivačních reakcích dosud známých karcinogenů činí až 90 %²⁴.

Oba enzymy vykazují až 70 % homologii v aminokyselinové sekvenci. V důsledku toho také obvykle katalyzují i stejné reakce. Zásadní odlišnost je však v lokalizaci. Zatímco se P450 1A1 vyskytuje v extrahepatálních tkáních (plíce, ledviny, gastrointestinální trakt, kůže), P450 1A2 je typickým jaterním enzymem^{13,23}.

Množství cytochromu P450 1A1 v lidských tkáních je ovlivněno prostředím, ve kterém se člověk vyskytuje. Jedná se o silně inducibilní a také polymorfní enzym. Jeho indukce je obzvláště výrazná u kuřáků a předpokládá se, že rozsah jeho inducibility lze korelovat s dispozíci vzniku rakoviny plic. Genetický polymorfismus cytochromu P450 1A1 může mít za následek rakovinu nejen plic a prsu, ale i kůže^{13,23}.

Cytochrom P450 1A2 má, jakožto jaterní enzym, velmi širokou substrátovou specifitu. Důležité je zmínit heterocyklické aromatické aminy, které mohou vznikat jako



Obr. 5 Lidský CYP 1A2²⁸

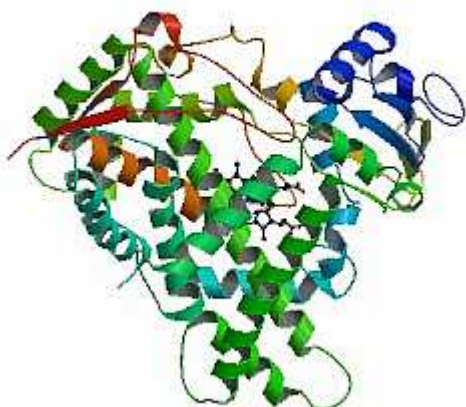
pyrolitické produkty potravin^{13,23,24}. Pravidelnou konzumací tepelně upravených potravin pak narůstají jejich koncentrace v organismu a může se tak zvýšit riziko tvorby nádorů^{13,23}. Krom rakoviny plic (podobně jako u CYP 1A1) souvisí výskyt cytochromu P450 1A2 se vznikem rakoviny kolorektálních nádorů a nádorů močového měchýře (viz. *o*-anisidin, *o*-nitroanisol, kapitola 1.6.1, 1.6.2)^{13,23}.

Typickou a také markerovou reakcí katalysovanou CYP 1A1/2 je O-deetylce 7-ethoxyresorufinu. Typickým inhibítozem této rodiny cytochromů je zase α -naftoflavon a furafyllin, který je více specifický pro inhibici CYP 1A2²⁵.

Přestože mají cytochromy P450 1A1 a 1A2 společnou homologii v aminokyselinové sekvenci až 70 %, existují substráty, které jsou přeměňovány převážně jednou z těchto izoform. Azobarvivo Sudan I je považovaný ze tzv. markerový substrát cytochromu P450 1A1 a je tedy navzdory zmíněné podobnosti obou enzymů metabolizován převážně touto izoformou cytochromu P450²⁶. CYP 1A2 je zase typický pro metabolismus karcinogenu 3-nitrobenzanthronu²⁷. Markerových substrátů je využíváno pro charakterizaci vzorků lidských jaterních mikrosomů, u kterých je variabilita zastoupení jednotlivých izoform cytochromu P450 různá v závislosti na životním stylu konkrétního jedince.

1.3.5.2 Cytochrom P450 2E1

Cytochrom P450 2E1 (*obr. 6*) zapřičiňuje toxické působení řady látek, převážně sloučenin s malou molekulovou hmotností. Mezi substráty patří například benzen, styren, vinylchlorid či chloroform. Je enzymem konstitutivním, přesto však může být indukován řadou látek. Ke zvýšení jeho množství dochází například vlivem etanolu. Jedná se o tzv. nepravou indukci, během které je sníženo množství enzymu způsobující destrukci cytochromu P450 2E1 (nejedná se tedy o zvýšení exprese prostřednictvím m-RNA a transkripce)¹³.



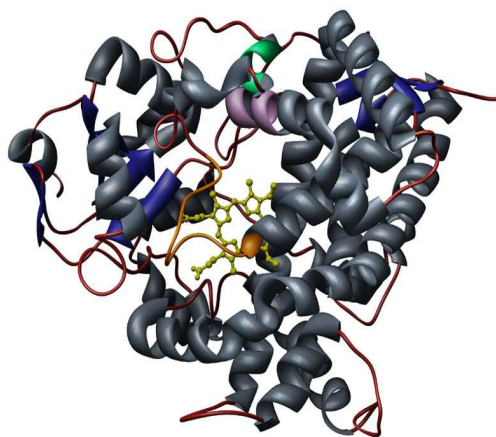
Obr. 6 Lidský CYP 2E1²⁹

Dalšími induktory jsou aceton a také nitrosaminy, tedy látky přítomné v cigaretovém kouři. Kombinací alkoholu s cigaretami se tak zvyšuje riziko vzniku rakoviny plic. Fyziologicky důležitá je indukce cytochromu P450 2E1 vyvolaná hladověním, ke které dochází prostřednictvím endogenní tvorby acetonu¹³. Mezi inhibitory CYP 2E1 patří DDTC (dietyldithiokarbamát), které je specifickým inhibitorem také CYP 2A6.

Opravdu specifický inhibitor této izoformy neexistuje. Typickou a také markerovou reakcí katalysovanou CYP 2E1 je hydroxylace v poloze 6 molekuly chlorzoxazonu²⁵.

1.3.5.3 Cytochrom P450 3A4

Cytochrom P450 3A4 (obr. 7) je pro lidský organismus nejvýznamnějším cytochromem P450. Je nejvíce zastoupenou izoformou v játrech (až 28 %) a metabolizuje také největší množství substrátů. Jde zejména o přeměnu velkých molekul (na rozdíl od



Obr. 7 Lidský CYP3A4³¹

CYP 2E1), což lze soudit i podle aktivního centra CYP 3A4, které je největší a nejflexibilnější ze všech izoform cytochromů P450. Kromě jater je přítomen i v celé řadě dalších tkání (GIT, placenta). Pro lidské zdraví je důležitý z hlediska metabolisování léčiv a velkého počtu karcinogenů^{13,23,30}. Podílí se na oxidaci některých přírodních produktů (aflatoxiny), polycyklických aromatických uhlovodíků a aromatických aminů, z endogenních látek pak steroidních sloučenin.

Mezi významné iduktory cytochromu CYP 3A4 se řadí léčiva barbituráty, rifampicin, dexametason či erytromycin^{13,23}.

Typickou a také markerovou reakcí katalysovanou CYP 3A4 je hydroxylace v poloze 6 β molekuly testosteronu. Troleandomycin a ketokonazol se používají jako markerové inhibitory 3A rodiny cytochromů P450²⁵.

1.3.6 Regulace hladiny cytochromu P450

Je těžké obecně popsat množství cytochromů P450 v lidských tkáních. Vyplyvá to ze zjištění, že většina cytochromů P450 metabolizujících xenobiotika je indukovatelná. Různí jedinci stejného druhu mají různé zastoupení jednotlivých cytochromů P450. Tento jev byl v minulosti zřejmě důležitý pro obranu organismů proti toxinům, které se momentálně v prostředí nacházejí. Znamená to, že zastoupení izoform cytochromů P450 v organismu nelze brát absolutně a je tedy závislé na vnějších podmínkách, jako je kouření, konzumace alkoholu, věk či výživa. Mimo to je variabilita obsahu jednotlivých cytochromů P450 dána genetickým polymorfismem^{13,32,33,34}.

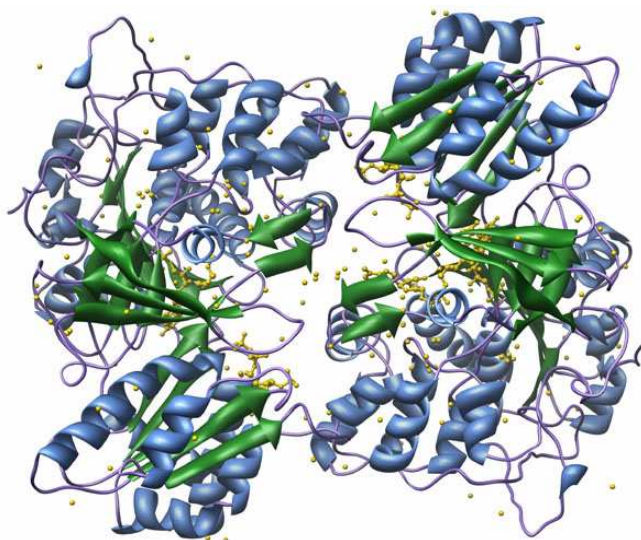
Proces regulace hladiny cytochromů P450 bylo možné popsat až s rozvojem molekulární biologie. Jedná se o kontrolu exprese na úrovni transkripce, stabilizace mRNA, translace a post-translace. Nejdůležitější roli hrají v tomto případě zřejmě transkripční procesy^{33,34}. Induktor je látka, která prostřednictvím těchto mechanismů zvyšuje hladinu produkce cytochromů P450. Mezi induktory se řadí například barbituráty (indukce zejména CYP 2B6, 2C a 2D6), ethanol, aceton (indukce CYP 2E1), 5,6-benzoflavon, benzo(a)pyren, omeprazol (indukce CYP 1A1, 1A2)¹³.

Opakem indukce je regulace vedoucí ke snížení hladiny cytochromů P450. Může být zprostředkována sloučeninami, tedy inhibitory, které u jiných izoform mají indukční vlastnosti (například polycyklické uhlovodíky). Mechanismem působení je snížení hladiny m-RNA.

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím zastoupení jednotlivých forem cytochromu P450 v organismu je genetický polymorfismus. Jedná se o jev, kdy genetická výbava jedince je zodpovědná za odchýlení exprese jednotlivých forem cytochromu P450. To může vést k expresi enzymů se sníženou, zvýšenou, zrušenou nebo změněnou aktivitou. Polymorfismus cytochromů P450 je charakteristický pro jednotlivé rasy a populace, z nichž postihuje zpravidla 2 % obyvatel. Příkladem může být kavkazská populace, u které byly v 7 % zastoupení zjištěny mutace v genech cytochromů P450. Podle poměru množství nemetabolizované látky a štěpných produktů byli tito jedinci označeni za tzv. pomalé metabolizátory^{13,35}.

1.4 NADPH:cytochrom P450 reduktasa

Biotransformační reakce katalyzované cytochromy P450 vyžadují přísun redukčního ekvivalentu z NADPH. Tuto funkci zajišťuje enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasa (NPR, *obr. 8*), která je tak součástí membránově vázaného monooxygenasového systému cytochromů P450. Transport elektronů tímto flavinovým proteinem byl popsán také na cytochrom c, cytochrom b₅ a další substráty^{36,37}.



Obr. 8 NADPH:P450 reduktasa (potkan)¹²

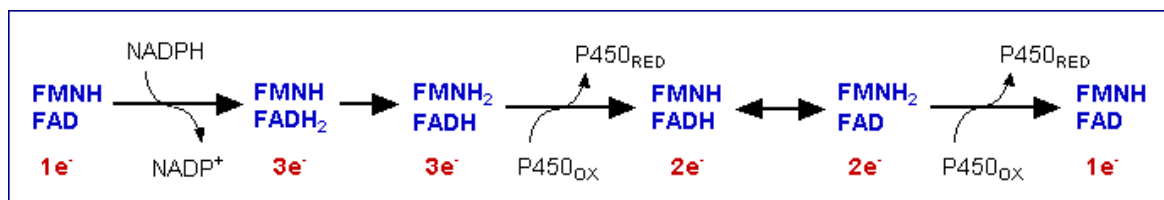
NADPH:P450 reduktasa je enzym s molekulovou hmotností kolem 80 000 skládající se ze dvou funkčních domén³⁶:

- ❖ Hydrofilní doména o molekulové hmotnosti 72 000, která směřuje vně membrány, je zodpovědná za vazbu NADPH.
- ❖ Druhá doména, neboli hydrofobní proteinová část enzymu, pak umožňuje jeho zakotvení v membráně a zároveň zprostředkovává vazbu s cytochromem P450.

Součástí hydrofilní funkční domény jsou prostetické skupiny FMN a FAD, které slouží jako dělič elektronového páru a umožňují tak jedoelektronovou redukci cytochromu P450. FMN- a FAD- vazebné strukturní domény leží těsně u sebe, což umožňuje přímý elektronový přenos mezi isoalloxazinovými kruhy těchto flavinů. FAD přijímá elektrony od NADPH a následně je předává FMN, od kterého putují na

akceptorovou molekulu cytochromu P450 (obr. 9)^{37,38}. Skutečnost, že mohou flavinové kofaktory FAD a FMN krokově přijímat a předávat elektrony je dána hodnotou jejich redoxních potenciálů^{37,39,40}.

NADPH:cytochrom P450 reduktasa participuje také na redukci nízkomolekulárních cizorodých látek. V tomto případě je enzym funkční bez membrány endoplasmatického retikula (narozdíl od monooxygenasového systému cytochromů P450, kde je membrána nedílnou součástí). Interakce mezi neendogenním substrátem a enzymem je zprostředkována hydrofilní funkční doménou, na které je zároveň vázané i NADPH. Příkladem těchto substrátů je 3-nitrobenzanthron, aristocholové kyseliny nebo dimehtylaminoazobenzen^{37,41}.



Obr. 9 Přenos elektronů systémem FAD a FMN¹²

1.5 Další enzymy podílející se na metabolismu cizorodých látek

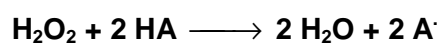
1.5.1 Peroxidasy

Peroxidasy jsou další neméně významnou skupinou enzymů první fáze biotransformace xenobiotik. Jedná se o oxidoreduktasy, které redukují peroxid vodíku (nebo jiné peroxidy) za současné oxidace jiné sloučeniny. Mimo vlastní peroxidasové oxidace katalyzují například reakce halogenační, dekarboxylační, oxygenační nebo demetylační^{37,42}.

Látek, které se spoluúčastní rozkladu peroxidu vodíku je poměrně mnoho. Peroxidasy jsou tedy enzymy se širokou substrátovou specifikou, ve které se podobají monooxygenasovému systému cytochromů P450. Vhodnými substráty mohou být fenoly, azobarviva, aromatické aminy nebo redukční metabolity nitro-aromátů či azobarviv^{37,42}, tedy převážně látky, které na své funkční skupině obsahují volný elektronový pár.

Co se struktury týče, patří peroxidasy do skupiny hemoglykoproteinů. Prostetickou skupinou je tedy hem. Jádrem je tvořeno protoporfyrinem IX, stejně jako je tomu u cytochromu P450. Hem je v tomto případě vázán na apoprotein přes histidin, který je tak pátým ligandem atomu železa⁴². Oxidační cyklus peroxidasy probíhá ve dvou stupních vždy po jednom elektronu⁴². Vznikají tak reaktivní radikály oxidovaných sloučenin, které mohou dále reagovat například s kyslíkem nebo jinými nízkomolekulárními látkami přítomnými v roztoku. V organismu mohou být radikálové produkty obzvláště nebezpečné pro svoji schopnost atakovat biologické makromolekuly včetně DNA⁴³.

Katalytický cyklus lze zapsat chemickou rovnicí následovně:



kde HA je výchozí substrát a A[·] je oxidovaný radikál substrátu.

Typickou vlastností peroxidasy je, že se mohou vyskytovat v několika oxidačních stavech. Základní, nativní stav enzymu je v oxidačním stupni III. Prvním krokem zahájení katalytického cyklu je interakce peroxidu vodíku nebo jiného peroxidu s peroxidasou, čímž vzniká tzv. Sloučenina I (v tomto komplexu je již vázaná molekula kyslíku a jeho oxidační stav je o dva stupně vyšší, než je tomu u nativní formy). Z důvodů stability je atom železa Sloučeniny I ve ferrylové formě a zbylý oxidační ekvivalent se nachází ve struktuře hemu. Poté vstupuje do reakce substrát. Sloučenina I je redukována jedním elektronem přijatým od substrátu a její celkový oxidační stav tímto klesá z V na IV. Dodaný elektron je spotřebován na vyrovnání náboje v porfyrinovém skeletu či aminokyselinovém zbytku. Vzniklý komplex je označován jako Sloučenina II. Z reakce je uvolněn radikál substrátu. V následující fázi přijímá Sloučenina II druhý elektron od další molekuly substrátu. Enzym se tak nachází v původním stavu a výsledkem je opět radikál molekuly substrátu⁴².

1.5.2 Reduktasy

Mimo oxidačních procesů mohou být cizorodé látky v organismu metabolizovány pochody redukčními. Protože se tak neděje v takové míře jako je tomu u metabolické oxidace, jsou enzymy katalyzující redukční přeměny xenobiotik doposud méně charakterizovány. Významnými reduktasami metabolismu cizorodých látek jsou

xanthinoxidasa (XO) a NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (DT-diaforasa)^{44,45}, v menší míře také již samostatně zmíněná NADPH:cytochrom P450 reduktasa.

Xanthinoxidasa je enzym podílející se svými oxidoredukčními schopnostmi na odbourávání purinových bází. Mimo této funkce může také katalyzovat redukci některých xenobiotik. Enzym se skládá ze dvou identických podjednotek, z nichž každá obsahuje několik kofaktorů účastnících se oxidoredukčních pochodů. Jedná se o FAD, dvě Fe-S centra a molybdenový komplex, v němž přechází iont kovu z oxidovaného stavu (Mo^{VI}) na stav redukovaný (Mo^{IV})³⁷. Role xanthinoxidasy v degradačním procesu purinových bází spočívá v katalytické přeměně xanthinu na kyselinu močovou (xanthin vzniká deaminací guaninu). Děje se tak oxidační hydroxylací zmíněného substrátu na uhlíku C_8 ^{37,46}. Konečným akceptorem elektronu je molekula kyslíku. Jestliže není přítomen kyslík (anaerobní podmínky), mohou být elektrony přeneseny i na jiné sloučeniny, například na aldehydy nebo aromatické nitro sloučeniny⁴⁵.

DT-diaforasa je taktéž (stejně jako XO) flavinovým cytosolickým enzymem. Jak vyplývá ze systematického názvu, katalyzuje přeměnu chinonů a chinoidních sloučenin na hydrochinony. Jedná se o dvuelektronovou redukci, při které nedochází ke vzniku nepříznivých semichinoidních forem. Jako donor elektronů tento enzym využívá NADH či NADPH. Aktivní centrum tvoří prostetická skupina FAD, u níž redoxní strukturu tvoří alloxazinový derivát^{35,47}. Mezi substráty DT-diaforasy nemusí striktně patřit pouze látky chinoidního charakteru. Enzym účinně redukuje například nitro sloučeniny nebo jiné cizorodé látky^{35,47}.

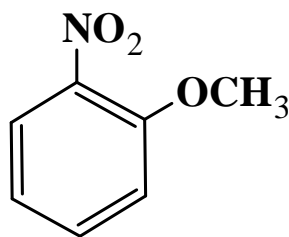
1.6 Aromatické nitro a amino sloučeniny

Aromatické nitro a amino sloučeniny představují rizikovou skupinu polutantů, které je v dnešní době zapotřebí věnovat nemalou pozornost. Významným zdrojem těchto látek je průmysl. Využívají se jako suroviny pro organické syntézy či jako polotovary pro výrobu barviv. Prokázány byly také v cigaretovém kouři a výfukových plynech, čímž značně přispívají k regionálnímu znečištění⁴⁸. Heterocyklické aromatické aminy zase vznikají tepelnou úpravou potravin⁴⁸. Protože se jedná o látky potenciálně toxické a karcinogenní, vystavují se tak nebezpečí obzvláště pracovníci chemických továren. U takovýchto zaměstnanců bylo možné pozorovat přímou souvislost mezi chronickou expozicí těchto sloučenin a výskytem rakoviny močového měchýře či tlustého střeva⁴⁹.

Aromatické nitro a amino sloučeniny jsou stále častěji předmětem mnoha studií. To platí rovněž pro zástupce aromatických aminů *o*-anisidin (kapitola 1.6.2) a jeho oxidovanou formu, nitro sloučeninu *o*-nitroanisol (kapitola 1.6.1).

1.6.1 *o*-Nitroanisol

o-Nitroanisol (2-metoxynitrobenzen, obr. 10) je hojně využívanou sloučeninou barvářského průmyslu. Uplatňuje se při výrobě azobarviv, kde slouží primárně jako prekurzor v syntéze *o*-anisidinu (redukční metabolit *o*-nitroanisolu, kapitola 1.6.2). Protože jde o látku vysoce toxickou, představuje tak určité riziko pro pracovníky barvářského průmyslu, kteří jsou působením *o*-nitroanisolu často vystavováni. Jedná o silný karcinogen močového měchýře, dále může způsobovat poškození kůže a poruchy dýchání⁵⁰.



Obr. 10 Struktura *o*-nitroanisolu

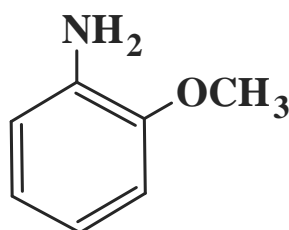
Zájem o *o*-nitroanisol značně vzrostl po roce 1993, kdy v důsledku průmyslové nehody firmy Hoechst ve Frankfurtu došlo k masivnímu úniku přibližně 11 t chemické směsi obsahující značné množství *o*-nitroanisolu a dalších látek podobného typu. U lidí vyskytujících se na místě havárie a vystavených *o*-nitroanisolu bylo zaznamenáno do určité míry poškození genetické informace. Po třech měsících byly sice genetické testy exponovaných osob opět v normálu díky opravě poškozené DNA⁵¹, nicméně výsledky dlouhého epidemiologického sledování zatím nejsou k dispozici. V této souvislosti se stal předmětem mnoha studií také *o*-anisidin, což je redukční metabolit *o*-nitroanisolu vznikající účinkem cytosolických reductas, a který je rovněž silným karcinogenem močového měchýře (kapitola 1.6.2.2)^{58,59}.

Hlavními aktéry metabolismu *o*-nitroanisolu jsou již zmíněné cytosolické reductasy, prvořadě je třeba uvést xanthinoxidasu, dále pak DT-diaphorasu, a aldehyd oxidasu⁵². Jejich působením se *o*-nitroanisol metabolizuje na N-(2-metoxyfenyl)hydroxylamin

1.6.2 *o*-Anisidin

1.6.2.1 Výskyt a využití *o*-anisidinu

o-Anisidin (2-metoxyanilin, *obr. 12*) je více než 70 let hojně využívanou sloučeninou barvářského průmyslu. Jeho výroba byla zahájena roku 1881 Mulhauserem redukcí *o*-nitroanisolu (*kapitola 1.6.1*) cínem v prostředí kyseliny chlorovodíkové. Dnes se vyrábí komerčně z *o*-nitroanisolu katalytickou hydrogenací nebo redukcí využívající železné desky v HCl⁵⁶.



Obr. 12 *Struktura o-anisidinu*

Dnes je již registrováno několik desítek barev a pigmentů, které je prostřednictvím této látky možné připravit^{57,58}. Ty jsou dále spotřebovávány k barvení papíru nebo textilu. Tento aromatický amin se tak stává další látkou, která může ohrožovat lidské zdraví. Riziku jsou obzvlášť vystaveni pracovníci barvářského průmyslu. Je zde ale i možnost uvolňování *o*-anisidinu z textilu nebo jiného materiálu barveného pigmentem z této látky připraveným a nedostatečně přečištěným. Mimo to byla jeho přítomnost prokázána v cigaretovém kouři a povrchových vodách vytékajících z chemických továren^{57,58}. Riziko *o*-anisidinové expozice je tedy poměrně široké a o *o*-anisidinu lze hovořit jako o environmentálním polutantem.

1.6.2.2 Účinky *o*-anisidinu na organismus

Přímou expozicí *o*-anisidinu může docházet ke značnému poškození organismu. Jedná se o prokázaný živočišný (konkrétně potkaní) karcinogen, jehož cílovým orgánem je močový měchýř, v menší míře také játra, slezina či ledviny^{58,59}. Tento efekt je natolik silný, že Národní institut pro rakovinu USA řadí *o*-anisidin mezi nejučinnější látku tohoto

druhu⁵⁹. Kromě nádorového bujení se *o*-anisidin projevuje dalšími toxickými efekty. Způsobuje například anemii, jejíž příčinou je zvýšený rozpad erytrocytů. Jiným nepříznivým účinkem je poškození kůže nebo poruchy dýchání^{58,59}. Na druhou stranu bylo v testech *in vitro* (například Amesův test) prokázáno, že látka jeví nevýrazné mutagenní účinky, podobně jako byla zjištěna i její snížená cytogenetická aktivita⁵⁰. Tato zvláštnost se stala impulsem pro další studium této látky, ve snaze odhalit příčinu jejího slabého karcinogenního účinku v experimentech *in vitro*. Avšak prvotní příčinou zvýšeného zájmu o *o*-anisidin byla průmyslová nehoda, ke které došlo v roce 1993 ve Frankfurtu a která byla již zmíněna v souvislosti s *o*-nitroanisolem, jakožto oxidačním metabolitem *o*-anisidinu (kapitola 1.6.1)⁵¹.

1.6.2.3 Mechanismus karcinogeneze *o*-anisidinu

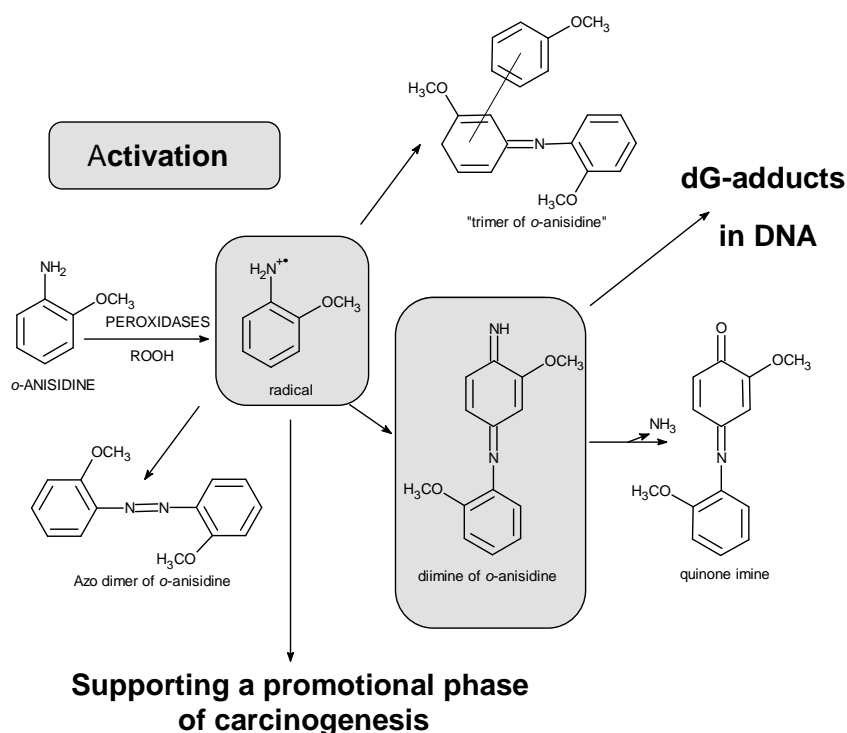
Molekulární mechanismus karcinogeneze *o*-anisidinu je intenzivně studován. Jedná se o genotoxický karcinogen, který modifikuje DNA kovalentními adukty⁶¹. Protože jsou funkční skupiny *o*-anisidinu (amino a metoxy skupina) téměř nereaktivní, je zřejmé, že za karcinogenní účinky jsou zodpovědné metabolity této látky. Tyto intermediáty vznikají působením oxidačních enzymatických systémů. Hlavní roli zde hrají oxidační reakce peroxidas a cytochromů P450^{60,61}.

❖ Metabolická přeměna *o*-anisidinu zprostředkovaná peroxidasami

Peroxidasy jsou extrahepatální enzymy, pro které amino skupina *o*-anisidinu představuje vhodný substrát jejich katalytického působení. Protože u většiny podobných látek vystavených peroxidasám dochází jejich prostřednictvím k tvorbě reaktivních sloučenin, bylo předpokládáno, že tomu bude podobně i v případě *o*-anisidinu.

Amino skupina *o*-anisidinu je peroxidasami oxidována mechanismem typickým pro tyto enzymy, tedy jednoelektronově. Výsledkem jsou volné radikály *o*-anisidinu. Jejich zapojením do vzájemných reakcí vzniká několik metabolitů. Byly identifikovány jako diimin a chinonimin *o*-anisidinu, azodimer a produkt se třemi benzenovými jádry, jehož struktura není přesně určena. Z těchto je za poškození genetické informace zodpovědný diimin *o*-anisidinu⁶⁰. U ostatních intermediátů nebyly prokázány genotoxické účinky na organismus (*obr. 13*)⁶⁰. Nicméně volný radikál, který z *o*-anisidinu vzniká, může zasahovat do dalších fází karcinogeneze (zejména do fáze promoční).

Je více než pravděpodobné, že peroxidasy hrají při biotransformaci *o*-anisidinu podstatnou roli. Svědčí o tom fakt, že se hojně vyskytují v močovém měchýři, který je cílovým orgánem rakovinného působení tohoto karcinogenu. Mezi dominantní je v tomto orgánu považováno působení prostaglandin H synthasy. Reaktivní diimin tak vzniká přímo v močovém měchýři, kde také dojde k jeho kovalentnímu navázání na DNA⁶⁰. Mimo to do procesu karcinogeneze (promoční fáze) zasahují vznikající volné radikály, které jsou velmi reaktivní a snadno napadají endogenní molekuly. Rakovinný účinek je pak několikanásobně umocněn⁶⁰.



Obr. 13 Oxidace *o*-anisidinu peroxidasami⁵⁵

Vznik intermediátů zodpovědných za poškození DNA prostřednictvím zmíněných savčích peroxidas (prostaglandin H synthasy a laktoperoxidas) byl prokázán metodou *in vitro*⁶⁰. Avšak identifikace vznikajících DNA aduktů byla zpočátku znemožněna komplexní modifikací DNA, ke které tak dochází při umocněném karcinogenním zásahu peroxidasami. Terčem pro vznik aduktů v molekule DNA je deoxyguanosin⁶⁰.

❖ Metabolická přeměna *o*-anisidinu zprostředkovaná cytochromy P450

Cytochromy P450 jsou enzymy se širokou substrátovou specifitou. Katalyzují řadu reakcí nejrůznějších typů substrátů, včetně aromatických aminů. U *o*-anisidinu pravděpodobně přeměňují efektivně obě funkční skupiny, tedy metoxy a amino skupinu^{61,62}.

Oxidační hydroxylací amino skupiny *o*-anisidinu, zprostředkované cytochromy P450, vzniká N-(2-metoxyfenyl)hydroxylamin (NOHA)⁶¹. Tato oxidační dráha byla prokázána jako aktivační. Zmíněný metabolit je velice reaktivní a ve výsledku zodpovědný za modifikaci DNA (DNA adukty). Předpokládá se, že NOHA se nadále esterifikuje enzymy N,O-acetyltransferasou nebo sulfottransferasou. Vzniklé konjugáty (N-acetoxyarylamín nebo N-sulfonyarylamín) mohou být hydrolyzovány za tvorby nitreniového iontu^{61,63,64}. Ten je pro svoji elektrofilní povahu schopný atakovat biologické makromolekuly (DNA, proteiny). Tato skutečnost zároveň poukazuje na myšlenku, proč *o*-anisidin efektivně poškozuje močový měchýř a ne například játra, kde dochází k jeho aktivaci. Jak již bylo řečeno, z NOHA se po proběhlé esterifikaci stává konjugát velice nestabilní, který se ve vhodném prostředí snadno rozpadá na reaktivní nitreniový iont^{61,63,64}. Podmínky pro tento rozpad jsou obzvláště vhodné v močovém měchýři, kde je nižší pH než v okolních tkáních. Dále bylo zjištěno, že DNA dukty, vzniklé po aktivaci *o*-anisidinu cytochromy P450, jsou totožné s DNA adukty výsledné inkubační směsi *o*-nitroanisolu s cytosolickými reduktasami⁶¹ (*kapitola 1.6.1*). To je nepopíratelný důkaz toho, že je v případě obou karcinogenů modifikace DNA zprostředkována shodným intermediátem, tedy NOHA, a je zároveň totožný i mechanismus vzniku karcinogeneze^{61,53}

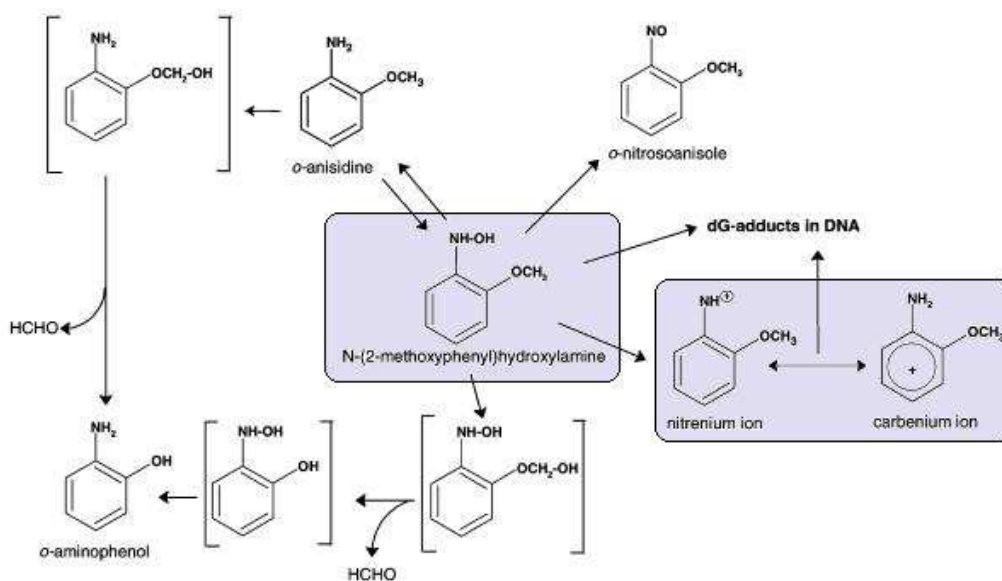
Vznik aduktů DNA po aktivaci *o*-anisidinu mikrosomálním systémem byly nejprve prokázány ve studiích *in vitro*, teprve později se podařilo změny detekovat také *in vivo* u hlodavců, konkrétně u potkanů⁶¹. Po expozici potkanů *o*-anisidinem bylo nalezeno určité množství modifikované DNA v cílovém orgánu *o*-anisidinu, tedy v močovém měchýři⁶¹. Vzhledem k tomu, že DNA adukty vzniklé v experimentech *in vivo* jsou stejné jako DNA adukty v *in vitro* experimentech (za přítomnosti cytochromů P450), lze se domnívat, že cytochromy P450 aktivují *o*-anisidin v modelovém organismu.

Krom amino skupiny působí cytochromy P450 i na metoxy skupinu *o*-anisidinu. Vyplývá to z nejnovějších studií laboratoře biochemie Přf UK, kde se podařilo identifikovat další látky vzniklé z *o*-anisidinu a jeho metabolitu N-(2-

metoxyfenyl)hydroxylaminu. Byla tak prokázána O-demethylační metabolická cesta *o*-anisidinu, při které vzniká *o*-aminofenol^{62,65}.

Pomocí metody HPLC a NOHA jako standardu mohl být prozkoumán další osud tohoto reaktivního metabolitu. NOHA se dále oxiduje na *o*-nitrosoanisol a zároveň i redukuje zpět na původní *o*-anisidin. Z takto vzniklého *o*-anisidinu se může oxidační demethylací tvořit opět *o*-aminofenol (obr. 14)^{62,65}. Metabolismus *o*-anisidinu zprostředkovaný cytochromy P450 by tak mohl být součástí reakcí redoxního cyklu. Zda by mohl *o*-aminofenol vznikat i z NOHA jeho O-demethylací na N-(2-hydroxyfenyl)hydroxylamin a následnou redukcí prokázáno nebylo (obr. 13)^{62,65}. Spontánní tvorba (tedy bez přítomnosti mikrosomálního systému či NADPH) výše popsaných metabolitů z NOHA byla metodou HPLC prokázána pouze v kyselém prostředí (pH 4.5)^{62,65}.

Důležité je zmínit, že NOHA je látkou velice nestabilní a snadno se rozkládá působením světla a tepla. V důsledku toho byly zmíněné experimenty využívající metodu HPLC doprovázeny problémy s kvantifikací této látky^{61,62,65}.



Obr. 14 Schéma metabolické oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450⁶²

Během studie se nepodařilo s přesností identifikovat jeden z píků HPLC chromatogramu inkubační směsi. Neshodoval se s žádnou sloučeninou použitou pro analýzu. Dle MS spektra koresponduje s nitreniovým iontem, na který se rozpadá NOHA. Není ale jisté, zda tento metabolit je opravdu nitreniový iont metabolizovaný z *o*-anisidinu,

nebo zda se jedná o produkt rozkladu tvořený během analýzy v hmotnostním spektrometru⁶².

Důležité je také určit, které cytochromy P450 se podílejí na metabolismu *o*-anisidinu. Výsledky naznačují, že *o*-anisidin je promiskuitním substrátem cytochromů P450. Při jeho přeměně jsou účinné rodiny P450 1A, 2B, 2E a 3A^{61,62,65}. Pomocí čistých enzymů, které byly rekonstituované s NADPH:P450 reduktasou bylo možné tuto studii specifikovat. Oxidace *o*-anisidinu byla prokázána u CYP 1A1, 1A2, 2B2, 2B4, 2E1 a 3A6. Z nich nejefektivnější je 2E1^{61,62,65}. Bohužel se nepodařilo zjistit, které cytochromy P450 se podílejí na O-demetylacii a které na N-hydroxylaci *o*-anisidinu. Ke studiu byly použity králíci, krysy a lidské mikrosomální systémy.

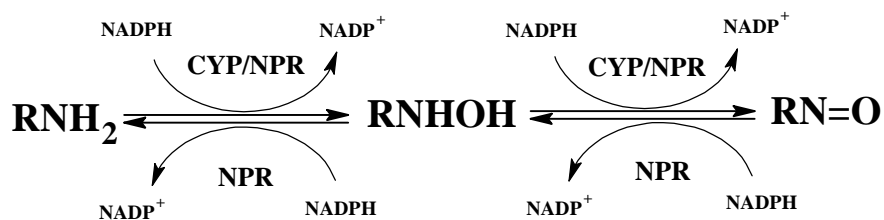
1.6.3 N-hydroxylační reakce karcinogenů (respektive aromatických aminů)

Tato kapitola je zaměřena na heterocyklické aromatické aminy (HAA), protože u nich byla N-hydroxylace, charakteristická pro všechny aromatické aminy, nejlépe prostudována⁴⁹. HAA, jak již bylo zmíněno výše, vznikají pyrolitickými procesy. K jejich tvorbě tak dochází tepelnou úpravou potravin nebo kouřením tabáku. Podobně jako u *o*-anisidinu bylo i u těchto sloučenin zjištěno, že způsobují vznik nádorových onemocnění^{49,66}.

HAA jsou (stejně jako *o*-anisidin, kapitola 1.6.2) aktivovány N-oxidačními reakcemi, které jsou zprostředkované cytochromy P450, konkrétně P450 1A1 a 1A2⁶⁷. Lze tedy předpokládat analogický mechanismus karcinogeneze jako u *o*-anisidinu a *o*-nitroanisolu.

Během aktivace HAA jaterními mikrosomy (konkrétně CYP 1A2/NPR systémem) byla pozorována zajímavá časová závislost spotřeby NADPH (Kim a kol., *Chem. Res. Toxicol.* 2004)⁴⁹. Výsledky poukazují na neobvyklý mechanismus této reakce, protože charakter časové závislosti oxidace NADPH byl sigmodiální (a nikoli lineární)⁴⁹. Jako možné vysvětlení byl navržen redoxní cyklus (obr. 15), během kterého se tvoří a zpětně redukuje heterocyklický nitroso produkt⁴⁹. HAA (RNH₂) je dle tohoto vzoru hydroxylován na RNHOH (hydroxylamin). Ten může být dodatečně oxidován na RN=O (nitroso produkt) cytochromy P450 za spotřeby NADPH (kapitola 1.3). Součástí tohoto cyklu je zároveň redukce nitroso sloučeniny zpět až na původní HAA a to působením samotné NPR

za další spotřeby NADPH. Tímto se může oxidační proces stále opakovat až do spotřebování NADPH⁴⁹.



Obr. 15 Navržený mechanismus redoxního cyklu HAA⁴⁹

Podle nejnovějších výsledků je velmi pravděpodobné, že takto navržený redoxní cyklus probíhá obdobným mechanismem také u *o*-anisidinu^{62,65}, nicméně tato kapitola zůstává otevřená pro další detailní studii.

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo řešení otázek souvisejících s objasněním mechanismu jakým jsou *o*-anisidin a *o*-nitroanisol metabolizovány a jak se uplatňují v procesu karcinogeneze. Řešení těchto otázek je částečně předmětem projektu výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy MSM 0021620808 (Molekulárně biologické, genetické a epigenetické aspekty vzniku a rozvoje modelových tumorů dospělého věku. Význam pro epidemiologii, časnou diagnostiku a léčbu). Práce byla vypracována na katedře biochemie PŘF UK.

Přesto, že se již několik studií věnovalo vysvětlení a popsání mechanismu biotransformace *o*-anisidinu a *o*-nitroanisolu, tuto kapitolu dosud není možné uzavřít. Metabolickou přeměnu *o*-nitroanisolu by bylo možné považovat za uspokojivě vyřešenou. *o*-Nitroanisol je oxidován cytochromy P450 na netoxické produkty a zároveň redukován xanthinoxidasou a DT-diforasou na reaktivní ultimální karcinogeny a finálně na *o*-anisidin^{52,54}. Ten je jednak aktivován peroxidasami a také cytochromy P450^{60,61}. A právě tato poslední biotransformační cesta, jmenovitě oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450, zůstává nedořešena. Tato diplomová práce se právě popsanou enzymovou reakcí bude zabývat. Snahou bylo přispět k objasnění mechanismu oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450. Především je třeba se zaměřit na osud reaktivního metabolitu NOHA, který primárně vzniká N-hydroxylační reakcí zprostředkovanou cytochromy P450 na dané aminoskupině.

Předkládaná diplomová práce byla vypracována za účelem splnění těchto cílů:

- Prostudovat možnou cyklickou oxidačně-redukční reakci na aminoskupině *o*-anisidinu. Ke studiu nepoužít metodou HPLC, jako doposud, ale spektrofotometrický přístup, sledující osud NADPH, jakožto zdroje elektronů pro cytochromy P450.
- Adaptovat z literatury, optimalizovat a evaluovat kolorimetrickou metodu pro reprodukovatelnou kvantifikaci N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu – tedy NOHA, která by tak mohla nahradit doposud používanou metodu stanovení pomocí HPCL.
- S nově vyvinutou metodou určit kinetické parametry tvorby NOHA a případně i jeho další enzymové přeměny zprostředkované cytochromy P450.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použitý materiál a chemikálie

Materiál a chemikálie, které byly použity v experimentech, pocházejí z následujících zdrojů:

Fluka (Švýcarsko)

dilauroylfosfatidylcholin (DLPC), methanol, bathofenanthrolin, *o*-anisidin, amylacetát

Lachema Brno (Česká republika)

CuSO₄·5H₂O, dithioničitan sodný, EDTA Na₂ (chelaton 3), ethanol, chloroform, KH₂PO₄, kyselina octová, octan sodný, NaHCO₃, Na₂CO₃, NaOH, vínan sodný, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄

Lachema Neratovice (Česká republika)

kyselina fosforečná, FeCl₃

Linde (Česká republika)

Dusík (g), oxid uhelnatý

Loba Feinchemie (Rakousko)

glutathion

Sevapharma, a.s (Česká republika)

hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma (USA)

4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), cytochrom c, sodná sůl 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonové kyseliny (HEPES), 1-heptansulfonová kyselina, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylamonium]-1-propansulfonát (CHAPS), nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH)

**Dar z Oddělení molekulární toxikologie Německého centra výzkumu rakoviny
v Heidelbergu:**

N-(2-metoxyfenyl)hydroxylamin

Mikrosomální systémy a jiné enzymové preparáty použité v této práci byly izolovány kolegy laboratoře biochemie PřF UK, kterým tímto děkuji za možnost jejich využití.

3.2 Použité přístroje

Spektrofotometr:

Hewlett Packard E8453 (USA)

Centrifugy:

Sanyo Microcentaur MSE (Velká Británie)

Stolní centrifuga Labnet international (Korea)

Váhy:

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

Další přístroje:

pH metr ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (USA), thermomixer Eppendorf

(Německo), vortex MS 1 Minishaker (Německo), sonikátor Ultrasonic Compact Cleaner

Teson1 Tesla (Česká republika), termostatovaná lázeň Julabo TW 8 Schoeller Instruments

(Německo)

3.3 Metody

3.3.1 Charakterizace použitých enzymových preparátů

3.3.1.1 Stanovení koncentrace cytochromu P450

Pro cytochromy P450 je charakteristické absorpční maximum při 450 nm, které vykazují v redukovaném stavu v komplexu s CO¹⁸. Tohoto zjištění se využívá ke stanovení koncentrace cytochromu P450 metodou diferenční spektroskopie.

Do kyvety o optické dráze 1 cm bylo pipetováno 980 µl fosfátového pufru (0,1 M, NaH₂PO₄, pH 7,4) a přidáno 20 µl vzorku. K takto vhodně zředěnému vzorku bylo přidáno malé množství (~1 mg) dithioničitanu sodného, čímž došlo k redukci cytochromu P450. Po promíchání byla směs změřena na jednopaprskovém přístroji Hewlett Packard 8453 E jako „blank“. Poté byl vzorek sycen proudem oxidu uhelnatého po dobu 45 sekund a následně bylo měřeno diferenční spektrum.

Získané hodnoty absorbancí byly vypočteny dle vzorce:

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

c_{P450}koncentrace cytochromu P450

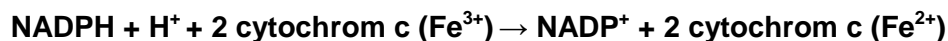
A_x absorbance při vlnové délce x nm

ϵ_{P450}molární absorpční koeficient redukovaneho cytochromu P450 v komplexu s CO ($\epsilon = 91 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$)

3.3.1.2 Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy

Aktivitu NADPH:cytochrom P450 reduktasy lze stanovit měřením rychlosti redukce jiného substrátu než je cytochrom P450, což je cytochrom c, za současné oxidace NADPH. Přírůstek redukovaneho cytochromu c je měřen při vlnové délce 550 nm⁶⁸.

Měření je založeno na následující reakci zprostředkované NADPH:P450 reduktasou:



Do kyvety o optické dráze 1 cm bylo pipetováno 10 μl vhodně zředěného vzorku (aby byla změna absorbance lineární alespoň po dobu 1 minuty) a doplněno do 1 ml pufrům s cytochromem c (0,3 M KH_2PO_4 , 0,5 mg/ml cytochromu c; 1 mM EDTA Na_2 ; pH 7,5). Po promíchání byl roztok měřen na jednopaprskovém přístroji Hewlett Packard 8453 E jako „blank“.

Pro nastartování reakce bylo do roztoku přidáno 10 μl NADPH (10 mM), rychle promícháno a měřena absorbance při 550 nm po dobu 100 s.

Aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy byla vypočítána ze směrnice závislosti absorbance při 550 nm na čase dle vzorce:

$$a_{\text{red}} = (\text{sm} / \epsilon_{\text{red}} \cdot \Delta t) \cdot \text{ředění} \quad [\mu\text{mol}_{\text{cytc}}/\text{min}\cdot\text{ml}]$$

a_{red}aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy

smsměrnice závislosti absorbance na čase

ϵ_{red}molární absorpční koeficient redukované formy cytochromu c ($\epsilon = 21,01 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$)

Δt změna času

3.3.1.3 Stanovení koncentrace proteinu metodou BCA

Metoda pro stanovení koncentrace proteinů (dle Wiechelmana a kol.)⁶⁹ je založena na měření intenzity modrého komplexu, vzniklého reakcí měďných iontů s 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou (BCA) v alkalickém prostředí. Měďnaté ionty přítomné v činidle (stabilizované jako vínanový komplex) jsou redukovány na měďné postraními skupinami některých aminokyselin. Intenzita zabarvení (A_{562}) je pak přímo úměrná koncentraci bílkoviny.

Činidlo pro stanovení koncentrace proteinu bylo těsně před upotřebením připraveno rozpuštěním BCA ve 49 dílech roztoku A (0,4% NaOH; 0,95% NaHCO_3 ; 2% Na_2CO_3 ; 0,16 % vínan sodný; pH 11,25) tak, aby výsledná koncentrace byla 1 % BCA v 50 dílech. Nakonec byl přidán 1 díl roztoku B (4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ v destilované vodě).

Do pečlivě vyžíhaných zkumavek bylo k 20 μl vzorku (ředěných podle potřeby destilovanou vodou) přidáno 480 μl činidla. Pro sestrojení kalibrační křivky bylo pipetováno 1; 2; 5; 10; 15 a 20 μl standardu BSA (1 mg/ml), doplněno destilovanou vodou do 20 μl a přidáno 480 μl činidla.

Vzorky byly inkubovány při teplotě 60 °C po dobu 45 minut. Poté byla změřena absorbance ochlazených vzorků různě koncentrovaného standardu při 562 nm proti „slepému“ vzorku, který neobsahoval roztok bílkoviny, ale destilovanou vodu. Stejným způsobem byla proměřena i absorbance vzorků. Po sestrojení kalibrační křivky byla určena koncentrace proteinů ve vzorcích. Měření bylo provedeno na přístroji Hewlett Packard 8453 E v kyvetě o optické dráze 1 cm.

3.3.1.4 Příprava rekonstituovaného systému

Aby byl systém MFO, obsahující jedinou izoformu cytochromu P450 (CYP), funkční, je zapotřebí NADPH:P450 reduktasy (NPR, sloužící jako donor elektronů potřebných pro činnost CYP) a dilauroylfosfatidylcholinu (DLPC), který vytváří liposomy a tím napodobuje prostředí membrány ER.

Pro přípravu rekonstituovaného systému byly použity následující enzymy: CYP 1A1 (potkaní; 9,2 μM), CYP 1A2 (králičí; 4,3 μM), NADPH:cytochrom P450 reduktasa (králičí; 13,8 μM).

Rekonstituovaný systém o celkovém objemu 350 μl (CYP 1A1) a 250 μl (CYP 1A2) obsahoval:

- 0,5 μM cytochrom P450 1A1/2
- 0,6 μM NADPH:P450 reduktasa
- 0,05 mg/ml CHAPS (0,5 mg/ml v pufru HEPES)
- 2 mg/ml DLPC (5 mg/ml v chloroformu)
- 3 mg/ml glutathion (30 mg/ml zásobní roztok v H_2O)
- 50 mM HEPES (500 mM zásobní roztok v H_2O ; pH 7,4)

Roztok DLPC v chloroformu o koncentraci 5 mg/ml byl ve skleněné zkumavce odpařen do sucha pod proudem dusíku. Po vytvoření tenké lipidové vrstvy na stěnách zkumavky byl v množství odpovídající výše uvedené koncentraci přidán roztok HEPES,

CHAPS a glutathion. Vytvořený roztok byl 3 x 0,5 minuty sonikován (Ultrasonic Compact Cleaner Teson1) a poté byly přidány dle uvedeného rozpisu CYP 1A1/2 a NADPH:P450 reduktasa. Směs byla nadále inkubována po dobu 5 minut při laboratorní teplotě.

3.3.2 Časová závislost spotřeby NADPH během inkubace s *o*-anisidinem

Pro studii spotřeby NADPH během inkubace s *o*-anisidinem bylo použito pět různých mikrosomálních systémů. Byly získány z králíků a potkanů preindukovaných fenobarbitalem (indukce CYP 2B, králíčí), etanolem (indukce CYP 2E1, potkaní) a β -naftoflavonem (indukce CYP 1A1/2, králíčí a potkaní).

Charakteristika mikrosomálních systémů je uvedena v *tabulce 1 (kapitola 4.1)*.

Inkubační směsi o celkovém objemu 1 ml byly připraveny v následujícím složení:

- 0,77 – 3 μ M celkový cytochrom P450 (CYP)
- 100 μ M *o*-anisidin (10 mM zásobní roztok v methanolu)
- 150 μ M NADPH (10 mM zásobní roztok v pufru)
- fosfátový pufr (100 mM NaH₂PO₄, pH 7,4)

Jednotlivé složky byly přidávány vždy v takovém množství, aby jejich zastoupení ve směsi odpovídalo výše uvedeným koncentracím a přitom množství organického rozpouštědla (methanolu) nepřesáhlo 1% inkubační směsi.

Koncentrace CYP byla vhodně zvolena v závislosti na typu mikrosomálního systému tak, aby bylo možné v takto připraveném vzorku spektrofotometricky pozorovat pokles absorbance NADPH.

Do kyvety o optické dráze 1 cm bylo pipetováno odpovídající množství *o*-anisidinu, CYP a doplněno pufrům do 1 ml. Po promíchání byl roztok změřen jako „blank“ na jednopaprskovém přístroji Hewlett Packard 8453 E. Reakce byla zahájena přidáním NADPH a ihned sledována změna absorbance při 340 nm.

Měření bylo provedeno v programu Chemstation (Agilent) za použití následujících parametrů: *Integration time: 2 s*

Run time: 900 s

Cycle time: 2 s

3.3.3 Stanovení poměru mezi spotřebou NADPH a *o*-anisidinu

Pro stanovení poměru spotřeby NADPH ku *o*-anisidinu byl spektrofotometricky sledován úbytek absorbance NADPH v závislosti na koncentraci *o*-anisidinu při 340 nm (tedy absorpčním maximu redukovaného NADPH).

3.3.3.1 Inkubace *o*-anisidinu s mikrosomy

Použity byly králičí fenobarbitalové mikrosomy ($c_{P450} = 91,3 \mu\text{M}$, $c_p = 54,4 \text{ mg/l}$, $a_{\text{red}} = 8,8 \mu\text{mol cytc/min.ml}$, *tab. 1, kapitola 4.1*).

Inkubační směsi o celkovém objemu 1 ml byly připraveny v tomto složení:

- 1,5 μM celkový cytochrom P450 (CYP)
- 25 – 150 μM *o*-anisidin (10 mM zásobní roztok v methanolu)
- 150 μM NADPH (10 mM zásobní roztok v pufru)
- fosfátový pufr (100 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4)

Do kyvety o optické dráze 1 cm bylo pipetováno CYP a *o*-anisidin (množství odpovídající poměrům NADPH : *o*-anisidin 1 – 6) dle výše uvedených koncentrací a doplněno pufrům do 1 ml. Takto připravený roztok byl změřen na jednopaprskovém přístroji Hewlett Packard 8453 E jako „blank“. Po přidání NADPH (a tedy po „nastartování“ reakce) byla ihned sledována změna absorbance při 340 nm.

Měření bylo provedeno v programu Chemstation (Agilent) za použití následujících parametrů: *Integration time: 2 s*

Run time: 1700 s

Cycle time: 2 s

3.3.3.2 Inkubace *o*-anisidinu s rekonstituovaným systémem

Byly použity dva rekonstituované systémy a to jmenovitě systém obsahující potkaní CYP 1A1 a systém králičí CYP 1A2.

Složení inkubační směsi o celkovém objemu 500 µl bylo následující:

- 0,1 µM cytochrom P450 v rekonstituovaném systému (*kapitola 3.3.1.4*)
- 25 – 100 µM *o*-anisidin (10 mM zásobní roztok v methanolu), nebo 100 µM NOHA nebo 100 µM Sudan I
- 150 µM NADPH (10 mM zásobní roztoku v pufru)
- fosfátový pufr (100 mM NaH₂PO₄, pH 7,4)

Do kyvety o optické dráze 1 cm bylo pipetováno uvedené množství CYP v rekonstituovaném systému a doplněno pufrům na příslušný objem. Promíchaný roztok byl změřen na jednopaprskovém přístroji Hewlett Packard 8453 E jako „blank“. Po přidání NADPH byla spektrofotometricky zaznamenávána časová závislost oxidace tohoto koenzymu jako pokles absorbance při vlnové délce 340 nm. Během měření bylo do roztoku postupně přidáváno takové množství *o*-anisidin, aby ve výsledku bylo ve směsi dosaženo jeho 100 µM koncentrace. Posléze byl přidán NOHA a nakonec také Sudan I. Měření bylo provedeno v programu Chemstation (Agilent) za použití následujících parametrů: *Integration time: 2 s*

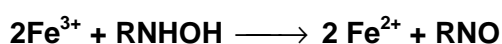
Run time: 3600 s

Cycle time: 2 s

3.3.4 Kolorimetrické stanovení N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu (původní metoda dle Kadlubar a kol.)⁷⁰

Tvorba N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu (NOHA) byla sledována kolorimetrickou metodou se spektrofotometrickou detekcí, založenou na redukci Fe³⁺ iontů na Fe²⁺. Železnaté ionty by však v roztoku byly natolik nestabilní, že je lze kvantitativně stanovit jen v komplexu s 4,7-difenyl-1,10-fenanthrolinem (DPF). Komplex Fe²⁺-DPF má charakteristické zbarvení s absorpčním maximem při 535 nm.

Dva ekvivalenty Fe³⁺ jsou redukovány jedním ekvivalentem N-hydroxylderivátu dle rovnice:



Pro stanovení NOHA tvořeného z *o*-anisidinu byly použity mikrosomy králíků a potkanů premedikovaných fenobarbitalem (indukce CYP 2B4 u králíka), etanolem (CYP 2E1) a β -naftoflavonem (CYP 1A1/2, *tab. 1, kapitola 4.1*).

Inkubační směs o celkovém objemu 1 ml měla následující složení:

- 1 - 2 μ M celkový cytochrom P450 (CYP)
- 100 μ M *o*-anisidin (10 mM zásobní roztok v methanolu)
- 150 μ M NADPH (10 mM zásobní roztok v pufru)
- fosfátový pufr (100 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4)

Po přidání NADPH k ostatním výše uvedeným složkám byla směs inkubována 10 minut při 37 °C. Reakce byla terminována extrakcí produktů reakce 1 ml amylacetátu (vortex MS 1 Minishaker, 10 s). Obě fáze byly odděleny centrifugací při 13000 RPM po dobu 15 s (Sanyo Microcentaur MSE). Poté bylo do kyvety o optické dráze 1 cm odebráno 200 μ l amylacetátového extraktu a ihned přidáno 940 μ l činidla „bathosolution I“. Reakce byla ukončena po 3 minutách přidávkem 40 μ l H_3PO_4 (20 mM roztok v H_2O). Dále byla měřena absorbance vzorku při 535 nm na jednopaprskovém přístroji Hewlett Packard 8453 E. Zároveň byla měřena absorbance při vlnové délce 655 nm, která byla zvolena jako referenční.

Jako „blank“ byl použit roztok připravený stejným postupem jako měřený vzorek s tím rozdílem, že namísto *o*-anisidinu obsahoval fosfátový pufr (100 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4).

Koncentrace NOHA byla vypočtena dle vzorce (dva ekvivalenty Fe^{3+} jsou redukovány jedním ekvivalentem N-hydroxylderivátu):

$$c_{\text{NOHA}} = A_{535} / (2 \cdot \epsilon \cdot l) \cdot \text{ředění} \quad [\mu\text{M}]$$

c_{NOHA}koncentrace NOHA

A_{535} absorbance při vlnové délce 535 nm

ϵmolární absorpční koeficient DPF v komplexu s Fe^{2+} ($\epsilon = 0,039200 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

l délka kyvety

Činidlo „bathosolution I“, které bylo připraveno těsně před použitím, mělo v objemu 940 μ l toto složení:

- 100 μ l roztok CH_3COOH (60 mM roztok v H_2O) a CH_3COONa (40 mM roztok v H_2O)
- 600 μ l etanol (96 %)
- 200 μ l roztok DPF [5 mg/ml v amylacetátu : etanolu (15:1)]
- 40 μ l FeCl_3 (0,1 M roztok v H_2O)

Roztok DPF (připravený smísením DPF v amylacetátu a etanolu) byl zahříván pod proudem horké vody do jeho úplného rozpuštění. Poté byl přidán etanol a pufrovací roztok CH_3COOH a CH_3COONa . Kvůli nestabilitě činidla byl FeCl_3 přidán těsně před použitím.

Důležité bylo, aby experimenty proběhly co možná nejrychleji (doba jednoho stanovení je přibližně 7 minut) a pokud možno bez přístupu světla.

3.3.4.1 Stanovení chyby způsobené extrakcí a zdánlivého extinkčního koeficientu pro výpočet koncentrace NOHA

Pro stanovení ztrát, ke kterým dochází během extrakce, byl použit 50 μ M roztok NOHA v amylacetátu. K 200 μ l tohoto roztoku bylo přidáno 940 μ l činidla „bathosolution I“ a po ukončení reakce přidáním 40 μ l 20 mM H_3PO_4 (po 3 minutách inkubace) byla měřena absorbance při 535 nm.

(Tento postup byl zároveň použit pro stanovení zdánlivého extinkčního koeficientu pro výpočet koncentrace NOHA).

Poté byl použit 50 μ M roztok NOHA v pufru, který byl z objemu 1 ml vyextrahován do 1 ml amylacetátu. Postup stanovení je nadále shodný s již uvedeným postupem v kapitole 3.3.4.

Roztoky „blanku“ byly připraveny stejným postupem jako měřený vzorek s tím rozdílem, že namísto NOHA obsahovaly čistý amylacetát.

Zdánlivý molární absorpční koeficient pro výpočet koncentrace NOHA byl vypočten dle vzorce:

$$\epsilon_{535 \text{ zdánlivý}} = A_{535 \text{ nam}} / (2 \cdot c_{\text{použ}} \cdot l) \cdot \text{ředění} \quad [\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$$

$\epsilon_{535 \text{ zdánlivý}}$zdánlivý molární absorpční koeficient DPF v komplexu s Fe^{2+} pro výpočet koncentrace NOHA

$A_{535, \text{ nam}}$ naměřená absorbance NOHA při vlnové délce 535 nm

$c_{\text{použ}}$použitá koncentrace NOHA jako standardu

l délka kyvety

Koncentrace NOHA byly vypočteny z Lambert–Beerova zákona za použití stanoveného zdánlivého extinkčního koeficientu:

$$c_{\text{NOHA}} = A_{535} / (2 \cdot \epsilon_{535 \text{ zdánlivý}} \cdot l) \cdot \text{ředění} \quad [\mu\text{M}]$$

c_{NOHA}koncentrace NOHA

A_{535} absorbance při vlnové délce 535 nm

$\epsilon_{535 \text{ zdánlivý}}$zdánlivý molární absorpční koeficient DPF v komplexu s Fe^{2+} (viz. *výsledky, kapitola 4.3, str. 61*)

l délka kyvety

3.3.4.2 Stanovení rušivého vlivu dalších látek přítomných v inkubační směsi

Falešně pozitivní výsledky (způsobené *o*-anisidinem, NADPH či mikrosomy) byly validovány za pomoci povařených mikrosomů (cca 10 minut ve vroucí vodní lázni v uzavřených Eppendorových zkumavkách), které tímto ztratily enzymovou aktivitu.

Postup stanovení je shodný s postupem popsáním v *kapitole 3.3.4*.

3.3.5 Optimalizace kolorimetrického stanovení N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu

Optimalizace kolorimetrického stanovení NOHA byla provedena za použití králičích fenobarbitalových mikrosomů ($c_{\text{P450}} = 91,3 \mu\text{M}$, $c_{\text{p}} = 54, 4 \text{ mg/l}$, $a_{\text{red}} = 8,8 \mu\text{mol cytc/min.ml}$, *tab. 1, kapitola 4.1*).

Inkubační směs o celkovém objemu 900 μ l měla následující složení:

- 1,5 μ M celkový cytochrom P450 (CYP)
- 100 μ M *o*-anisidin (10 mM zásobní roztok v methanolu)
- 150 μ M NADPH (10 mM zásobní roztok v pufru)
- fosfátový pufr (100 mM NaH₂PO₄, pH 7,4)

Po 10 minutové inkubaci směsi při 37 °C bylo přidáno 900 μ l amylacetátu, do kterého byly produkty reakce vyextrahovány (vortex MS 1 Minishaker, 10 s) a následně zcentrifugován při 13000 RPM po dobu 15 s (Sanyo Microcentaur MSE). Poté bylo 600 μ l extraktu přidáno do kyvety o optické dráze 1 cm k 500 μ l činidla „bathosolution II“, důkladně promícháno a ihned zaznamenávána absorbance při 535 nm. V záznamu absorbance při 535 nm bylo pokračováno tak dlouho, dokud docházelo k její změně. Jako korekce na pozadí byla měřena absorbance také při 655 nm.

„Blank“ byl připraven vyextrahováním 900 μ l fosfátového pufru (100 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) do 900 μ l amylacetátu.

Činidlo „bathosolution II“ mělo v objemu 940 μ l následující složení:

- 20 μ l roztok CH₃COOH (60 mM roztok v H₂O) a CH₃COONa (40 mM roztok v H₂O)
- 680 μ l etanol (96 %)
- 200 μ l roztok DPF [0,5 mg/ml v amylacetátu : etanolu (15:1)]
- 4 μ l FeCl₃ (0,1 M roztok v H₂O)

Činidlo bylo připraveno postupem popsáním v kapitole 3.3.4.

3.3.5.1 Ověření lineární odezvy optimalizované kolorimetrické metody pro stanovení N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu

Studie byla uskutečněna za použití králičích fenobarbitalových mikrosomů ($c_{P450} = 91,3 \mu$ M, $c_p = 54,4 \text{ mg/l}$, $a_{red} = 8,8 \mu$ mol cytc/min.ml, *tab. 1, kapitola 4.1*).

Nejprve bylo do fosfátového pufru (100 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) o objemu 900 µl přidáno takové množství zásobního roztoku NOHA (1 mM roztok v methanolu), aby výsledná koncentrace ve směsi odpovídala jeho 1.1; 2,55 a 5 µM koncentraci. Poté byl vzorek vyextrahován do 900 µl amylacetátu (vortex MS 1 Minishaker, 10 s). Po zcentrifugování (při 13000 RPM po dobu 15 s, Sanyo Microcentaur MSE) byla tvorba NOHA stanovena optimalizovaným postupem popsaným v kapitole 3.3.5.

Tento postup byl také využit pro získání hodnoty zdánlivého extinkčního koeficientu pro výpočet NOHA optimalizovanou kolorimetrickou metodou (kapitola 3.3.5). Vzorec pro získání tohoto parametru, stejně jako pro koncentraci NOHA z něho vyvozené, je shodný s kapitolou 3.3.4.1.

3.3.6 Kinetická studie tvorby N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu jako produktu oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450 (kolorimetricky)

Měření byla provedena za použití králíčích fenobarbitalových mikrosomů ($c_{P450} = 91,3 \mu\text{M}$, $c_p = 54,4 \text{ mg/l}$, $a_{\text{red}} = 8,8 \mu\text{mol cytc/min.ml}$, *tab. 1, kapitola 4.1*).

3.3.6.1 Stanovení časové závislosti tvorby N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu

Inkubační směs o celkovém objemu 5 ml byla připravena v následujícím složení:

- 1,5 µM celkový cytochrom P450 (CYP)
- 100 µM *o*-anisidin (10 mM zásobní roztok v methanolu)
- 150 µM NADPH (10 mM zásobní roztok v pufru)
- fosfátový pufr (100 mM NaH₂PO₄, pH 7,4)

Jednotlivé složky byly do směsi přidávány v množstvích odpovídající uvedeným koncentracím. Dále byl roztok inkubován při 37 °C v termostátové lázni (Julabo TW 8 Schoeller Instruments). Inkubace byla iniciována přidáním NADPH. Poté bylo ze směsi v jednotlivých časech ($t = 2; 4; 8$ a 16 minut) odebráno množství 1 ml a následně přidáno ke stejnému množství amylacetátu (1 ml), do kterého byly produkty reakce vyextrahovány (vortex MS 1 Minishaker, 10 s). Po zcentrifugování (při 13000 RPM po dobu 15 s, Sanyo Microcentaur MSE) bylo odebráno 200 µl extraktu do kyvety o optické dráze 1 cm a

vzápětí přidáno 940 μl činidla „bathosolution I“. Roztok byl inkubován 3 minuty za laboratorní teploty. Barevná reakce byla terminována přidavkem 80 μl H_3PO_4 (20 mM) a ihned měřena absorbance na jednopaprskovém přístroji Hewlett Packard 8453 E při 535 nm. Zároveň byla měřena absorbance při vlnové délce 655 nm, která byla zvolena jako referenční.

Jako „blank“ byl použit roztok, který byl připraven stejným postupem jako měřený vzorek s tím rozdílem, že namísto *o*-anisidinu obsahoval fosfátový pufr (100 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4).

Činidlo „bathosolution I“ bylo připraveno stejným postupem jako v kapitole 3.3.4.

3.3.6.2 Stanovení kinetických konstant tvorby N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu jako produktu oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450

Inkubační směs o celkovém objemu 900 μl byla připravena v následujícím složení:

- 1,5 μM celkový cytochrom P450 (CYP)
- 10 – 100 μM *o*-anisidin (10, 25, 50, 100 μM , 10mM zásobní roztok v methanolu)
- 150 μM NADPH (10 mM zásobní roztok v pufru)
- fosfátový pufr (100 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4)

Postup stanovení je shodný s postupem popsáním v kapitole 3.3.5 s tím rozdílem, že směs byla před extrakcí (množstvím 900 μl amylacetátu) inkubována 2 minuty při 37 °C (namísto 10 minut).

Jako „blank“ byl použit fosfátový pufr (100 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4) vyextrahovaný do 900 μl amylacetátu.

3.3.6.3 Stanovení kinetických konstant úbytku N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu při jeho následné oxidaci cytochromy P450

Inkubační směs o celkovém objemu 3 ml byla připravena v následujícím složení:

- 1,5 μM celkový cytochrom P450 (CYP)
- 50 μM NOHA (10mM zásobní roztok v methanolu)
- 150 μM NADPH (10 mM zásobní roztok v pufru)
- fosfátový pufr (100 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4)

Inkubační směs byla inkubována při 37 °C v termostatové lázni (Julabo TW 8 Schoeller Instruments). Inkubace byla iniciována přidáním NADPH. Poté bylo ze směsi v jednotlivých časech ($t = 2 ; 4$ a 8 minut) odebráno množství 900 μl a následně přidáno ke stejnému množství amylacetátu (900 μl), do kterého byly produkty reakce vyextrahovány (vortex MS 1 Minishaker, 10 s). Po zcentrifugování (při 13000 RPM po dobu 15 s, Sanyo Microcentaur MSE) bylo odebráno 600 μl extraktu do kyvety o optické dráze 1 cm a vzápětí přidáno 500 μl činidla „bathosolution II“. Postup stanovení je dále shodný s postupem popsaným v kapitole 3.3.5.

Jako „blank“ byl použit fosfátový pufr (100 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4) vyextrahovaný do 900 μl amylacetátu.

4 VÝSLEDKY

4.1 Charakterizace použitých enzymových preparátů

Pro účely dané diplomové práce bylo použito pět různých mikrosomálních systémů. Byly získány z králíků a potkanů premedikovaných fenobarbitalem (indukce CYP 2B u králíka a potkana), etanolem (indukce CYP 2E1 u potkana) a β -naftoflavonem (indukce CYP 1A1/2 u potkana a králíka).

Charakteristika mikrosomálních systémů je uvedena v *tabulce 1*. Nejvyšší koncentraci cytochromu P450 obsahovaly preparáty mikrosomálních systémů králíka a potkana preindukovaných fenobarbitalem. Aktivita NPR byla ve všech experimentálních systémech srovnatelná. Nicméně nejvyšší naměřenou hodnotu obsahoval preparát králíčích β -naftoflavonových mikrosomů a nejmenší preparát potkaních β -naftoflavonových mikrosomů. Nejvyšší koncentrace proteinů byla naměřena u potkaního fenobarbitalového mikrosomálního vzorku, nejnižší pak u mikrosomální frakce králíka premedikovaného β -naftoflavonem.

Tab. 1 Charakterizace použitých mikrosomálních systémů

Induktor	Koncentrace proteinu (mg/l)	Aktivita NPR ([μmol cytc/min/ml])	Koncentrace cytochromu P450 [μM]
fenobarbital (králík)	54,4	8,8	91,3
fenobarbital (potkan)	77,9	8,1	76,9
etanol (potkan)	33,4	8,4	30,1
β -naftoflavon (potkan)	41,1	4,3	32,3
β -naftoflavon (králík)	15,2	10,5	55,3

4.2 Studium redoxního cyklu v metabolismu *o*-anisidinu cytochromy P450

Jedním z cílů diplomové práce byla snaha o objasnění dalšího osudu N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu (NOHA), který vzniká během oxidace *o*-anisidinu katalyzované cytochromy P450^{61,62,65}. Metabolit se oxiduje na nitroso produkt^{62,65} (případně až na nitro sloučeninu) a je pravděpodobné, že během inkubace dochází zároveň k jeho částečné zpětné redukci na *o*-anisidin zprostředkované NADPH:cytochrom P450 reduktasou^{62,65} (je zde také možnost neenzymatické redukce pouze v přítomnosti NADPH).

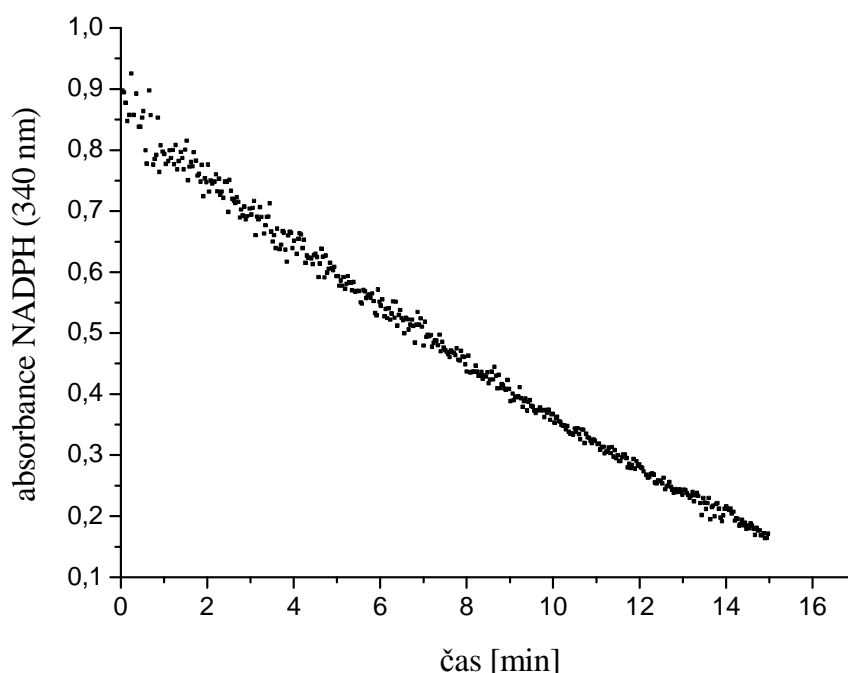
K řešení této problematiky byly navrženy a využity především spektrofotometrické postupy namísto doposud používané metody HPLC^{61,62,65} z důvodů jejich časové nenáročnosti. NADPH přítomné v inkubační směsi má charakteristické absorpční maximum při 340 nm. Na základě této skutečnosti mohl být během inkubace, jako přímá úměrnost k poklesu absorbance při 340 nm, sledován úbytek NADPH, z něhož by mohlo být možné vyvodit charakter oxidačních reakcí probíhajících na amino skupině *o*-anisidinu.

4.2.1 Časová závislost spotřeby NADPH během inkubace *o*-anisidinu s cytochromy P450

Metoda byla použita na základě analogie se studií provedenou Kimem a kol. (*Chem. Res. Toxicol.* 2004)⁴⁹ zabývající se metabolismem heterocyklyckých aromatických aminů MFO systémem a během níž byla sledována časová závislost spotřeby NADPH. Protože tato závislost (dle Kim a kol.) měla v případě některých substrátů sigmoidální charakter, lze se domnívat, že NADPH je během inkubace spotřebováno nerovnoměrně. Čím více vzniká produktů reakce, tím více se spotřebovává NADPH. A to proto, že NADPH dodává elektrony NADPH:cytochrom P450 reduktase a ta je pak předá cytochromu P450 a způsobí oxidaci substrátu. Navíc ale může NADPH:cytochrom P450 reduktasa sama bez cytochromu P450 redukovat takto vzniklý produkt zpět na výchozí substrát.

Pro měření časové závislosti spotřeby NADPH během inkubace s *o*-anisidinem bylo použito 5 různých mikrosomálních frakcí (*tab. 1*) s cílem pozorovat vliv jejich indukce na metabolismus *o*-anisidinu. Během studie byl pozorován úbytek absorbance při 340 nm a NADPH se tedy spotřebovávalo v průběhu oxidace *o*-anisidinu MFO systémem. Daný

pokles vykazoval spíše charakter lineární než sigmoidální. Nicméně nepatrnou tendenci k sigmoidálnímu průběhu této závislosti není možné zcela vyloučit. Podobné chování bylo pozorované u všech použitých mikrosomálních systémů. Protože se naměřené hodnoty rychlosti spotřeby NADPH u jednotlivých mikrosomálních frakcí příliš neliší, je pro názornost uvedena z naměřených časových závislostí pouze jedna. Jako reprezentativní byl vybrán experiment studující časovou závislost spotřeby NADPH během inkubace *o*-anisidinu s králičími fenobarbitalovými mikrosomy (obr. 16).



Obr. 16 Časová závislost spotřeby NADPH během inkubace *o*-anisidinu s fenobarbitalovými králičími mikrosomy. Inkubační směs obsahovala v 1 ml fosfátového pufru 100 μ M *o*-anisidin, 1,5 μ M fenobarbitalové mikrosomy, 150 μ M NADPH.

Tabulka 2 shrnuje rychlost spotřeby NADPH při oxidaci *o*-anisidinu pro všechny použité mikrosomální systémy. Rychlost vyjádřena jako změna absorbance při 340 nm v čase byla pro fenobarbitalové mikrosomy vypočtena ze směrnice lineární regrese odečtené z grafu (obr. 16), nebo analogických grafů odpovídajících ostatním mikrosomálním preparátům. Celkové rychlosti spotřeby NADPH se navzájem příliš neliší, zato jeví spíše souvislost s celkovým obsahem proteinu v příslušném preparátu (tab. 1).

Tab. 2 Spotřeba NADPH během oxidace *o*-anisidinu mikrosomálními systémy. Inkubační směs obsahovala v 1 ml fosfátového pufru 100 μM *o*-anisidin, 1,5 μM mikrosomy, 150 μM NADPH.

Použité mikrosomy	spotřeba NADPH [$\Delta A_{340} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$] $\cdot 10^{-4}$
fenobarbital (králík)	4,6
fenobarbital (potkan)	7,7
etanol (potkan)	5,5
β -naftoflavon (potkan)	4
β -naftoflavon (králík)	2,6

4.2.2 Stanovení poměru mezi spotřebou NADPH a *o*-anisidinu

Kromě měření časové závislosti spotřeby NADPH během inkubace *o*-anisidinu s cytochromy P450, je důležité stanovit poměr mezi množstvím spotřebovaného NADPH a množstvím přeměněného *o*-anisidinu v průběhu oxidace cytochromy P450. Protože lze očekávat, že na oxidační přeměnu jedné molekuly *o*-anisidinu připadá jedna molekula NADPH, bylo by za přítomnosti redoxního cyklu možné pozorovat výrazné zvýšení tohoto poměru. A to například na dvojnásobek, pokud by každá molekula byla jednou přeměněna na NOHA a ten by byl zpět zredukován na parentální *o*-anisidin.

Měření bylo provedeno nejprve za přítomnosti mikrosomálního systému, poté za použití systému zcela definovaného a purifikovaného, sestávajícího se z izolovaného cytochromu P450 rekonstituovaného s NADPH:P450 reduktasou.

4.2.2.1 Inkubace *o*-anisidinu s mikrosomálním systémem

Měření spočívalo ve sledování poklesu absorbance NADPH při různých koncentracích *o*-anisidinu (poměr NADPH : *o*-anisidinu v rozmezí 1 – 6). Míra úbytku absorbance tedy určuje, kolik se tohoto koenzymu při dané koncentraci *o*-anisidinu spotřebovalo.

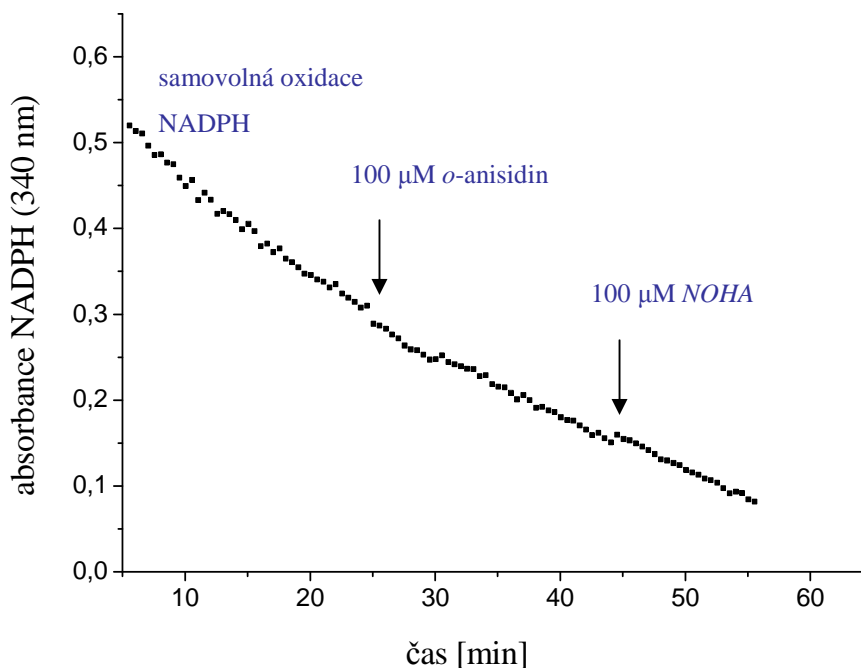
Během studie se ukázalo, že NADPH se v přítomnosti mikrosomálního systému překvapivě rychle samovolně oxiduje. Krom kyslíku mohou být důvodem přítomné mikrosomální proteiny. Autooxidace byla natolik rychlá, že pozorovat změnu úbytku absorbance NADPH v závislosti na koncentraci *o*-anisidinu nebylo možné. Dalším návrhem tedy bylo namísto mikrosomů použít systém cytochromu P450 rekonstituovaný s NADPH:P450 reduktasou, a vyloučit tak možnost, že za tuto rychlou spotřebu NADPH zodpovídá nějaký jiný enzym přítomný v jaterních mikrosomálních preparátech.

4.2.2.2 Inkubace *o*-anisidinu v přítomnosti rekonstituovaného systému

Protože jsou cytochromy P450 samy o sobě nefunkční, bylo zapotřebí je rekonstituovat s NADPH:P450 reduktasou a spolu s liposomální membránou tak vytvořit prostředí simulující membránu hladkého endoplazmatického retikula. Použity byly cytochromy P450 1A1 a 1A2 (viz metody, kapitola 3.3.1.4).

Během experimentu byla sledována časová závislost změny absorbance NADPH, ke které by mělo docházet vlivem vzrůstající koncentrace *o*-anisidinu postupně přidávaného do směsi rekonstituovaného systému cytochromu P450 1A1. Ukazuje se, že v tomto případě je samovolná oxidace NADPH (ve srovnání s oxidací vyvolanou dodáním elektronů na přeměnu *o*-anisidinu) opět příliš výrazná, přestože rychlost této autooxidace je ve srovnání s mikrosomálním systémem asi pětikrát nižší. Bohužel po přidavku *o*-anisidinu a později i NOHA nebylo zaznamenáno žádné zrychlení spotřeby NADPH. (obr. 17, 0-25 minut). Výsledek byl analogický i v případě rekonstituovaného systému cytochromu P450 1A2. V rámci experimentu byl do směsi rekonstituovaného systému cytochromu P450 1A1 přidán také Sudan I, u kterého je známo, že je velmi účinně metabolizován právě touto izoformou cytochromu P450²⁶. S tímto substrátem byl pozorován rychlejší pokles absorbance NADPH, než tomu bylo u *o*-anisidinu. Bylo tedy ověřeno, že rekonstituovaný systém je zcela funkční, a že tato metoda je vhodná pro sledování přeměny substrátu cytochromy P450.

Z výsledků vyplývá, že použité cytochromy P450 1A1 a 1A2 nejsou při přeměně *o*-anisidinu natolik efektivní, jak by tomu mohlo být například u cytochromu P450 2E1. Ten je, dle studie realizované v naší laboratoři^{61,62,65}, pokládán v tomto smyslu za nejúčinnější. Protože purifikovaný cytochrom P450 2E1, vhodný pro rekonstituční experiment, nebyl v naší laboratoři k dispozici, nebylo možné s touto izoformou pokus uskutečnit.



Obr. 17 Pokles absorbance NADPH ($150 \mu\text{M}$) v přítomnosti cytochromu P450 1A1 rekonstituovaného s NADPH:P450 reduktasou ($0,1 \mu\text{M}$). První část křivky demonstruje samovolný úbytek absorbance NADPH, tedy bez přítomnosti substrátu. Data znázorněná ve středu křivky byla naměřena po přidavku *o*-anisidinu ($100 \mu\text{M}$ celková konc. ve směsi) a ve třetí části po přidavku NOHA ($100 \mu\text{M}$ celková konc. ve směsi).

4.3 Kolorimetrické stanovení N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu

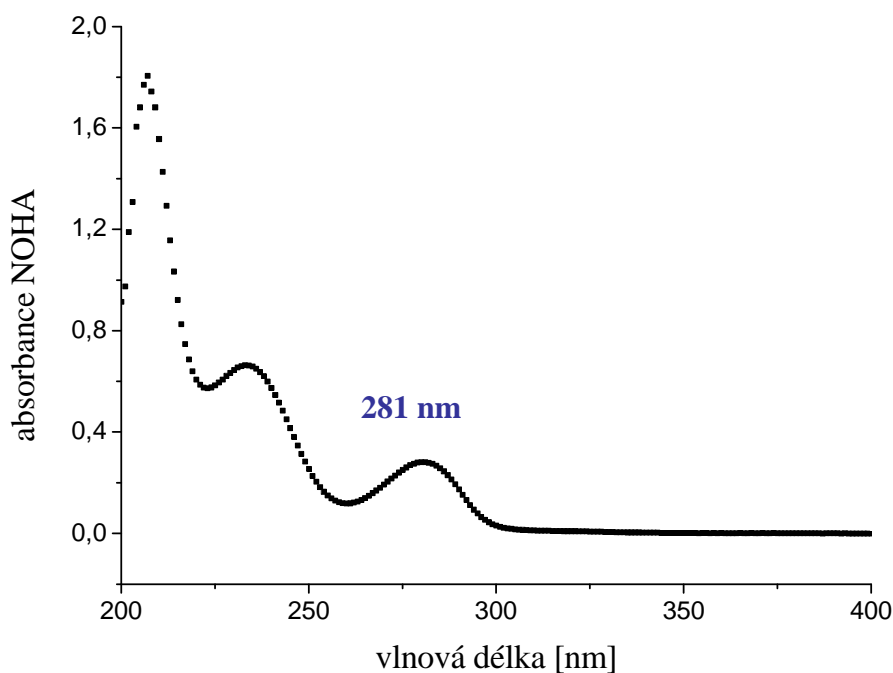
Jak již bylo popsáno dříve, oxidací *o*-anisidinu systémy obsahující cytochromy P450, kromě jiných metabolitů, vzniká také NOHA^{61,62,65}. Tato sloučenina hraje významnou roli v karcinogenním působení *o*-anisidinu⁶¹. Jedná se o nažloutlou krystalickou látku, která působením světla rychle hnědne. Při práci je zapotřebí připravovat jeho roztok vždy čerstvý a uchovávat jej po dobu experimentů v chladu a temnu. Z důvodů nestability NOHA bylo záměrem této práce vyvinout a evaluovat rychlou metodu jeho stanovení. Hlavní snahou bylo předejít problémům doprovázející kvantifikaci NOHA metodou HPLC^{61,62,65}. Navržena byla kolorimetrická metoda se spektrofotometrickou detekcí.

Jedná se o původní metodu navrženou Kadlubarem a kol.⁷⁰, která je obecně použitelná pro stanovení různých N-hydroxylderivátů na základě jejich oxido-redukčních vlastností. NOHA je schopen redukovat Fe^{3+} ionty na Fe^{2+} . Dále se využívá komplexotvorného charakteru 4,7-difenyl-1,10-fenanthrolinu (DPF), který reaguje s dvojmocnými kovy za

vzniku barevného komplexu a často se využívá k provádění kvantitativní analýzy kovů v roztoku. DPF tedy selektivně chelatuje železnaté ionty a vytvoří s nimi barevný komplex s absorpčním maximem při 535 nm. Množství vzniklého barevného komplexu je úměrné množství NOHA v analyzovaném vzorku.

Nejprve bylo potřeba uvedenou kolometrickou metodu stanovení NOHA evaluovat.

V rámci evaluace metody byly následující experimenty zaměřeny na stanovení chyby, ke které dochází v důsledku extrakce inkubační směsi do amylacetátu. Do jaké míry je samotná extrakce účinná bylo ověřeno použitím čistého standardu NOHA, u něhož bylo spektrofotometricky měřeno spektrum ve vodné fázi před (*obr. 18*) a po extrakci. Hodnota absorbance NOHA při 281 nm v roztoku před extrakcí byla 0,251, zatímco ve stejném roztoku po extrakci jen 0,004. Z naměřených hodnot byla účinnost extrakce stanovena na 98 %.



Obr. 18 Spektrum NOHA (150 μ M roztok ve fosfátovém pufru) ve vodné fázi před extrakcí..

Na chybu kvantifikace NOHA můžou mít, kromě vlastní účinnosti extrakce, vliv také další aspekty související s extrakčním procesem. Proto jsou v *tabulce 3* popsány hodnoty koncentrací NOHA získané jeho reakcí s činidlem „bathosolution I“ (viz *metody, kapitola 3.3.4.1*) s postupem bez extrakce a posléze s extrakcí (z roztoku pufru do amylacetátu).

Výchozí koncentrace NOHA byla 50 μM . V důsledku extrakce a rozkladu před vlastní analýzou dochází během stanovení NOHA k 4,2 % systematickým ztrátám.

Tab. 3 Koncentrace NOHA po jeho reakci s činidlem „bathosolution I“ stanovené postupem s extrakcí a bez extrakce (50 μM NOHA z roztoku fosfátového pufru do amyloacetátu).

Koncentrace NOHA (stanovení bez extrakce) [μM]	Koncentrace NOHA (stanovení s extrakcí) [μM]
47,8	45,7

Publikovaný extinkční koeficient pro komplex DPF s železnatými ionty je $\epsilon_{535} = 39200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ^[70]. Tento koeficient byl ověřen za pomoci standardu NOHA (50 μM koncentrace NOHA odpovídala absorbanci 0,613 a 25 μM NOHA absorbanci 0,283). Koncentrace NOHA naměřené a presentované v této práci tak byly vypočteny z Lambert–Beerova zákona za použití zdánlivého extinkčního koeficientu, jehož hodnota byla stanovena ze třech měření jako $\epsilon_{535} \text{ zdánlivý} = 36200 \pm 941 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ postupem popsáním v kapitole 3.3.4.1, a jehož hodnota již v sobě zahrnuje kompenzaci chyby způsobenou extrakcí NOHA (důležité je zmínit, že v tomto smyslu je za zdánlivý extinkční koeficient považován parametr, který vypovídá o závislosti naměřené absorbance na množství NOHA, které za daných podmínek způsobí redukci železitých iontů v roztoku a nepřímo tak podmíní vznik barevného komplexu. Nejedná se tedy o molární extinkční koeficient v pravém slova smyslu, i když je tak pro zjednodušení nazýván).

Protože jsou výsledky (krom extrakce) ovlivněny také přítomností jiných látek nacházejících se ve směsi (a které jsou případně schopné redukovat ionty železité na železnaté, nebo mohou interferovat během reakce železnatých iontů s DPF) spolu se stanovovaným NOHA, bylo snahou této studie stanovit jejich rušivý vliv. K falešně pozitivnímu výsledku by tak mohly přispívat složky mikrosomální frakce, NADPH a zejména samotný, nezreagovaný *o*-anisidin. Proto byla inkubace *o*-anisidinu uskutečněna v přítomnosti mikrosomů, které byly inaktivovány při 100 °C. K tvorbě NOHA tak bez působení cytochromů P450, které jsou součástí mikrosomální frakce, nedošlo. Naměřené hodnoty, které udávají falešně pozitivní koncentrace NOHA, jsou uvedené v tabulce 4.

Musíme tedy počítat, a v následujících výsledcích je to již zahrnuto, že přítomnost rušivých látek v analyzované směsi způsobí falešně pozitivní signál odpovídající přibližně 1 μM NOHA.

Tab. 4 Naměřené hodnoty falešně pozitivních koncentrací NOHA za použití povražených mikrosomů bez enzymatické aktivity. Inkubační směs obsahovala v 1 ml fosfátového pufru 100 μM *o*-anisidin, 150 μM NADPH, 1,5 μM povražené králičí fenobarbitalové mikrosomy.

Použité mikrosomy	Falešně pozitivní signál způsobený vlivem interferujících složek [μM]
fenobarbital (králík)	1,3
etanol (potkan)	1,07
β -naftoflavon (potkan)	1,16

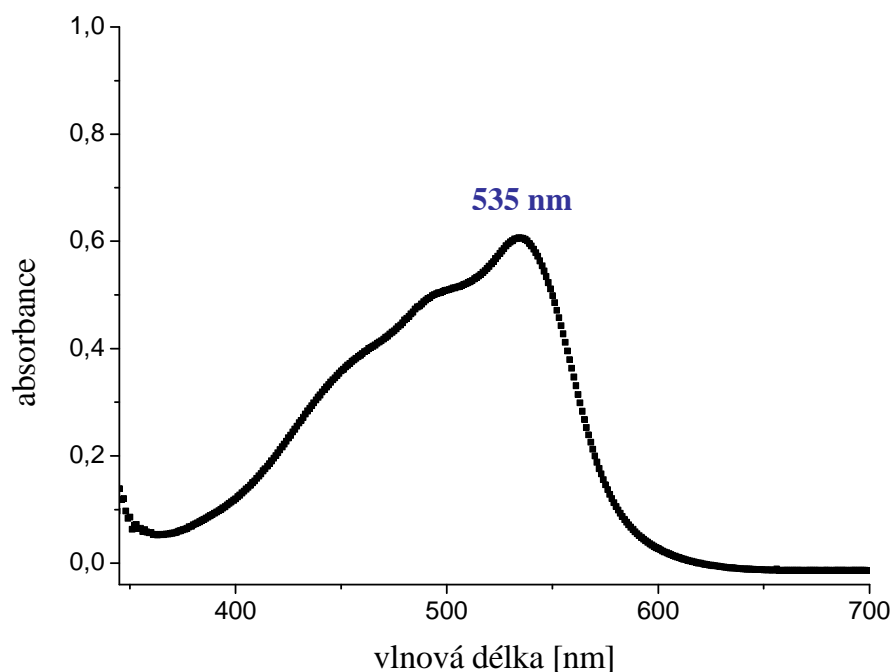
S takto plně evaluovanou metodou bylo následně stanoveno množství NOHA tvořeného z *o*-anisidinu za použití třech mikrosomálních systémů (mikrosomy izolované z potkana indukovaného etanolem, z králíka indukovaného fenobarbitalem a z potkana indukovaného β -naftoflavonem). Charakterizaci použitých enzymových preparátů přehledně shrnuje *tabulka 1*. *Tabulka 5* udává množství naměřeného NOHA tvořeného z *o*-anisidinu při oxidaci výše uvedenými mikrosomálními systémy.

Z výsledků uvedených v *tabulce 5* je patrné, že nejefektivněji docházelo k tvorbě NOHA při oxidaci *o*-anisidinu králičími mikrosomy indukovanými fenobarbitalem. O něco méně byl NOHA tvořen potkaními mikrosomy. Z těch ho ve větší míře produkují mikrosomy izolované ze zvířat exponovaných β -naftoflavonem a v menší míře exponovaných etanolem. Proto byly králičí mikrosomy indukované fenobarbitalem použity pro všechny další experimenty.

Tab. 5 Stanovené množství NOHA tvořeného během inkubace *o*-anisidinu s třemi různě indukovanými mikrosomálními systémy. Inkubační směs obsahovala v 1 ml fosfátového pufru 100 μM *o*-anisidin, 150 μM NADPH, 1-2 μM různě indukované mikrosomy.

Použité mikrosomy	Koncentrace vzniklého NOHA [μM]
fenobarbital (králík)	5,79
etanol (potkan)	2,38
β -naftoflavon (potkan)	4,29

Obrázek 19 demonstruje typické spektrum DPF v komplexu s Fe^{2+} ionty, které vznikly redukcí Fe^{3+} iontů působením NOHA.



Obr. 19 Spektrum DPF v komplexu s Fe^{2+} ionty, které vznikly redukcí Fe^{3+} iontů NOHA (použitého jako pozitivní kontrola). Koncentrace roztoku NOHA v amylacetátu byla 50 μM .

4.4 Optimalizace kolorimetrického stanovení NOHA

Protože jedním z cílů této práce bylo využití kolorimetrické metody pro stanovení kinetických konstant tvorby NOHA, bylo potřebné zajistit dostatečnou reprodukovatelnost výsledků. Vzhledem k tomu, že část kinetického měření se provádí s poměrně nízkou koncentrací substrátu a vzniká tak i výrazně méně produktu (NOHA), bylo neméně důležité také zvýšení citlivosti a tudíž i meze detekce.

Roztok „bathosolution I“ (v přítomnosti Fe^{3+} , viz. *metody, kapitola 3.3.4*) je nestabilní a s přibývajícím časem mění své zabarvení. Je tedy potřeba připravovat jej vždy čerstvý, těsně před provedením experimentu. V důsledku toho bylo nutné pro každý měřený vzorek připravovat nový „blank“.

V *tabulce 6* jsou uvedeny změny provedené ve složení roztoku „bathosolution I“ oproti původnímu návodu⁷⁰.

Tab. 6 Modifikace ve složení roztoku „bathosolution“ (uvedená množství jsou vztažena na objem 940 μl „bathosolution I a II“).

	Dle původní metody ⁷⁰ „bathosolution I“	Dle modifikované metody „bathosolution II“
Množství bathofenanthrolinu (DPF) [mg/ml]	5	0,5
Množství CH_3COOH (60 mM) a CH_3COONa (40 mM) [μl]	100	20
Množství Fe^{3+} (0,1 M) [μl]	40	4

Snížením množství DPF a Fe^{3+} („bathosolution II“) byl vliv stárnutí činidla omezen a nebylo nadále zapotřebí, aby každý vzorek měl svůj vlastní roztok „blanku“. Mimo to je tak snížen rušivý vliv pozadí během spektrofotometrického měření. Ze stejných důvodů byl roztok „bathosolution II“ přidáván k amylnacetátovému extraktu ve sníženém objemu (*tab. 7*). Tím došlo zároveň ke zvýšení meze detekce. Upraveno tak muselo být i množství CH_3COOH a CH_3COONa ve vodném roztoku kvůli mísitelnosti obou fází roztoku

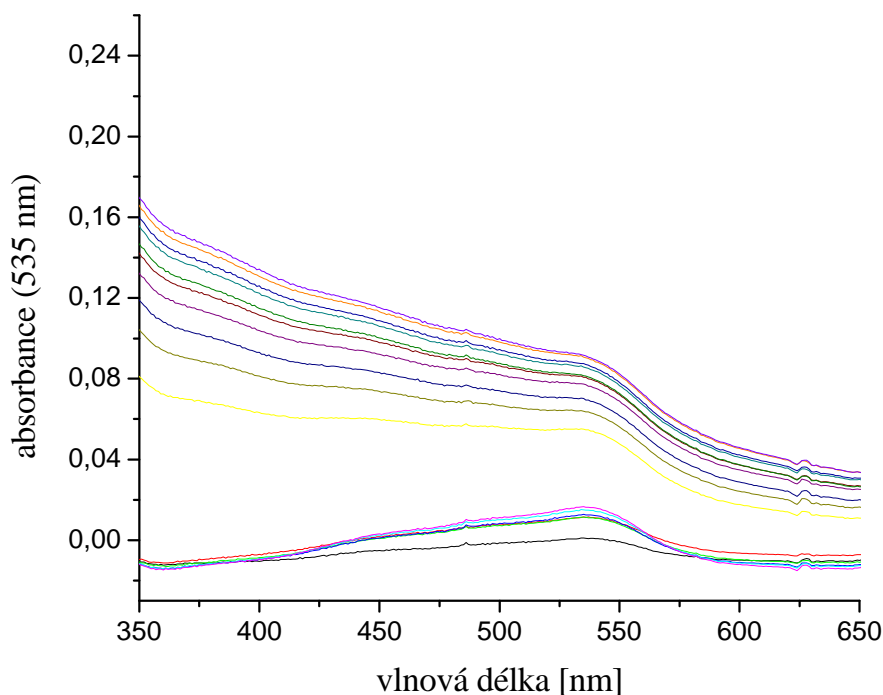
vzniklého v kyvetě po přidání amylacetátového extraktu, kterého bylo pro zvýšení citlivosti odebráno 600 μl (*tab. 7*). Byl tedy nalezen vhodný poměr mísitelnosti vodné a amylacetátové fáze.

Souhrnně je popsáno provedení modifikované a optimalizované metody pro kolorimetrické stanovení NOHA v sekci *metody kapitola 3.3.5*. Porovnání změněných částí postupu u původní a optimalizované metody demonstruje *tabulka 7*.

Tab. 7 Modifikace postupu kolorimetrického stanovení NOHA.

	Dle původní metody ⁷⁰	Dle modifikované metody
Odebrané množství amylacetátového extraktu [μl]	200	600
Množství činidla bathosolution [μl]	940	500
Množství H_3PO_4 (20 mM) [μl]	40	0

Nejdůležitější úpravou zavedenou v rámci optimalizace původní metody dle Kadlubara a kol⁷⁰, bylo vynechání přídavku kyseliny fosforečné používané k ukončení reakce. Bylo totiž zjištěno, že kyselina fosforečná nedokáže reakci dostatečně účinně zastavit. V případě stanovení, které charakterizuje *obrázek 20*, je patrné, že absorbance nadále vzrůstala z hodnoty 0,06 (těsně po přidání kyseliny) až na 0,1 během dalších 10 minut. Navíc kyselina fosforečná způsobuje v roztoku vzorku vznik zákalu, a tak výrazně zhoršuje citlivost a reprodukovatelnost stanovení (*obr. 20*). Zvolen byl tedy postup, kdy je namísto terminace barevné reakce (kyselinou fosforečnou) měřena absorbance vzorku při 535 nm během jeho inkubace s roztokem „bathosolution II“ do doby, kdy je prakticky ustavena rovnováha - tedy všechen NOHA je zoxidován Fe^{3+} a již dále nedochází k nárůstu absorbance komplexu při 535 nm.



Obr. 20 *Spektra DPF v komplexu s Fe^{2+} ionty, které vznikly redukcí Fe^{3+} iontů působením NOHA v rámci jeho kolorimetrického stanovení, během něhož byla v průběhu měření přidána kyselina fosforečná. Ta může způsobovat v roztoku vzorku zákal, což je patrné jako nárůst pozadí absorbance (počínaje žlutou křivkou). Inkubační směs obsahovala v 1 ml acylacetátu 100 μM *o*-anisidin, 150 μM NADPH, 1,5 μM králičí fenobarbitalové mikrosomy. Měření probíhalo v intervalech 45 s.*

V *tabulce 8* jsou uvedeny výsledky stanovení NOHA výše popsanou optimalizovanou metodou. Při oxidaci 100 μM *o*-anisidinem 1,5 μM králičími mikrosomy indukovanými fenobarbitalem za přítomnosti 150 μM NADPH vzniklo během 10 minut inkubace 6,89 μM NOHA. Tato hodnota je přibližně o 1,1 μM NOHA vyšší, než hodnota uvedená v *tabulce 5*, ve které jsou shrnuty údaje získané za použití původní neoptimalizované metody dle Kadlubara⁷⁰. Optimalizovaná metoda vykazuje vyšší citlivost. Při odečítání hodnot absorbancí A_{535} byla absolutní hodnota absorbance po odečtení pozadí téměř 2x vyšší. Navíc se zlepšila reprodukovatelnost a rychlost jednotlivých analýz. I v tomto případě byly uvedené hodnoty vypočtené za použití zdánlivého extinkčního koeficientu, jehož hodnota byla stanovena ze tří měření jako $\epsilon_{535} \text{ zdánlivý} = 18600 \pm 751 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ postupem popsaným v kapitole 3.3.5.1 za použití NOHA jako standardu.

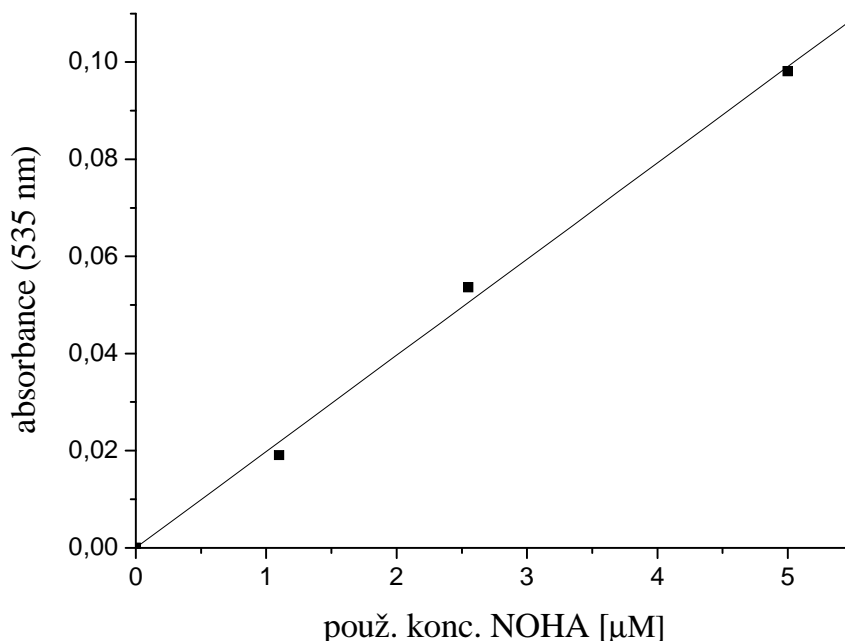
Pakliže bychom zanedbaly zpětnou redukci NOHA na *o*-anisidin v redoxním cyklu, bylo by možné konstatovat, že během 10 minut inkubace dojde k N-hydroxylaci u přibližně 7 % molekul *o*-anisidinu přítomných v inkubační směsi.

Tab. 8 *Množství NOHA tvořeného během inkubace o-anisidinu králičími fenobarbitalovými mikrosomy stanovené optimalizovanou kolorimetrickou metodou. Inkubační směs obsahovala v 1 ml fosfátového pufru 100 μM o-anisidin, 150 μM NADPH, 1,5 μM mikrosomy.*

Použité mikrosomy	Koncentrace stanoveného NOHA [μM]
fenobarbital (králík)	6,89

4.4.1 Ověření lineární odezvy optimalizované kolorimetrické metody pro stanovení N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu

Ověření lineární odezvy optimalizované kolorimetrické metody bylo uskutečněno s pomocí standardu NOHA. Použity byly jeho přesné koncentrace v rozsahu 1 až 5 μM. Zjistilo se, že pro všechny koncentrace v daném rozmezí je odezva lineární. Korelační koeficient této závislosti je 0,999 (*obr. 21*). Z výsledků vyplývá, že metodu lze nadále použít pro kvantifikaci NOHA v dalších studiích.



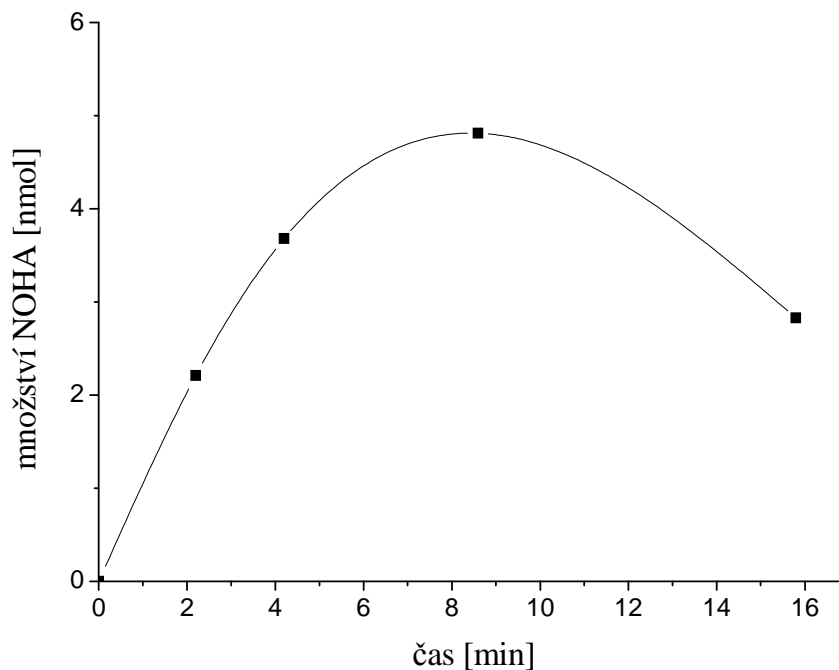
Obr. 21 Lineární odezva optimalizované kolorimetrické metody za použití 1; 2,5 a 5 μM NOHA jako standardu.

4.5 Kinetická studie tvorby N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu jako produktu oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450

4.5.1 Časová závislost tvorby N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu

Množství vzniklého NOHA v průběhu oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450 bylo stanoveno ve 2; 4; 8 a 16 minutě inkubace *o*-anisidinu s králíčími fenobarbitalovými mikrosomy.

Z obrázku 22 je patrné, že ke vzniku nejvyššího množství NOHA (4,8 μM v 8. minutě) dochází okolo desáté minuty inkubace *o*-anisidinu s cytochromy P450. Protože se jedná o meziprodukt (který se dále oxiduje na nitroso sloučeninu a jiné metabolity *o*-anisidinu)^{62,65}, došlo okolo 16. minuty k poklesu jeho koncentrace. Z grafu dále vyplývá, že první dva body tvoří lineární úsek. Vznik NOHA je v prvních čtyřech minutách inkubace lineární a rychlost enzymové reakce je zároveň i rychlostí počáteční. Následující kinetické experimenty byly tedy uskutečněny vždy do čtvrté minuty inkubace.



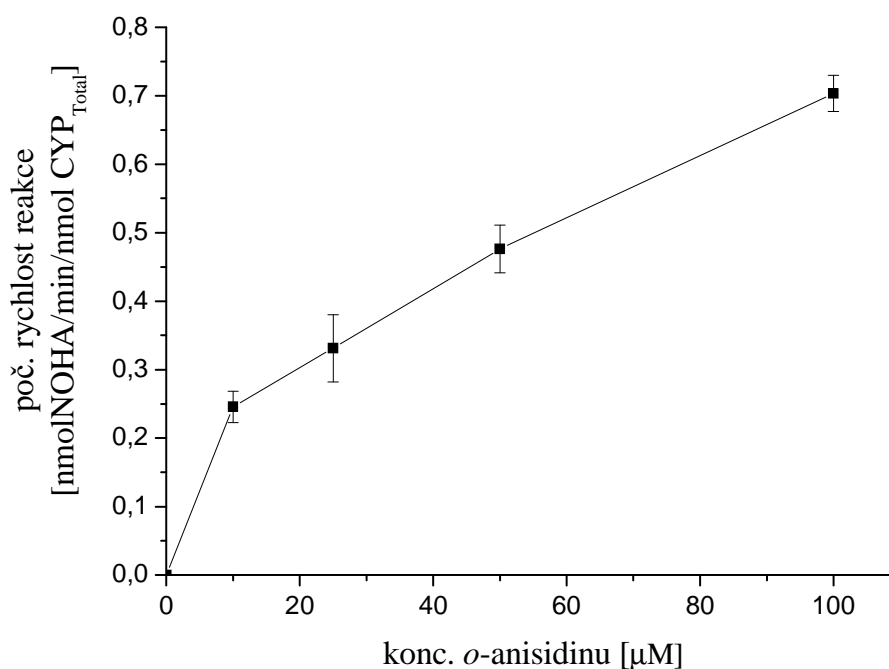
Obr. 22 Časová závislost tvorby NOHA v průběhu oxidace *o*-anisidinu fenobarbitalovými králičími mikrosomy. Inkubační směs obsahovala v 1 ml fosfátového pufru 100 μM *o*-anisidin, 150 μM NADPH, 1,5 μM mikrosomy.

4.5.2 Stanovení kinetických parametrů tvorby N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu jako produktu oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450

Jedním z hlavních cílů práce bylo pomocí evaluované a optimalizované kolorimetrické metody (*kapitola 4.4*) stanovit kinetické konstanty pro proces N-hydroxylace *o*-anisidinu systémem obsahujícím cytochrom P450. Zdánlivou Michaelisovu konstantu K_m a limitní rychlost V_{\max} je možné stanovit ze závislosti počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu *o*-anisidinu v případě nadbytku kosubstrátu NADPH. Protože Michaelisova konstanta udává koncentraci substrátu, při které je obsazena polovina aktivních center enzymu, má pro hodnocení metabolismu *o*-anisidinu jako karcinogenu nemalý význam.

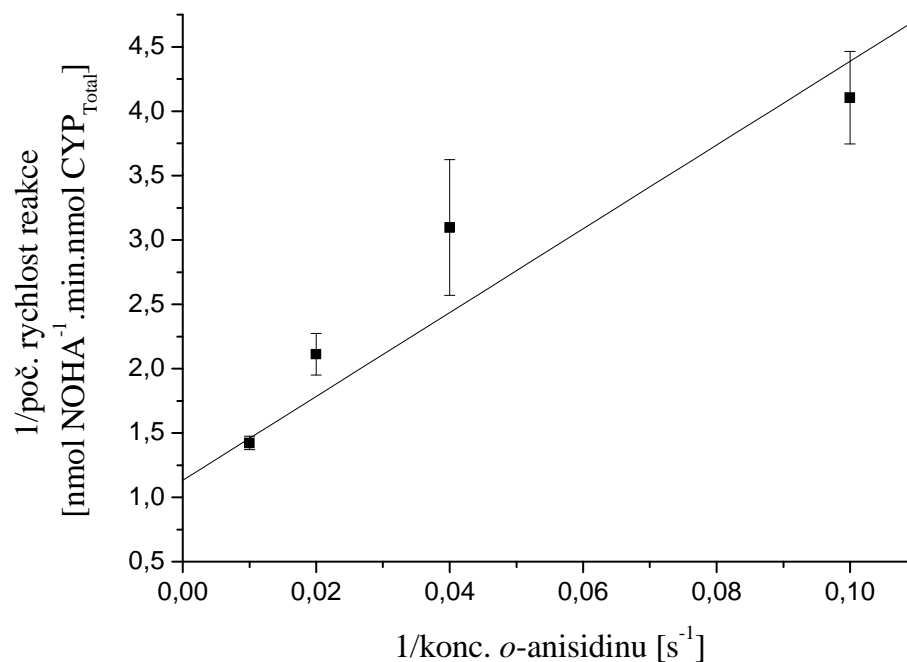
Pro stanovení zdánlivé K_m a V_{\max} byly zvoleny čtyři koncentrace *o*-anisidinu: 10; 25; 50; 100 μM . Tvorba NOHA byla stanovována ve druhé minutě inkubace substrátu v přítomnosti 1,5 μM králičích fenobarbitalových mikrosomů a 150 μM NADPH.

Obrázek 23 představuje získanou závislost počáteční rychlosti tvorby NOHA na koncentraci *o*-anisidinu jako substrátu cytochromu P450.



Obr. 23 Vliv koncentrace *o*-anisidinu (1; 25; 50 a 100 μM) na počáteční rychlost tvorby NOHA. *o*-Anisidin byl v prostředí fosfátového pufru inkubován 2 minuty v přítomnosti 1,5 μM králičích fenobarbitalových mikrosomů a 150 μM NADPH.

Kinetické parametry zdánlivá K_m a V_{max} byly odečteny z grafu dle Lineweavera a Burka, který je znázorněn na obrázku 24. Jedná se o dvojité reciproké vynesení závislosti počáteční rychlosti tvorby NOHA na počáteční koncentraci *o*-anisidinu dle obrázku 23. Získané konstanty jsou uvedeny v tabulce 9. Standardní směrodatné odchylky byly odvozeny z odchylek posunu a směrnice přímky získané lineární regresí.



Obr. 24 Reciproké vynesení závislosti počáteční rychlosti tvorby NOHA na koncentraci *o*-anisidinu dle Lineweavera a Burka. *o*-Anisidin byl v prostředí fosfátového pufru inkubován 2 minuty v přítomnosti 1,5 μM králičích fenobarbitalových mikrosomů a 150 μM NADPH.

Tab. 9 Stanovené hodnoty kinetických parametrů zdánlivé K_m a V_{max} tvorby NOHA jako produktu oxidace *o*-anisidinu králičími fenobarbitalovými mikrosomy. Konstanty byly odečteny z grafu dle Lineweavera a Burka.

K_m [μM]	V_{max} [nmol NOHA/min/nmol CYP _{Total}]
29 ± 5	$0,88 \pm 0,06$

4.5.3 Stanovení kinetických parametrů úbytku N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu při jeho následné oxidaci cytochromy P450

Další snahou předkládané práce bylo stanovit kinetické parametry pro úbytek NOHA při jeho následné oxidaci cytochromy P450 a porovnat je s hodnotami zdánlivé K_m a V_{max} pro tvorbu tohoto inetrmediátu jako produktu oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450 (*kapitola 4.5.2*). Pro experiment byla zvolena 50 μM koncentrace NOHA a 1,5 μM koncentrace králičích fenobarbitalových mikrosomů (*kapitola 4.1, tab. 1*). Časová závislost úbytku NOHA za přítomnosti zmíněného mikrosomálního systému ukázala, že v 2.; 4. a 8. minutě inkubace nedošlo k téměř žádnému úbytku této látky. Delší časové intervaly nebyly použity v obavě o zkreslení výsledků v důsledku nestability NOHA. Nicméně, tento pilotní experiment naznačuje, že NOHA je velmi špatným substrátem cytochromů P450. Zmíněné kinetické konstanty jsou však nadále předmětem dalšího studia.

5 DISKUSE

V rámci této diplomové práce byla řešena problematika metabolismu karcinogenního *o*-anisidinu, jakožto substrátu systému oxidas (oxygenas) se smíšenou funkcí - cytochromů P450. Zájem byl soustředěn na sloučeninu N-(2-metoxyfenyl)hydroxylamin (NOHA), která vzniká jako primární metabolit *o*-anisidinu za přítomnosti uvedeného enzymového systému⁶¹, a která v důsledku zapříčiňuje karcinogenní působení této látky. Předpokládá se, že NOHA se dále konjuguje enzymy N,O-acetyltransferasou nebo sulfottransferasou. Vzniklé konjugáty mohou být hydrolyzovány za tvorby nitreniového iontu^{63,64}. Podmínky pro tento rozpad jsou obzvláště vhodné v močovém měchýři, kde může být nižší pH než v okolních tkáních. Tato skutečnost zároveň napovídá vysvětlení, proč *o*-anisidin efektivně poškozuje močový měchýř a ne například játra, kde dochází k jeho aktivaci.

Osud NOHA je stále předmětem studií, ve snaze objasnit oxidační průběh reakcí probíhajících na amino skupině *o*-anisidinu. Protože je NOHA značně nestabilní, jsou experimenty problematické a těžce uskutečnitelné. Jedním z vysvětlení této nestability by mohl být redoxní cyklus probíhající na amino skupině *o*-anisidinu, jehož studium bylo zčásti předmětem této práce.

N-hydroxylace *o*-anisidinu, při které vzniká NOHA, a která je uskutečněna cytochromy P450, je typickou biotransformační reakcí aromatických aminů^{61,67}. Totéž platí pro zmíněný redoxní cyklus, který byl již ověřen u heterocyklických aromatických aminů a dalších sloučenin podobného typu⁴⁹. Je tedy velice pravděpodobné, že k oxido-redukčním reakcím dochází také v případě *o*-anisidinu^{62,65}. Ovšem jak již bylo zmíněno, experimenty metodou HPLC byly doprovázeny kvantifikačními problémy^{62,65} a není tedy zřejmé, v jakém rozsahu k redoxním reakcím dochází. Záměrem této práce bylo využití alternativní metody studie redoxního cyklu, než tomu bylo doposud, ve snaze předejít zmíněným problémům.

Jedním z uskutečněných experimentů bylo spektrofotometrické sledování časové závislosti spotřeby NADPH během inkubace *o*-anisidinu za přítomnosti různě indukovaných mikrosomálních systémů spektrofotometrickou metodou. V případě oxido-redukce amino skupiny by měla tato závislost vykazovat sigmoidální průběh, jako tomu bylo u již zmíněných heterocyklických aromatických aminů⁴⁹. A to z toho důvodu, že NADPH je spotřebováván na oxidaci substrátu (kdy dodává elektrony cytochromu P450) a navíc je ještě využíván během redukce vznikajících oxidačních produktů zpět na původní

substrát. V případě *o*-anisidinu byla pozorována tato závislost spíše jako lineární a nikoli sigmoidální. Nicméně i přesto nelze průběh redoxního cyklu zcela vyloučit. Je však pravděpodobné, že mu lze přisoudit v metabolismu *o*-anisidinu pouze minoritní podíl. Je také možné, že heterocyklické aromatické aminy jsou díky své struktuře (větší polycyklické molekuly) lepšími substráty než je tomu u *o*-anisidinu a že v důsledku toho nebyla zvýšená spotřeba NADPH natolik markantní, aby mohla být touto metodou pozorována.

Další snahou v rámci studie redoxního cyklu bylo stanovit poměr mezi spotřebou NADPH a *o*-anisidinu. Mohlo by tak být zjištěno, kolik molekul NADPH připadá na přeměnu jedné molekuly *o*-anisidinu a zda k redoxnímu cyklu dochází či nikoli, případně určit v jakém rozsahu se tak děje. Takovéto stanovení ovšem znemožnila samovolná oxidace NADPH. Proto byl experiment uskutečněn se systémem cytochromu P450 1A1 a 1A2 rekonstituovaným s NADPH:P450 reduktasou, při kterém došlo k asi pěti násobnému zpomalení spontánní oxidace NADPH. Bohužel i za těchto okolností probíhala autooxidace NADPH v takové míře, že se poměr spotřeby NADPH ku *o*-anisidinu nepodařilo stanovit. Za zmínku stojí, že efektivita cytochromu P450 1A1 byla zkontrolována jeho markerovým substrátem Sudanem I, u něhož byl (po přidání tohoto substrátu) pozorován výraznější úbytek absorbance NADPH, než tomu bylo u enzymatického systému NADPH s cytochromy P450 bez přítomnosti substrátu. Je tedy pravděpodobné, že za použití čistého cytochromu P450 2E1 (u kterého je známa nejefektivnější oxidace *o*-anisidinu z izoforem CYP^{61,62,65}) by bylo dosaženo podobných výsledků jako v případě Sudanu I a CYP 1A1, a žádaný poměr by tak bylo možné stanovit. Nicméně čistý cytochrom P450 2E1 nebyl v době vypracování této práce v laboratoři k dispozici. Zajímavé by rovněž bylo uskutečnit tento experiment pro N-(2-metoxyfenyl)hydroxylamin a ověřit, kolik molekul NADPH se spotřebuje na přeměnu 1 molekuly také u tohoto reaktivní metabolitu.

Druhá část diplomové práce byla věnována kvantitativnímu stanovení NOHA vznikajícího jako produkt oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450 kolorimetrickou metodou se spektrofotometrickou detekcí. Ke vzniku barevného komplexu dochází redukčním působením N-hydroxylderivátů na železité ionty přítomné v roztoku, které poté tvoří barevný komplex s bathofenanthrolinem. Tento postup se zdá být výhodný oproti používané metodě HPLC^{61,62,65}. Hlavním důvodem je rychlost s jakou se vznikající NOHA stanoví. Při HPLC stanovení trvá jedna analýza řádově desítky minut, zatímco

spektroskopické stanovení je hotové během několika minut. Dále je možné provádět paralelně několik desítek měření, což při HPLC metodě není možné. Tímto přístupem se tedy lze vyhnout arteficiálním výsledkům způsobeným dlouhým skladováním (byť hluboce zmražených) vzorků před vlastní analýzou. Optimalizací této metody se navíc zlepšila reprodukovatelnost a rychlost jednotlivých analýz a postup tak mohl být využit nejen pro následující kinetické experimenty.

Z testovaných mikrosomálních systému se jako nejefektivnější v produkci NOHA ukázal systém fenobarbitalových králičích mikrosomů. Na druhém místě tvoří NOHA β -naftoflavonové potkaní mikrosomy a nejhůřší v tomto srovnání se ukázaly být etanolové potkaní mikrosomy. Přestože lze předpokládat, že působením induktorů v modelovém organismu dojde ke zvýšení množství některých indukovaných izoform cytochromu P450 (např. fenobarbital – CYP 2B, β -naftoflavon – CYP 1A1/2, etanol – CYP 2E1), nedochází k potlačení všech ostatních přítomných cytochromů P450. Systém mikrosomů tedy musíme vnímat jako směs většiny izoform CYP, které se v daném organismu nacházejí. To je také pravděpodobným vysvětlením, proč se etanolové potkaní mikrosomy neukázaly jako právě efektivní v tvorbě NOHA a to přesto, že je z předchozích HPLC studií zjištěno, že izolované CYP 2E1 oxidují *o*-anisidin velmi efektivně^{61,62,65}. Je zajímavé srovnat, že fenobarbitalové králičí mikrosomy byly shledány nejefektivnějšími v oxidaci *o*-anisidinu i metodou HPLC⁶² a navíc nejefektivněji oxidovaly i *o*-nitroanisol⁵⁴.

Protože se optimalizovaná metoda pro stanovení N-hydroxylderivatů osvědčila jako citlivá a reprodukovatelná, bylo dalším záměrem práce popsat kinetiku vzniku NOHA při oxidaci *o*-anisidinu cytochromy P450. Jako modelový enzymový systém byly použity mikrosomy získané z králíka premedikovaného fenobarbitalem, které oxidovaly *o*-anisidin na NOHA nejefektivněji ze všech studovaných mikrosomů (viz výše). Byla tak získána časová závislost tvorby NOHA, z níž je patrné, že koncentrace této látky kulminuje okolo desáté minuty inkubace. Od desáté minuty již byl zaznamenán úbytek NOHA. Takovýto průběh vzniku NOHA naznačuje, že se může jednat o meziprodukt, který je ihned odčerpáván pro další reakce. Postupný úbytek NOHA v čase po dosažení jeho maxima v 10. minutě může ale také nahrávat faktu, že se jedná o sebevražedný substrát, který po vytvoření v aktivním centru cytochromu P450 tento enzym inhibuje a vyřadí z činnosti. Nemůže být vyloučena ani možnost, že je NOHA v delším časovém horizontu neenzymaticky degradován na jiné produkty. Ve zmíněné desáté minutě inkubace *o*-

anisidinu s mikrosomálním fenobarbitalovým systémem, kdy pozorujeme tvorbu maxima NOHA, dochází k N-hydroxylaci u přibližně 7 % molekul *o*-anisidinu.

Zásadní pro tuto práci bylo pomocí optimalizované kolorimetrické metody stanovit kinetické parametry, tj. zdánlivou K_m a V_{max} pro N-hydroxylační reakci *o*-anisidinu a porovnat jejich hodnoty s jinými obdobnými reakcemi. Zdánlivá Michaelisova konstanta tvorby NOHA, jako produktu oxidace *o*-anisidinu fenobarbitalovými králičími mikrosomy, byla stanovena na hodnotu $29 \pm 5 \mu\text{M}$. To je hodnota poměrně nízká, vyskytující se převážně u středně dobrých substrátů cytochromů P450. Tuto hodnotu můžeme například porovnat se zdánlivou Michaelisovou konstantou pro jiný substrát. Hodnota K_m pro oxidaci *o*-nitroanisolu stejným mikrosomálním systémem (tedy fenobarbitalovými králičími mikrosomy) byla stanovena jako $560 \mu\text{M}$ ⁵⁴. Zdá se tedy, že *o*-anisidin je řádově lepším substrátem cytochromů P450 ve srovnání se svým prekursorem, *o*-nitroanisoem. Další srovnání můžeme provést s hodnotou K_m naměřenou pro oxidaci *o*-anisidinu jiným enzymovým systémem a to laktoperoxidasou. V tomto případě je hodnota K_m $870 \mu\text{M}$ ⁶⁰. Z výsledků srovnání je tedy patrné, že *o*-anisidin je pro cytochromy P450 poměrně dobrým substrátem. Naopak V_{max} tvorby NOHA byla námi stanovena jako $0,88 \pm 0,06 \text{ nmolNOHA/min/nmol CYP}$, což vypovídá o velmi pomalé N-hydroxylaci *o*-anisidinu cytochromy P450 (opět porovnáno například s V_{max} pro oxidaci *o*-anisidinu peroxidasami, která je cca 3000 x rychlejší - $2,8 \mu\text{mol oxidovaného } o\text{-anisidinu/min/nmol laktoperoxidasy}$ ⁶⁰. Nicméně o cytochomech P450 je známo, že rychlost jejich přeměny je extrémně nízká a naopak peroxidasy jsou velice rychlé. V_{max} pro oxidaci jiného substrátu cytochromů P450, již výše zmiňovaného *o*-nitroanisolu, je $13,5 \text{ nmol oxidovaného } o\text{-nitroanisolu/min/nmol celkového cytochromu P450}$ ⁵⁴. Číslo přeměny je tedy, jako v našem případě, o řád vyšší.

Snahou bylo také určit zdánlivou K_m a V_{max} pro úbytek NOHA při jeho následné oxidaci cytochromy P450 a porovnat kinetické parametry jeho vzniku a úbytku. Protože po téměř 10 minutách inkubace NOHA za přítomnosti králičích fenobarbitalových mikrosomů nedošlo k žádnému výraznému úbytku této látky, lze usuzovat, že by NOHA mohl být velmi špatným substrátem těchto enzymů (minimálně v porovnání s *o*-anisidinem). Nelze ovšem vyloučit, že během inkubace nedošlo přeměnou NOHA ke vzniku jiných metabolitů s redukčními schopnostmi, které by pak mohly interferovat se stanovovaným NOHA a redukovat železnaté ionty stejně účinně jako NOHA. Nicméně, tato možnost není příliš pravděpodobná, protože výše popsání metoda by měla být senzitivní pouze k N-

hydroxylačním metabolitům (např. přítomnost nitroso derivátů neinterferuje)^[71]. V neposlední řadě nesmíme opomenout možnost, že NOHA působí jako sebevražedný substrát a v použité koncentraci cytochromy P450 ihned inhiboval. Každopádně i tento prvotní experiment naznačuje neblahý fakt, že k N-hydroxilaci *o*-anisidinu cytochromy P450 dochází poměrně ochotně, ale vzniklé reaktivní metabolity v systému v řádu minut přetrvávají a pravděpodobně jsou cytochromy P450 přeměňovány na další produkty jen velmi neochotně. Takovýto mechanismus je pro působení karcinogenů velmi nebezpečný a mohl by vysvětlit proč je *o*-anisidin považován za jeden z nejsilnějších karcinogenů močového měchýře vůbec⁵⁹.

6 ZÁVĚR

Výsledky uvedené v diplomové práci odpovídají stanoveným cílům. V souhrnu jsou uvedeny pouze nejdůležitější výsledky týkající se mechanismu oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450:

- Spotřeba NADPH během oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450 měla spíše lineární charakter. Tento fakt naznačuje, že jestli vůbec k redoxnímu cyklu na amino skupině *o*-anisidinu dochází, bude jen v řádu několika procent.
- Poměr mezi množstvím spotřebovaného NADPH na molekulu *o*-anisidinu, tedy údaj, kolik molekul NADPH je třeba na oxidaci jedné molekuly *o*-anisidinu se nepodařilo zjistit. Bránila tomu poměrně rychlá spontánní oxidace NADPH, a to jak v mikrosomálním systému, tak i v přítomnosti rekonstituovaných cytochromů P450 1A1 a 1A2, která interferovala se stanovením.
- Byla vyvinuta optimalizovaná metoda pro kvantifikaci reaktivního a nestabilního metabolitu NOHA, který je tvořen primární oxidací *o*-anisidinu cytochromy P450 na aminoskupině. Jedná se o kolorimetrickou metodu založenou na redukčních vlastnostech NOHA. Toto stanovení je velmi rychlé, reprodukovatelné a dostatečně citlivé. Navrhujeme jeho širší použití i pro další N-hydroxyl aminy studované v naší laboratoři.
- Využitím výše popsané nové metody stanovení NOHA, bylo možné popsat kinetiku jeho vzniku zprostředkovanou jaterním mikrosomálním systémem králíka preindukovaného fenobarbitalem. Nejvyšší množství NOHA bylo zaznamenáno okolo desáté minuty inkubace *o*-anisidinu s cytochromy P450. Je pravděpodobné, že se jedná o meziprodukt, který se dále spotřebovává dalšími přeměnami, protože jeho množství po dosažení maxima zase klesalo.
- V okamžiku vzniku maximálního množství NOHA je N-hydroxylováno přibližně 7 % substrátu, tedy *o*-anisidinu.
- Zdánlivá Michaelisova konstanta tvorby NOHA, tedy primárního N-hydroxylačního procesu na molekule *o*-anisidinu účinkem cytochromů P450, je 29

$\pm 5 \mu\text{M}$ *o*-anisidnu, a maximální rychlost reakce $0,88 \pm 0,06$ nmol NOHA/min/nmol CYP.

- *o*-Anisidin je poměrně dobrý substrát cytochromu P450, nicméně rychlost N-hydroxylačního kroku je v porovnání s jinými enzymy (peroxidásami) poměrně nízká. Zdá se, že NOHA je daleko horším substrátem cytochromu P450 v porovnání s *o*-anisidinem, což pravděpodobně významným způsobem přispívá k nebezpečnosti tohoto reaktivního metabolitu.

Předkládaná diplomová práce přináší původní výsledky, které rozšiřují poznání biotransformace *o*-anisidinu cytochromy P450. Jako modelový byl požit jaterní potkaní a králičí mikrosomální systém. Mikrosomální systém je velmi vhodný pro první přiblížení, protože je v něm zastoupena směs většiny konkrétních cytochromů P450. Nicméně další studium by bylo vhodné směřovat na experimenty s izolovanými enzymy a to hlavně s CYP 2E1, který přeměňuje *o*-anisidin nejlépe.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Parkin. D. M., Bray F., Ferlay J., Pisani P.: *Int. J. Cancer* **94**, 153 (2001)
2. Stratil P., Kubáň V.: *Chem. Listy* **98**, 379 (2004)
3. Stiborová M., Mikšanová M.: *Živa* **4**, 146 (1999)
4. Hussain S. P., Hartus C. C.: *Cancer Res.* **58**, 4023 (1998)
5. Stiborová M., Martínek V., Rýdlová H., Hodek P., Frei E.: *Cancer Res.* **62**, 5678 (2002)
6. Klener P.: *Protinádorová chemoterapie*, Galén, Praha (1996)
7. Zuber R., Anzenbacherová E., Anzenbacher P.: *J. Cell. Mol. Med.* **6**, 2 (2002)
8. Stiborová M.: *Doktorská disertační práce* (pro DrSc), PŘF UK (Praha) a SAV (Bratislava), (2004)
9. Balíková M.: *Forenzní a klinická toxikologie*, Galén, Praha (2004)
10. Krejzlík Z., Káš J., Ruml T.: *Chem. Listy*, (2002)
11. Spatzenegger M., Jaeger W.: *Drug Metab. Rev.* **27**, 397 (1995)
12. http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_enzymology.htm staženo 27.4. 2009
13. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: *Chem. listy* **93**, 229 (1999)
14. <http://www.pharmacology2000.com/> - staženo 25. 4. 2009
15. Anzenbacher P., Dawson J.H., Kitagawa T.: *J. Mol. Struct.* **214**, 149 (1989)
16. Anzenbacher P., Hudeček J., Stiborová M., Larrouque C., Lange R., Heibel G., Hildebrandt P.: *Cytochrome P-450. Biochemistry and Biophysics*, Moscow (1992)
17. Hudeček J., Baumruk V., Anzenbacher P., Munro A. W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 811 (1998)
18. Omura T., Sato R.: *J. Biol. Chem.* **239**, 2370 (1964)
19. Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M.: *Chem. Listy* **95**, 212 (2001)
20. Coon M. J., Ding X., Pernecky S. J., Vaz A. D. N.: *FASEB J.* **6**, 669 (1992)
21. <http://modeling.unibas.googlepages.com/home242> - staženo 27.4. 2009
22. Nerbert D. W., Nelson D. R., Adesnik M., Coon M. J., Esrabrook R. W., Gonzales F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F., Kemper B., Levin W., Philips J. R., Sato R., Waterman M. R.: *DNA* **8**, 1 (1989)
23. Gonzales F. J., Gelboin H. V.: *Drug. Metab. Rev.* **26**, 165 (1994)

- Neal G.-E.: *Toxicol. Lett.* **82**, 861 (1995)
- Nelson S. D.: *Semin. Liver Dis.* **10**, 267 (1990)
24. Rendic S., DiCarlo F. J.: *Drug Metab. Rev.* **29**, 413 (1997)
25. Guengerich F. P., *Chem. Res. Toxicol.* **4**, 391 (1991)
26. Stiborová M., Martínek V., Rýdlová H., Koblas T., Hodek P.: *Cancer Lett.* **220**, 145 (2004)
27. Stiborová M., Dračínská H., Hájková J., Kadeřábková P., Frei E., Schmeiser H. H., Souček P., Phillips D. H., Arlt V. M.: *Drug metab. Dispos.* **34**, 1398 (2006)
28. <http://en.wikipedia.org/wiki/index.html?curid=14128024> – staženo 28.4. 2009
29. <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3E4E> - 28.4. 2009
30. Brian W. R., Sari M.-A., Iwasaki M., Shimada T., Gaminsky L. S., Guengerich F. P.: *Biochemistry* **29**, 11280 (1990)
31. <http://www.p450.kvl.dk/gallery/> - staženo 4.4. 2009
32. Guengerich F. P.: *Cytochrome P450 – Structure, Mechanism and Biochemistry* **2**, 473 (1995)
33. Daly A. K.: *J. Mol. Med.* **73**, 539 (1995)
34. Stephens E. A., Taylor J. A., Kaplan N., Yang C.-H., Hsieh L. L., Lucier G. W., Bell D. A.: *Pharmacogenetics* **4**, 185 (1994)
35. Anzenbacher P., Anzenbacherová E., Anzenbacher P.: *J. Cell. Moc. Med.* **6**, 2 (2002)
36. Stiborová M., Hudeček J., Páca J. JR., Martínek V., Páca J.: *Chem. Listy* **98**, 876 (2004)
37. Gut I., Souček P., Hodek P.: *Pracovní lékařství* **1**, 15 (1992)
38. Schacter B. A., Nelson E. B., Karcer H. S., Masters B. S. S.: *J. Biol. Chem.* **247**, 3601 (1972)
39. Vermilion J. L., Ballou D. P., Masery V., Coon M. J.: *J. Biol. Chem.* **256**, 266 (1981)
40. Oprian D. D., Coon M. J.: *J. Biol. Chem.* **257**, 8935 (1982)
41. Stiborová M., Hájek M., Frei E., Schmeiser H. H.: *Gen. Physiol. Biophys.* **20**, 375 (2001)
42. Stiborová M., Mikšanová M., Martínek V., Frei E.: *Collect. Czech. Chem. Commun* **65**, 297 (2000)
43. Moreland D. E., Forbin F. T., McFarland J. E.: *Pestic. Biochem. Physiol.* **45**, 43 (1993)
44. Schuller M.: *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**, 235 (1996)

45. Fu P. P.: *Drug Metab. Rev.* **22**, 209 (1990)
46. Pritsos C. A.: *Chem. Biol. Interact.* **129**, 195 (2002)
47. Segura-Aguilar J., Kaiser R., Lind C.: *Biochem. Biophys. Acta* **1120**, 33 (1992)
48. International Agency for Research in Cancer (IARC), *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* **46**, Lyon, (1989)
49. Kim D., Kadlubar F. F., Tetel C. H., Guengerich F. P.: *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 529 (2004)
50. National institute of Health: *NTP Tech. Report* **416**, Bethesda (1993)
51. Traupe H., Menge G., Kandt I., Karmaus W.: *Germany. Dermatology* **195**, 112 (1997)
52. Stiborová M., Mikšanová M., Smrček S., Bieler Ch. A., Breuer A., Klokow K. A., Schmeiser H. H., Frei E.: *Carcinogenesis* **25**, 833 (2004)
53. Mikšanová M., Novák P., Frei E., and Stiborová M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **69**, 589 (2004)
54. Mikšanová M., Šulc M., Rýdlová H., Schmeiser H.H., Frei E., Stiborová M.: *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, 663 (2004)
55. Mikšanová M.: *Disertační práce*, PřF UK, Praha (2003)
56. Kejíková L.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha (2005)
57. Garner R. C., Martin C. N., Clayson D. B.: *Chem. Carc.* **1**, 182 (1984)
58. National cancer Institute, *NTP Tech. Report* **89**, Bethesda (1978)
59. IARC, *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals and Humans* **27**, 63 (1982)
60. Stiborová M., Mikšanová M., Havlíček V., Schmeiser H.H., Frei E.: *Mutat. Res.* **500**, 49 (2002)
61. Stiborová M., Mikšanová M., Šulc M., Rýdlová H., Schneider H. H., Frei E.: *Int. J. Cancer* **116**, 667 (2005)
62. Naiman K., Dračínská H., Martínková M., Šulc M., Dračínský M., Kejíková L., Hodek P., Hudeček J., Liberda J., Schneider H. H., Frei E.: *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 1610 (2008)
63. Hein D. W., Doll M. A., Fretland A. J., Grey K., Deitz A. C., Feng Y., Jiang W., Rustan T. D., Satran S., Wilkie T. R.: *Mutat. Res.* **376**, 101 (1997)
64. Arlt V. M., Glatt H., Muckel E., Pabel U., Sorg B. L., Schmeiser H. H., Phillips D. H.: *Carcinogenesis* **23**, 1937 (2002)

65. Naiman K., Dračínská H., Dračínský M., Martínková M., Martínek V., Hodek P., Štícha M., Frei E., Stiborová M.: *Interdisc. Toxicol.* **1**, 101 (2008)
66. Stabbert R., Schafer K. H., Biefel C., Rustemeier K.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2125 (2003)
67. Falter B., Kutzer C., Richter E.: *Clin. Incest.* **72**, 364 (1994)
Branner B., Kutzer C., Zwickenpflug W., Scherer G., Keller W. D., Richter E.: *Biomarkers* **3**, 35 (1998)
68. Sottocasa G., I., Kuylenstierna B., Ernster L., Bergstrand A.: *J. Cell Biol.* **32**, 415 (1967)
Stiborová M., Frei E., Sopko B., Wiessler M., Schmeiser H. H.: *Carcinogenesis* **23**, 617 (2002)
69. Wiechelman K. J., Braun R. D., Fitzpatrick J. D.: *Anal. Biochem.* **175**, 231 (1988)
70. Kadlubar F. F., Miller J. A., Miller E. C.: *Cancer. Research.* **36**, 2350 (1976)