

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA BIOCHEMIE



**Studium metabolismu 3-aminobenzanthronu
a indukce biotransformačních enzymů**

Doktorská disertační práce

RNDr. Jana Mizerovská

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2010

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem pracovala samostatně pod vedením školitelky Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a veškerou použitou literaturu jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....
RNDr. Jana Mizerovská

PROHLÁŠENÍ SPOLUAUTORŮ

Prohlašuji, že RNDr. Jana Mizerovská, rozhodujícím způsobem (30-90%) přispěla ke vzniku všech 6 článků, které jsou přílohami této disertační práce. Sama provedla většinu experimentů a významně se podílela i na jejich plánování, na interpretaci výsledků a na sepsání publikací.

V Praze dne.....

.....

Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala především své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za výborné odborné vedení, všestrannou pomoc a laskavý přístup při vypracovávání této práce. Děkuji také RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D. za izolaci a stanovení mRNA. A celému kolektivu laboratoře za potřebné rady, pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Práce byla řešena jako součást grantových vědeckých projektů podporovaných GAČR (granty 303/09/0472 a 305/09/H008) a MŠMT ČR (granty MSM0021620808 a 1M0505).

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1 ÚVOD	11
1.1 PROCES KANCEROGENEZE	12
1.2 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK V ORGANISMU	15
1.3 MIKROSOMÁLNÍ MONOOXYGENASOVÝ SYSTÉM (MFO SYSTÉM)	17
1.3.1 NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa	18
1.3.2 Cytochrom P450.....	20
1.3.2.1 Spinové formy cytochromu P450	21
1.3.2.2 Enzymové funkce cytochromu P450	22
1.3.2.3 Názvosloví cytochromů P450	24
1.3.2.4 Variabilita v aktivitě a hladině cytochromů P450	26
1.4 PEROXIDASY.....	28
1.4.1 Klasifikace a charakterizace peroxidas	29
1.4.2 Rostlinné peroxidasy	30
1.4.2.1 Křenová peroxidasa (HRP)	30
1.4.3 Živošišné peroxidasy	31
1.4.3.1 Laktoperoxidasa.....	31
1.4.3.2 Myeloperoxidasa	31
1.5 NAD(P)H:CHINONOXIDOREDUKTASA 1, CYTOSOLÁRNÍ ENZYM KATALYZUJÍCÍ REDUKČNÍ REAKCE XENOBIOTIK	32
1.5.1 Indukce DT-diaforasy	33
1.6 AROMATICKÉ AMINY A AROMATICKÉ NITROSLOUČENINY	34
1.6.1 Aromatické aminy.....	34
1.6.1.1 Biotransformace aromatických aminů.....	35
1.6.2 Aromatické nitrosloučeny	36
1.6.3 3-Nitrobenzanthron, prekurzor 3-ABA.....	36
1.6.4 3-Aminobenzanthron	37
1.6.5 Předpokládaná metabolická aktivace 3-ABA a 3-NBA.....	37
2 CÍLE PRÁCE	40
3 MATERIÁL A METODY	42
3.1 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE	42
3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	44
3.3 PREMEDIKACE LABORATORNÍCH POTKANŮ	45
3.4 IZOLACE MIKROSOMŮ A CYTOSOLŮ Z JATERNÍ, LEDVINNÉ A PLICNÍ TKÁNĚ LABORATORNÍHO POTKANA.....	46
3.5 METODY STANOVENÍ KONCENTRACÍ A AKTIVIT VYBRANÝCH ENZYMŮ.....	46

3.5.1	Stanovení obsahu cytochromu P450.....	46
3.5.2	Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Wiechelmana ⁽¹⁸⁹⁾	47
3.5.3	Stanovení aktivity CYP1A1 oxidací Sudanu I.....	47
3.5.4	Stanovení specifických aktivit pro isoformy cytochromu P450 1A1 a 1A2.....	48
3.5.5	Stanovení aktivity NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 (NQO1)	49
3.6	ELEKTROMIGRAČNÍ METODY.....	50
3.6.1	SDS elektroforéza.....	50
3.6.2	Metoda „Western blotting“	50
3.6.3	Imunochemická detekce CYP1A1, CYP1A2 a NQO1	50
3.7	STUDIUM OXIDACE 3-ABA CYTOCHROMY P450	51
3.7.1	Studium oxidace 3-ABA mikrosomální frakcí potkanů premedikovaných vybranými typy induktorů cytochromů P450	51
3.7.2	Studium časové závislosti oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy	52
3.7.3	Studium kinetiky oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy potkana	53
3.7.4	Studium inhibice metabolismu 3-ABA specifickými inhibitory cytochromu P450	53
3.7.5	Studium metabolismu 3-ABA lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450.....	54
3.7.6	Studium kinetiky oxidace 3-ABA lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450	54
3.8	STUDIUM METABOLISMU 3-ABA PEROXIDASAMI	55
3.8.1	Studium kinetiky oxidace 3-ABA křenovou peroxidasou	55
3.9	IZOLACE A STANOVENÍ MRNA CYP1A1 A NQO1	55
3.10	DETEKCE ADUKTŮ 3-NBA A 3-ABA S DNA METODOU ³² P-POSTLABELING	56
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	57
4.1	STUDIUM METABOLISMU 3-AMINO BENZANTHRONU CYTOCHROMY P450	57
4.1.1	Oxidace 3-aminobenzanthronu mikrosomální frakcí potkanů premedikovaných vybranými typy induktorů cytochromů P450.....	59
4.1.2	Studium časové závislosti oxidace 3-aminobenzanthronu jaterními mikrosomálními systémy	60
4.1.3	Kinetika oxidace 3-aminobenzanthronu jaterními mikrosomálními systémy potkana	62
4.1.4	Inhibice metabolismu 3-aminobenzanthronu specifickými inhibitory cytochromu P450	64
4.2	METABOLISMUS 3-AMINO BENZANTHRONU LIDSKÝMI A POTKANÍMI REKOMBINANTNÍMI CYTOCHROMY P450	65
4.2.1	Studium metabolismu 3-aminobenzanthronu lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450 obsaženými v Supersomech TM	65
4.2.2	Kinetika oxidace 3-aminobenzanthronu lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450	67
4.3	METABOLISMUS 3-AMINO BENZANTHRONU PEROXIDASAMI	69
4.3.1	Kinetika oxidace 3-aminobenzanthronu křenovou peroxidasou.....	70
4.4	STUDIUM INDUKČNÍHO POTENCIÁLU 3-NITRO BENZANTHRONU A 3-AMINO BENZANTHRONU PRO EXPRESI ENZYMŮ METABOLISUJÍCÍCH XENOBIOTIKA.....	71

4.4.1	Studium vlivu 3-nitrobenzanthronu na expresi NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromu P450 1A1 v tkáních potkana po intraperitoneální aplikaci	71
4.4.1.1	Stanovení obsahu proteinu NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromu P450 1A1 v ledvinách a plicích potkana po intraperitoneální aplikaci 3-nitrobenzanthronu	72
4.4.1.2	Stanovení enzymové aktivity cytosolární NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 a mikrosomálního cytochromu P450 1A1 v ledvinách a plicích po intraperitoneální aplikaci 3-nitrobenzanthronu.....	73
4.4.1.3	Stanovení obsahu mRNA NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromu P450 1A1 v ledvině a plicní tkáni potkana po intraperitoneální aplikaci 3-nitrobenzanthronu	75
4.4.2	Studium vlivu 3-aminobenzanthronu na expresi NADPH:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromu P450 1A1 v ledvině a plicní tkáni potkana po intraperitoneální aplikaci	76
4.4.2.1	Stanovení obsahu proteinu a enzymové aktivity NADPH:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromu P450 1A1 v ledvinách a plicích potkana po intraperitoneální aplikaci 3-aminobenzanthronu.....	77
4.4.2.2	Stanovení obsahu mRNA NADPH:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromu P450 1A1 v ledvinách a plicích potkana po intraperitoneální aplikaci 3-aminobenzanthronu.....	80
4.4.3	Studium vlivu 3-nitrobenzanthronu na expresi NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromu P450 1A1 v jaterní, ledvině a plicní tkáni potkana po intratracheální instilaci	82
4.5	AKTIVACE 3-AMINO BENZANTHONU A 3-NITRO BENZANTHONU ZA TVORBY ADUKTŮ S DNA	87
4.5.1	Studium vlivu intraperitoneální aplikace 3-nitrobenzanthronu potkanům na jeho aktivaci cytosolárními a mikrosomálními frakcemi těchto zvířat.....	88
4.5.2	Studium vlivu intraperitoneální aplikace 3-nitrobenzanthronu potkanům na aktivaci 3-aminobenzanthronu mikrosomálními a cytosolárními frakcemi těchto zvířat.....	89
4.5.3	Studium vlivu intraperitoneální aplikace 3-aminobenzanthronu potkanům na aktivaci 3-nitrobenzanthronu cytosolárními a mikrosomálními frakcemi těchto zvířat	91
4.5.4	Studium vlivu intraperitoneální aplikace 3-aminobenzanthronu potkanům na jeho aktivaci cytosolárními a mikrosomálními frakcemi těchto zvířat.....	92
4.5.5	Studium vlivu intratracheální instilace 3-nitrobenzanthronu potkanům na jeho aktivaci cytosolárními a mikrosomálními frakcemi těchto experimentálních zvířat	94
4.5.6	Studium vlivu intratracheální instilace 3-nitrobenzanthronu potkanům na aktivaci 3-aminobenzanthronu mikrosomálními frakcemi těchto experimentálních zvířat.....	95
5	SOUHRN A ZÁVĚR.....	97
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	100
	SEZNAM PŘÍLOH	110

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

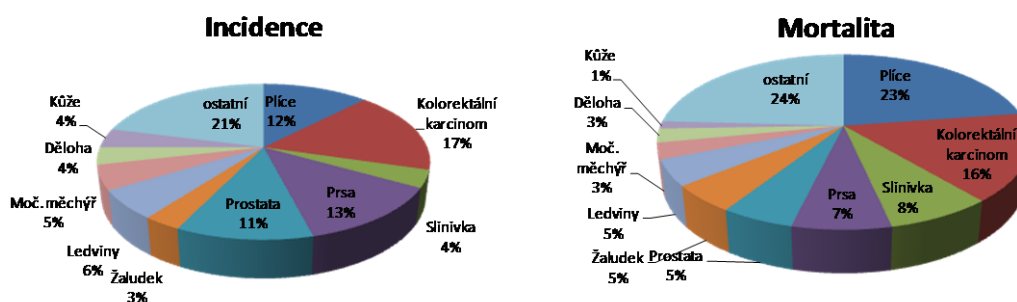
3-ABA	3-aminobenzanthron
3-NBA	3-nitrobenzanthron
A	absorbance
AA	aristolochové kyseliny
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky („aryl hydrocarbon receptor“)
Arnt	jaderný heterodimerizační partner Ah receptoru („AhR-nuclear translocator“)
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
B(a)P	benzo(a)pyren
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát /nitro blue tetrazolium
BSA	hovězí sérový albumin
CAR	„constitutive androstane receptor“
CYP	cytochrom P450
Da	dalton
DDTC	diethyldithiokarbamát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DT-diaforasa	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1
EC	číselný kód enzymu
FAD	flavinadenindinukleotid (chinoidní forma)
/FADH/FADH2	/semichinoidní radikál/hydrochinon
FMN	flavinadeninmononukleotid (chinoidní forma)
/FMNH/FMNH2	/semichinoidní radikál/hydrochinon
FMO	flavim obsahující monooxygenasa
Fuc	fukosa
GIT	gastrointestinální trakt
GlcNac	N-acetylglukosamin
GR	„glucocorticoid receptor“
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie („high-pressure liquid chromatography“)
HRP	křenová peroxidasa

IARC	mezinárodní institut pro výzkum rakoviny („International Agency for Research on Cancer“)
IgY	imunoglobulin třídy Y
i.p.	intraperitoneální aplikace
K_m	Michaelisova konstanta
LPO	laktoperoxidasa
M	mol/l
MFO	systém monooxygenas se smíšenou funkcí („mixed function oxygenases“)
MPO	myeloperoxidasa
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
N-OH-ABA	N-hydroxylamin
NAT	N-acetyltransferasa
NQO1	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
p	hladina významnosti
PAPS	2' (nebo 3')-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PAS	transkripční faktory rodiny (Per-Arnt-Sim)
PB	fenobarbital
PBS	sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl - izotonický roztok („Phosphate Buffer with Salt“)
PCN	pregnenolon 16 α -karbonitril (5-pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -karbonitril)
PPAR	„peroxisome proliferator-activated receptor“
PVDF	polyvinylidenfluorid
PXR	„pregnane X receptor“
RAL	podíl modifikovaných nukleotidů z celkového počtu nukleotidů („relative adduct labelling“)
RH	substrát
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina („messenger ribonucleic acid“)
ROH	hydroxylovaný produkt
R*OOH	organický peroxid

RPM	počet otáček za minutu
RXR	„retinoid receptor“
SDS	dodecylsulfát sodný
SULT	sulfotransferasa
SXR	„steroid xenobiotic receptor“
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TRIS	tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	uridindifosfát
UV	ultrafialové záření
VIS	oblast vlnových délek viditelného světla
v_{\max}	maximální rychlost reakce
WHO	světová zdravotnická odrganizace („World Health Organization“)
XRE	konsensus sekvence „xenobiotic responsive element“
α-NF	α -naftoflavon
β-NF	β -naftoflavon
ε	molární absorpční koeficient
λ	vlnová délka

1 ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou jedním z nejzávažnějších problémů klinické medicíny. V současné době se nádorová onemocnění stále častěji umísťují na přední místa statistik s příčinami úmrtí^(173, 190). Podle údajů Světové zdravotnické organizace (WHO) (<http://www.who.int>) z roku 2007 jsou ve většině vyspělých zemí nádorová onemocnění druhou nejčastější příčinou úmrtí (7,9 mil.), hned po kardiovaskulárních onemocněních (17.1 mil.). Dle epidemiologických dat se tento trend již objevuje i v méně rozvinutých zemích, kde se vyskytuje více než polovina všech případů rakoviny. Nejenom že jsou nádorová onemocnění stále četnější, ale postihují daleko více jedinců v nižší věkové hranici⁽¹⁷³⁾. Rakoviny plic, žaludku, jater, tlustého střeva a prsu jsou nejčastějšími onemocněními s největším počtem úmrtí. V České republice dle Státního zdravotního ústavu (SZÚ) ročně umírá na nádorová onemocnění více než 27 tisíc osob, což představuje 23 % z celkové úmrtnosti. Pro ilustraci je na obrázku 1 uveden odhadovaný přehled případů a úmrtí nádorových onemocnění pro rok 2008 na 100 000 osob v celé populaci ČR^(46, 63).



Obr. 1 Odhadované procentuální zastoupení případů a úmrtí jednotlivých druhů rakoviny v ČR pro rok 2008 (obě pohlaví), na 100 000 obyvatel, převzato z European Cancer Observatory⁽⁶³⁾

S rozvojem nádorového onemocnění je spjata řada společných rizikových faktorů. Jmenovatelem většiny z nich je především nezdravý životní styl, který v sobě zahrnuje kouření a konzumaci alkoholu. Dále nevhodnou stravu, obsahující zvýšené procento tuků a cukrů, přídavek nejrůznějších aditiv a způsob úpravy potravin (např. pyrolytické procesy probíhající v mase při vysokoteplotních procesech, produkující tvorbu karcinogenních sloučenin)⁽¹⁰³⁾. S nevhodnou stravou jde ruku v ruce obezita a s ní spojená nedostatečná fyzická aktivita. Dalším rizikovým faktorem, působícím ve vzniku nádorových onemocnění, je expozice chemickým karcinogenům ze znečištěného životního prostředí

(např. benzo(a)pyren, 3-nitrobenzanthron). Hlavními původci znečištění ovzduší jsou průmyslová výroba, spalování ve spalovnách a tepelných elektrárnách a stále narůstající automobilová doprava. Rovněž nadměrná expozice ultrafialovému a ionizujícímu záření má za následek vznik nádorového onemocnění. V neposlední řadě jsou pak iniciátory rakoviny i některé infekce jako je hepatitida B nebo lidský papilomavirus^(173, 142). Více než 30% rakoviny lze předejít, pokud se lidé vyhnou klíčovým rizikovým faktorům⁽³²⁾.

1.1 Proces kancerogeneze

Kancerogeneze je takový proces, při kterém v organismu dochází k transformaci normální, zdravé buňky v buňku nádorovou. Molekulární příčinou vzniku nádorového onemocnění je mutace v jaderné DNA. Tato změna na úrovni genetické informace zapříčiní odklon buňky od kontrolních a regulačních mechanismů buněčného růstu. Následně pak v buňce dochází k nekontrolovanému dělení a růstu těchto iniciovaných buněk v patologický útvar, tedy nádor (tumor)⁽¹⁷³⁾.

Normální buněčný růst je vysoce kontrolovaný proces, na kterém se podílejí růstové faktory a receptory růstových faktorů. Prostřednictvím kaskády biochemických reakcí se signál dostává až k jádru buňky, kde dochází k vazbě transkripčních faktorů na DNA, a následně k produkci proteinů potřebných k buněčnému růstu nebo k dělení buněk. Pokud je genetická informace poškozená nebo mutovaná, kódovaný protein nebude správně plnit svoji funkci v buněčném metabolismu.

Velmi často dochází k mutaci protoonkogenů. Protoonkogen je strukturální gen, který kóduje protein, podílející se na regulaci dělení buněk a diferenciaci. Mutace protoonkogenu v onkogen se projeví ztrátou těchto funkcí resultující v neoplastickou transformaci buňky⁽¹⁴¹⁾.

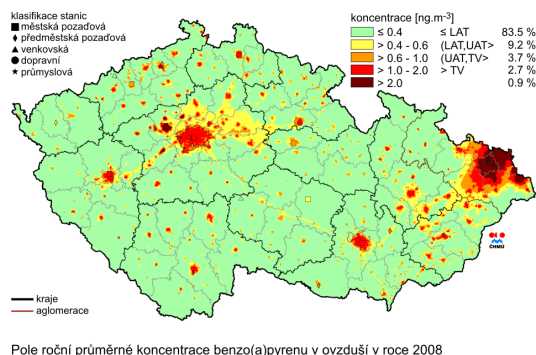
Kromě protoonkogenů se na regulaci buněčného cyklu podílí také tzv. antionkogeny, neboli tumor supresorové geny, které potlačují proliferaci normálních somatických buněk a udržují je v klidovém stadiu. Existují desítky tumor supresorových genů, identifikovaných jako původce nádorových onemocnění, např. p53 spjatý s mnoha druhy rakoviny nebo BRCA1 u rakoviny prsou⁽¹⁷³⁾. Změny v těchto důležitých genech, protoonkogenech a tumor supresorových genech, vedou ke vzniku mutací a tudíž k maligní transformaci zdravé buňky⁽¹⁶⁷⁾.

Mutace může být způsobena vnitřními faktory (spontánní mutace při replikaci). Nebo vnějšími faktory, ty lze rozdělit podle jejich povahy na biologické faktory

(zastoupené viry a genetickými předpoklady), dále fyzikální faktory (např. radioaktivní a UV záření, mechanické vlivy - azbest) a chemické faktory⁽¹⁶⁷⁾. Chemickým karcinogenům je v současné době věnována stále větší pozornost. Mezinárodní institut pro výzkum rakoviny (IARC) se od roku 1971 zabýval studiem více jak 900 látek, z nichž přibližně 414 látek identifikoval jako prokázaných či potenciálně karcinogenních pro člověka⁽⁶⁴⁾.

Podle mechanismu působení lze chemické karcinogeny rozdělit na:

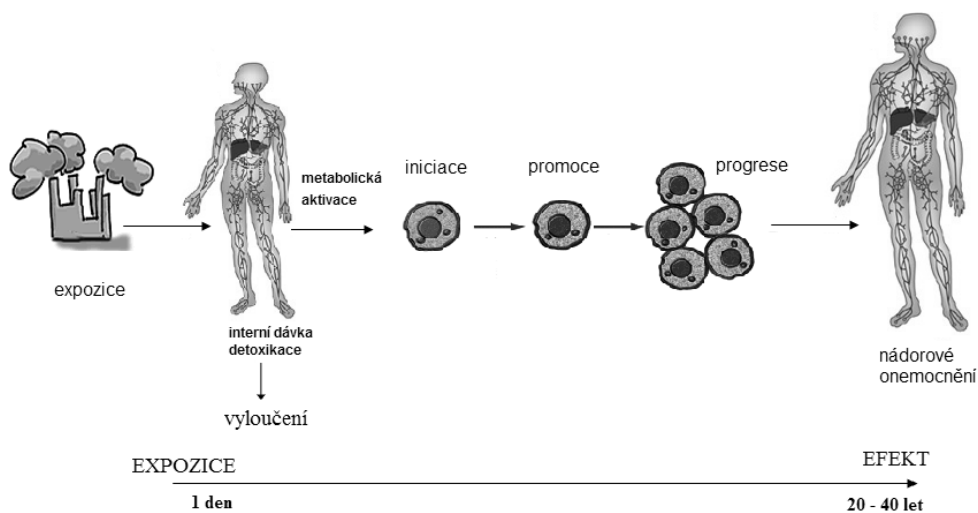
- **genotoxické karcinogeny**, které se váží kovalentní vazbou na DNA za tvorby aduktů (benzo(a)pyren, na obrázku 2 je uvedeno znečištění ovzduší touto látkou v ČR)
- **epigenetické karcinogeny**, které modifikují DNA nekovalentní vazbou, např. interkalací (vmezeřením) do její dvoušroubovicové struktury
- **karcinogeny způsobující změny struktury molekul DNA**, které poškozují strukturu DNA jedno- a dvouřetězovými zlomy (single and double-strand break), nebo může dojít ke změně struktury DNA bifunkčními činidly, které způsobují tzv. cross-linking (propojení molekul)⁽¹⁶⁷⁾.



Obr. 2 Koncentrace B(a)P v ovzduší ČR, převzato z⁽¹⁹¹⁾

Proces kancerogeneze je velmi složitý, multifázový proces, který lze rozdělit minimálně do třech fází: iniciace, promoce a progrese^(173, 167). Při *iniciaci* dochází ke změně genetické informace v normální buňce, která vede ke vzniku modifikace v DNA. Mutace může být rozpoznána a opravena. Buňka, ve které došlo k mutaci DNA vedoucí k aktivaci onkogenů a deaktivaci tumor supresorových genů a toto poškození DNA nebylo opraveno reparačními enzymy, je pak označována jako *buňka iniciovaná*. Během *promoce* dochází k ještě intensivější proliferaci primárně pozměněných buněk, pod vlivem látek –

promotorů. Většina z nich má pouze epigenetické vlastnosti, jejich účinky se proto mohou projevit až po působení genotoxických iniciátorů. Velká část promotorů je tkáňově specifická (např. forbolester - specifický promotor pro vývoj nádorů kůže)⁽¹⁶⁷⁾. Promoční fáze může trvat léta až desetiletí. I toto stádium je stále ještě reverzibilní, při odstranění promočního činitele, je možné zastavit expanzi v nádorový útvar (*benigní nádor*)⁽¹⁷³⁾. Poslední fázi kancerogeneze je *progrese*. Látky působící v této části jsou označovány za progresory. V této fázi dochází k nevratné změně z částečně kontrolovaného růstu nádoru benigního na růst plně nekontrolovatelný za vzniku *maligního nádoru* (Obr. 3). Z něj pak mohou nádorové buňky cestovat krevním řečištěm, či mízními cestami na jiné místo organismu, kde tak vznikají metastáze^(173, 167).



Obr. 3 Schéma víceetapového procesu kancerogeneze, upraveno a převzato z⁽¹⁶⁷⁾

Růst nádoru je doprovázen také angiogenezí nádorové tkáně. Za angiogenezi jsou odpovědné vaskulární endoteliální růstové faktory⁽¹⁷³⁾.

Další dělení nádorů je dle původu tkáně, ze které nádor vznikl. Nádorové buňky mohou vzniknout v jakékoli tkáni či orgánu. Nejpočetnější skupinou jsou nádory vzniklé z epiteliálních tkání (přes 90 % případů rakoviny). Z hlediska orgánové příslušnosti bývají nejčastěji zasaženy plíce, kůže a střevo⁽¹⁴¹⁾.

Nádorová buňka vykazuje výrazné vlastnosti, kterými se odlišuje od normální zdravé buňky:

Nádorová buňka se dokáže vyhnout apoptóze, vytváří si potřebné růstové faktory, neomezeně se dělí (je immortalizovaná), má zvýšenou rychlost buněčného dělení, sama si vytváří potřebné růstové faktory, je necitlivá na inhibitory růstu, má změněnou schopnost diferenciaci, postrádá schopnost kontaktní inhibice, je schopná napadnout sousední tkáň, ve vzdálených místech má schopnost budovat metastáze, má schopnost podpořit růst cév (angiogeneze)^(173, 142).

1.2 Biotransformace xenobiotik v organismu

Způsob přeměny a odstraňování nízkomolekulárních i vysokomolekulárních cizorodých látek (xenobiotik), kterými jsou např. léčiva, karcinogeny, polutanty životního prostředí, se z organismu uskutečňuje mechanismy označovanými jako **biotransformace**⁽¹¹⁹⁾. Většina xenobiotik patří mezi organické látky hydrofóbní charakteru, které procházejí membránami a mohou se v organismu kumulovat. Vyloučení xenobiotik z těla je možné až po jejich metabolické přeměně na polárnější metabolity, což je hlavním cílem biotransformace⁽¹⁰⁴⁾.

Hydrofilnější metabolity xenobiotik nemusí být jen netoxické, biologicky inertní látky, ale v závislosti na chemické struktuře daného xenobiotika a na enzymovém systému, který ho v organismu přeměňuje, se může naopak jednat o látky značného biologického významu. Místo aby došlo k detoxikaci dané látky, dochází k její aktivaci. Metabolickou aktivaci tohoto typu vyžaduje řada léčiv, ale aktivováno je také 98 % genotoxických kancerogenů⁽¹⁰⁷⁾. O působení karcinogenů je známo, že řada z nich - tzv. proximálních karcinogenů - musí projít biologickou aktivací. Zatímco jen malé procento z nich je okamžitým karcinogenem - tzv. ultimálním⁽¹²⁰⁾.

Tyto dva procesy, detoxikaci a aktivaci, nelze od sebe vzájemně oddělit. Týž enzym se může účastnit např. v detoxikaci jedné chemické látky a přitom zvyšovat toxicitu látky druhé. Velice složité vztahy rovnováhy existují mezi oběma směry metabolismů, aktivačním a detoxikačním. Rovnováha mezi nimi může být posunuta oboustranně, a to důsledkem působení vnějších i vnitřních faktorů⁽¹⁷⁶⁾.

Proces biotransformace xenobiotik u různých organismů není totožný. Průběh a stupeň její intenzity je ovlivněn řadou různých faktorů a rovněž i vlastnostmi a strukturou

samotné cizorodé látky. Biotransformaci také ovlivňuje organismus, do kterého bylo xenobiotikum vpraveno. Odchytky v biotransformaci xenobiotik se projevují rovněž i v rámci jednoho biologického druhu⁽¹⁷⁸⁾. Většina enzymů, které participují na biotransformaci cizorodé látky, je lokalizována v membráně endoplazmatického retikula⁽¹⁰⁴⁾ např. systém oxidas se smíšenou funkcí (MFO systém), prostaglandin H synthasa. Další biotransformační enzymy se ale také vyskytují volně v cytoplazmě (patří sem např. NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1, xanthinoxidasa, některé peroxidasy⁽¹⁰⁶⁾), dále se vyskytují v Golgiho aparátu nebo i v extracelulárním prostoru (laktoperoxidasa v mléce⁽¹⁰⁶⁾).

U živočichů dochází k biotransformaci xenobiotik ve dvou fázích⁽¹⁷⁵⁾. První fází, která je označována jako **derivatizační**, dochází ke zvýšení polariry příslušného xenobiotika a to především reakcemi oxidačními, ale i reakcemi redukčními. Druhou fází, označovanou jako **konjugační**, dochází ke konjugaci těchto polarizovaných molekul s endogenními látkami hydrofilního charakteru (např. s kyselinou glukuronovou, glycinem, taurinem, aktivním sulfátem, glutathionem, cysteinem, aktivním acetátem atd.⁽⁵⁸⁾).

Rozeznáváme tři typy derivatizačních reakcí (I. fáze biotransformace):

- **oxidace** (C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace, dealkylace, deaminace, epoxidace, oxidace alkoholů, aldehydů a podobně)
- **hydrolysa** (hydrolysa esterů, amidů)
- **redukce** (nitro-, azo- a chinoidní sloučeniny), mezi kancerogeny aktivované redukční cestou patří např. 2-nitroanisol⁽¹⁷⁰⁾, 3-NBA, 1-nitropyren⁽⁶⁰⁾, 1,6-nitropyren⁽³⁸⁾ či aristolochové kyseliny^(165, 163)

Nejdůležitějším enzymovým systémem, který se podílí na I. fázi biotransformace, je mikrosomální systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO) s cytochromem P450 jako terminální oxidasou, který katalyzuje většinu oxidačních reakcí. Dalšími enzymovými systémy, které se podílejí na derivatizační fázi, jsou DT-diaforasa, hemové peroxidasy, alkoholdehydrogenasy, aldehyddehydrogenasy a reduktasy⁽¹²⁸⁾.

Zieglerův enzym, mikrosomální monooxygenasa obsahující flavin (FMO), se taktéž podílí na I. fázi biotransformace. Tento enzym je také zabudován do membrány endoplazmatického retikula, jeho substráty jsou NADPH a O₂, prosthetickou skupinou je FAD. Podílí se především na metabolismu terciárních aminů na N-oxidy, sekundární aminy na N-hydroxyderiváty a sloučeniny s obsahem síry⁽¹⁹⁴⁾.

Typy konjugačních reakcí (II. fáze biotransformace)

Vznik konjugátů s kyselinou glukuronovou patří mezi nejtypičtější konjugáty u živočichů. Konjugáty jsou tvořeny za katalýzy UDP-glukuronosyltransferasy. Vzniklé konjugáty mají zejména detoxikační význam (O- nebo N-glukosiduronáty) a jsou vylučovány především močí^(58, 129, 73).

Konjugaci s glutathionem řadíme do významné skupiny antikancerogenních procesů. Tvorbu konjugátů katalysuje enzym glutathion-S-transferasa, která je schopna vázat reaktivní metabolity a katalysovat jejich vazbu s glutathionem^(176, 58). Tento konjugát ještě není finální sloučeninou, která je vylučována, ale dochází k odštěpení γ -glutamylového zbytku v ledvinách a glycylového v játrech za katalýzy peptidas. Cysteylový zbytek je dále upravován acetylací (katalysovanou acetyltransferasami) za vzniku merkapturové kyseliny, která již může být vyloučena močí. Glutathion je považován za "scavenger" (tzv. vychytávač) cizorodých látek⁽⁵⁵⁾.

Konjugáty s aminokyselinami (cystein, glycin, taurin, glutamin) mají rovněž detoxikační význam, a jsou vylučovány výkaly.

V konjugační fázi biotransformace však může také dojít i k aktivaci xenobiotika na toxičtější sloučeninu. Je tomu tak např. u konjugátů s aktivním sulfátem, které vznikají z N-hydroxylovaných aromatických aminů účinkem sulfotransferas (sulfát však musí být pro konjugační reakci nejprve aktivován na 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát-PAPS). Konjugát sulfátu s N-hydroxylsloučeninami (z první fáze biotransformace) je v kyselém prostředí močových cest nestabilní a rozpadá se za vzniku nitréniového (event. karbéniového) iontu⁽⁵⁸⁾, vzniká tak elektrofil, který je schopen reagovat s DNA a proteiny. Sekundární dekonjugace může nastat i účinkem enzymových systémů, přítomných ve střevní mikroflóře⁽¹⁷⁶⁾.

1.3 Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO systém)

Mikrosomální monooxygenasový systém je soubor enzymů, které katalyzují celou řadu oxidačních, oxygenačních, popř. redukčních reakcí, přičemž využívá především molekulární kyslík⁽²⁹⁾. Je též označován jako systém oxidas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases = MFO systém). Obsahuje tři základní složky:

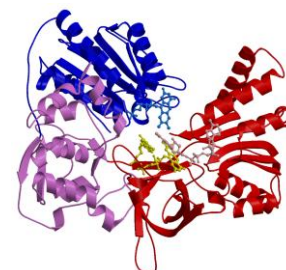
1. hemthiolátový enzym **cytochrom P450**, který slouží jako terminální oxidasa

2. flavoproteinový enzym **NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa**, která slouží jako dělič elektronového páru
3. nedílnou součástí je **membrána endoplazmatického retikula**.

Membránové lipidy způsobují změny cytochromu P450 v jeho konformaci, a tím zvyšují jeho afinitu k substrátu, stimulují tvorbu funkčně aktivního komplexu cytochrom P450 - NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa a jsou také „zásobárnou“ uložených substrátů cytochromu P450⁽⁵³⁾. V MFO systému může také fakultativně fungovat cytochrom b₅ a NADH:cytochrom b₅ reduktasa (EC 1.6.2.2). MFO systém může být lokalizován buď na *vnější (cytosolární) straně membrány hladkého i hrubého endoplazmatického retikula* v orgánech exponovaných látkami cizorodé povahy (játra, plíce, ledviny, GIT, kůže a mozek). Zde se MFO systém účastní první fáze biotransformace xenobiotik. Nebo je MFO lokalizovaný na *mitochondriální membráně*, jak je tomu především v kůře nadledvin, kde se podílí na metabolismu endogenních látek (např. steroidů a mastných kyselin).

1.3.1 NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa

Enzym NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (EC 1.6.2.4) je membránově vázaný „žlutý protein“, který katalyzuje přenos elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromu P450⁽¹⁴⁹⁾ (v daném organismu je většinou jedna forma NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy, která má schopnost spolupracovat s více formami cytochromu P450). Přenos elektronů byl popsán také na cytochrom c, cytochrom b₅, hem oxygenasu, ferrikyanid, elongasu mastných kyselin a další látky⁽⁵³⁾. NADPH:cytochrom P450 reduktasa může být v reakcích MFO systému za určitých okolností zastoupena NADH:cytochrom b₅ reduktasou, které jako donor vodíku slouží NADH.



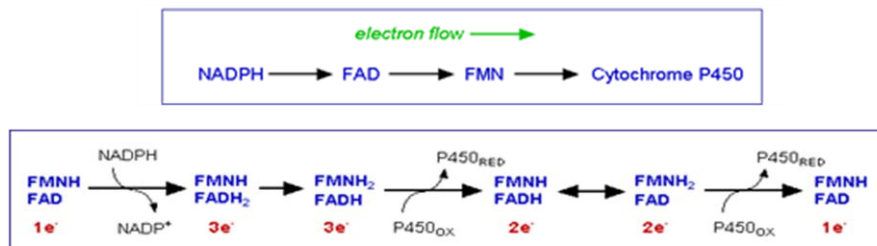
Obr. 4 Struktura NADPH:cytochrom P450 reduktasy, převzato z⁽⁶⁵⁾

NADPH:cytochrom P450 reduktasa má dvě funkční domény, hydrofobní N-terminální (6 kDa), kterou je zakotvena v membráně⁽⁸³⁾ a hydrofilní C-terminální katalytickou doménu (72 kDa)^(158, 181). C-terminální funkční doména se skládá z FMN- a FAD- vazebné strukturní domény. „Spojovací“ struktura umístěná mezi FMN- a FAD- vazebnou doménou pak zodpovídá za správnou prostorovou orientaci obou strukturních

domén. FAD a FMN skupiny se vzájemně nepřekrývají, jsou v kontaktu prostřednictvím 7- a 8- methylových skupin isoalloxazinových kruhů, které leží těsně u sebe a svírají úhel zhruba 150° . Přenos elektronů mezi flaviny je tedy patrně přímý, není zprostředkovaný zbytkem aminokyseliny, a proto je tento přenos poměrně rychlý⁽¹⁸¹⁾.

Interakce mezi NADPH:cytochrom P450 reduktasou a cytochromem P450 jsou hlavně elektrostatické povahy. Kladně nabitý povrch cytochromu P450 (lysiny, argininy) interaguje se záporně nabitým povrchem NADPH:cytochrom P450 reduktasy (aspartát, glutamát). Dále se také uplatňují interakce hydrofobní, a to mezi nepolárními aminokyselinami (leucin, tryptofan, valin) v oblasti membránových domén NADPH:cytochrom P450 reduktasy a cytochromu P450^(181, 112, 171).

Funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy jako děliče elektronového páru byla vysvětlena na základě rozdílných redoxních potenciálů obou flavinových prosthetických skupin^(179, 123). Akceptorem elektronů (respektive atomů vodíku) od NADPH je FAD, který elektrony následně předává FMN (**Obr. 5**). Za jedoelektronovou redukci akceptorové molekuly - cytochromu P450 - je (v případě savčí NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy) zodpovědný zcela redukovaný hydrochinon FMNH_2 ⁽⁶⁹⁾:



Obr. 5 Schéma toku elektronů od NADPH na CYP a schéma přenosu elektronů mezi flaviny NADPH:cytochrom P450 reduktasy⁽⁶⁹⁾

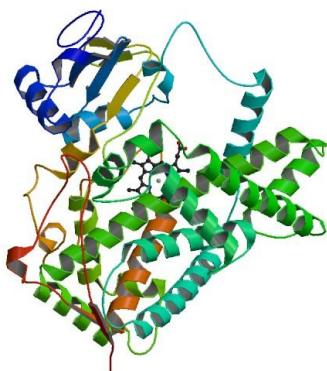
NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa a cytochromy P450 jako složky MFO systému spolu při biotransformaci xenobiotik i eubiotik velmi úzce „spolupracují“. Některé ze sloučenin, majících schopnost indukovat cytochromy P450, indukují současně i NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu. Většinou však k indukci NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy dochází v daleko menší míře. Zatím nebylo prokázáno, zda k indukci NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy dochází stejnými mechanismy (prostřednictvím stejných receptorů), jako při indukci cytochromu P450. NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu indukují například 3,3',4,4'-tetrachlorbifenyl⁽¹⁸⁷⁾ progesteron⁽¹⁰¹⁾ a některé dimethylsiloxany⁽¹⁹³⁾. Dále byla zvýšená aktivita NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy

stanovena v jaterních, ledvinných a plicních mikrosomech u potkanů, vystavených čtyřtýdenní inhalaci zplodin motorových vozidel⁽¹⁷⁷⁾.

NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa je v rámci fylogeneze velmi konzervovaný enzym. NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy z různých rostlinných a živočišných druhů vykazují vysokou homologii v aminokyselinové sekvenci (například lidská a potkaní forma mají sekvenční homologii 92%), přičemž nejvíce odlišností v aminokyselinové sekvenci se vyskytuje v N-terminální „kotvící“ oblasti, zatímco FMN-vazebná doména je u obou forem téměř shodná. Tento fakt ukazuje na významnou roli tohoto enzymu v průběhu evoluce⁽¹⁴⁷⁾.

1.3.2 Cytochrom P450

Cytochrom P450 (EC 1.14.14.1) je terminální oxidasou MFO systému. Zprostředkovává vazbu molekulárního kyslíku, jeho aktivaci a zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu⁽¹³¹⁾, přičemž druhý atom kyslíku redukuje na vodu⁽²⁸⁾. Elektrony, které jsou k redukcí potřeba, dodává NADPH:cytochrom P450 reduktasa⁽⁵⁷⁾ případně NADH:cytochrom b₅ reduktasa⁽¹⁷²⁾.



Obr. 6 Struktura cytochromu P450 2B4, převzato z⁽⁶⁷⁾

Roku 1958 Garfinkel a Klingenberg objevili v jaterních mikrosomech pigment, který po redukcí vykazuje v komplexu s oxidem uhelnatým absorpční maximum při 450 nm^(49, 88). Hemoproteinový charakter pigmentu dokázali Omura a Sato roku 1964 a na základě podobnosti povahy vazby hemu cytochromům b a podle netypického maxima Soretova pásu jej nazvali cytochromem P450⁽¹²²⁾.

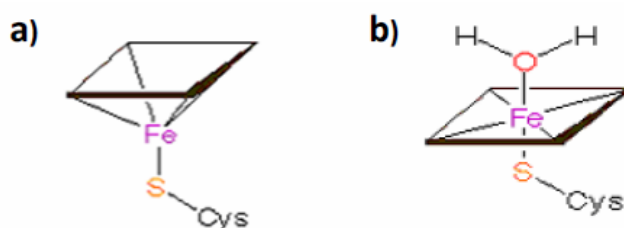
Z evolučního hlediska je cytochrom P450 považován za velmi starý hemoprotein, který se objevil mnohem dříve než hemoglobin^(88, 122). Je příkladem enzymu, který se vyvíjel cestou divergentní evoluce. Z jediného genu cytochromu P450 archebakterií se do současnosti vyvinulo ohromné množství odlišných genů, kódujících cytochromy P450 prokaryotních i eukaryotních organismů⁽¹⁵⁷⁾. Systém cytochromu P450 je v eukaryotických buňkách vázán v membráně endoplasmatického retikula nebo mitochondrií prostřednictvím transmembránového N-terminálního α -helixu⁽⁴⁰⁾, zatímco bakteriální cytochromy P450 jsou enzymy rozpustné.

Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je v proteinové molekule enzymu vázán hydrofobními silami, a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu (pátý ligand železa protoporfyrinu IX)^(5, 71). Nejedná se tedy o klasický cytochrom (protoporfyrin IX vázán prostřednictvím imidazolového zbytku histidinu), ale o *hemthiolátový protein*. Toto uspořádání umožňuje výjimečné chování těchto hemoproteinů a odlišuje je od hemoproteinů ostatních. Šestáým ligandem je atom kyslíku molekuly vody⁽⁴⁵⁾. Proteinovou část CYP (apoprotein) tvoří 490-520 aminokyselin a je možno na ní rozlišit domény pro vazbu hemu, reduktasy a substrátu. Cytochromy P450 mají nejenom širokou substrátovou specifitu, metabolisují substráty od ethylenu (Mr 28) až po cyklosporin A (Mr 1201)⁽⁷⁸⁾, ale i strukturu. I přesto, však všechny CYP obsahují konzervované oblasti v blízkosti vazebného místa pro hem.

1.3.2.1 Spinové formy cytochromu P450

Cytochromy P450 existují díky přechodnému charakteru hemového železa⁽⁵³⁾ ve dvou spinových formách,

- **Vysokospinová forma cytochromu P450:** tato forma vzniká v případě, že ion železa je v pentakoordinovaném stavu a všechny jeho valenční elektrony jsou nespárované (spin 5/2). Ion železa je „vytažen“ thiolátovou skupinou nad rovinu porfyrinového skeletu (**Obr. 7**). Tato forma vykazuje maximum Soretova pásu při 390 nm.
- **Nížkospinová forma cytochromu P450** (spin 1/2) je charakteristická maximem absorpce při 418 nm (Soretův pás). Ion železa je v hexakoordinovaném stavu, hemové železo tedy interaguje ještě s jedním ligandem (například s –OH, –COOH nebo s –NH₂ skupinou postranních řetězců aminokyselin apoproteinu⁽⁵³⁾, či atomem kyslíku z molekuly vody⁽⁴⁵⁾), a nachází se pak prakticky v rovině kruhu protoporfyrinu IX (**Obr. 7**).



Obr. 7 Vysokospinová a) a nízkospinová b) forma, převzato z⁽⁶⁶⁾

Poměr obou spinových forem závisí na isoformě enzymu cytochromu P450, pro většinu molekul ale platí, že jsou v nízkospinovém stavu. Značná změna jejich poměru ve

prospěch vysokospinové formy nastane při vazbě substrátu do vazebného místa, kdy dochází k vytlačení šestého ligandu a nárůstu vysokospinové formy. V absorpčním spektru je tedy patrný nárůst absorbance při 390 nm a pokles při 418 nm – tzv. „substrátové spektrum“. Šestým ligandem železa se však může stát i samotný substrát (či nepřeměňovaná látka vázající se do aktivního centra enzymu), pak registrujeme pokles absorbance při 390 nm a nárůst (podle heteroatomu) při 418 až 460 nm - tzv. „ligandové spektrum“.

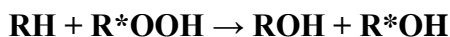
1.3.2.2 Enzymové funkce cytochromu P450

Oxidasová funkce - aktivace biatomické molekuly kyslíku pro klíčové reakce⁽¹⁸⁾. Spontánní reakce organických molekul s atmosférickým kyslíkem jsou spinově zakázané. Aerobní organismy proto obsahují řadu proteinů, nesoucích prosthetickou skupinu s kovem nebo flavinem, pomocí nichž jsou schopny využít oxidační potenciál kyslíku⁽¹⁸⁾.

Oxygenasová aktivita - zabudování kyslíku do molekuly málo reaktivního substrátu.

Redukční reakce - elektrony poskytnuté NADPH:cytochrom P450 reduktasou mohou redukovat přímo substrát a nejsou využity k aktivaci molekuly kyslíku. K této reakci dochází, pokud je hydrofobní substrát zároveň i dobrým ligandem železa porfyrinového skeletu, a je tedy vázán místo kyslíku, jako šestý ligand. Tento mechanismus je popsán *in vitro* a existují i nepřímé důkazy pro jeho průběh *in vivo*.

Peroxidasová aktivita - místo kyslíku je druhým substrátem organický peroxid (R*OOH) nebo peroxid vodíku⁽³⁾. Pro průběh reakce není potřeba NADPH jako zdroj elektronů⁽³¹⁾. Produktem reakce je stejně, jako při klasickém mechanismu, hydroxylovaný substrát (ROH):



Produkce peroxidu vodíku (H₂O₂) a aktivních forem kyslíku

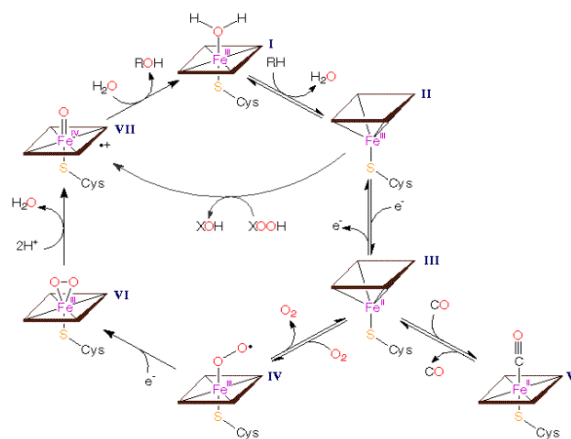
K výše zmíněnému jevu dochází pouze tehdy, když MFO systém interaguje s látkou, která se obtížně hydroxyluje (je pouze hydrofobní, tvoří komplex s enzymem, ale těžko se do ní zabudovává kyslík). Proběhne oxidasová fáze funkce cytochromu P450 (aktivuje se molekula kyslíku), ale už neproběhne fáze oxygenasová.

Reakční mechanismus monooxygenasové reakce

Nejtypičtější reakcí katalyzovanou cytochromy P450 je monooxygenasová reakce, která zahrnuje aktivaci molekulárního kyslíku a zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu. Aktivace kyslíku je umožněna díky dvěma elektronům, pocházejícím z NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy, ale donorem druhého elektronu může být i NADH:cytochrom b₅ reduktasa⁽⁵³⁾. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Obecný průběh monooxygenasové reakce katalyzované cytochromem P450, lze vyjádřit sumární rovnicí (kde RH značí substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce)⁽¹⁵⁸⁾:



Reakční sled probíhá uspořádaným mechanismem a sestává alespoň z osmi kroků.



Obr. 8 Schéma reakčního mechanismu monooxygenasové reakce. Je zde naznačena i peroxidasová aktivita cytochromu P450 a tvorba komplexu redukováného cytochromu P450 s oxidem uhelnatým. Bližší popis je uveden níže v textu⁽⁶⁶⁾

Schematicky je znázorněn na obrázku 8^(66, 82). V klidovém stavu je hemové železo ve ferri formě (tzn. s oxidačním číslem III) a je hexakoordinováno (nízkospinový stav)[I]. Po vniknutí substrátu (**RH**) do aktivního místa dochází k vytlačení šestého ligandu iontu železa, které zůstane pentakoordinované (vysokospinový

stav), a zároveň dochází ke konformační změně v molekule enzymu [II]. Vazbou substrátu je umožněna jednoelektronová redukce

cytochromu P450 interakcí s NADPH:cytochrom P450 reduktasou, čímž se hemové železo redukuje na ferro formu, přičemž zůstává pentakoordinováno (vysokospinový stav). Tato forma enzymu je pak schopna vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy [III]. Navázáním molekulárního kyslíku (III) se dále tvoří ternární ferri-superoxidový komplex, kde je železo opět hexakoordinované a tudíž v nízkospinové stavu. Tento nepříliš stabilní komplex je dále redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou nebo NADH:cytochrom b₅ reduktasou, čímž dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion [IV] (Pokud není druhý elektron doručen dostatečně rychle, komplex [IV] se rozpadá a uvolněný superoxidový anionradikál je pak superoxidodismutasou přeměněn na peroxid vodíku,

který je pro buňky toxický). Vazba kyslíku na formu [III] může být inhibována v přítomnosti oxidu uhelnatého, který vytváří ternární ferrokomples **cytochrom P450-CO-RH**. (Fe^{II}) [V]. Komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku po druhé redukci je již zcela aktivovanou formou cytochromu P450, ve které dochází k heterolytickému štěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku je redukován, přijme dva protony a dojde k uvolnění vody [VI]. Naproti tomu, druhý atom kyslíku zůstane vázán na Fe hemu a vzniká tak ferrioxenový komplex [VII]. Ten je stabilizován mesomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Takto vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu, za vzniku radikálu substrátu, a hydroxylovaného radikálu vázaného na Fe hemu. Dochází k rekombinaci radikálů, za vzniku hydroxyderivátu substrátu (ROH), a nativní formy cytochromu P450. Produkt reakce (ROH) je poté z enzymu uvolněn⁽¹⁵⁸⁾. V přítomnosti oxidačních činidel, jako jsou organické peroxidy, může z komplexu [III] vznikat přímo stav [VII] (tzv. peroxidasová aktivita).

1.3.2.3 Názvosloví cytochromů P450

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (isoenzymech, isoformách), které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry homologie jejich primární struktury. Rodiny cytochromů P450 jsou označovány prvním číslem za zkratkou CYP, následuje velké písmeno označující podrodinu⁽¹¹⁸⁾ Jednotlivé isoenzymy jsou pak určeny číslem za písmenem podrodiny⁽¹⁵⁸⁾ (např. CYP3A4).

Do stejné rodiny náleží cytochromy P450, u kterých byla nalezena více než 40% homologie aminokyselinové sekvence jejich proteinů. Do stejné podrodiny pak ty, které vykazují homologii více než 55%⁽¹⁵⁴⁾. Současná nomenklatura byla navržena Nebertem a spolupracovníky⁽¹¹⁵⁾. Lidské cytochromy P450 byly klasifikovány do 18 rodin⁽⁶²⁾ a 44 podrodin. Metabolismu léčiv, respektive xenobiotik, se účastní převážně cytochromy P450 pouze tří z těchto rodin: **CYP1**, **CYP2** a **CYP3** (v menší míře též CYP4). Ostatní rodiny participují na biosyntéze steroidů, cholesterolu či žlučových kyselin, na metabolismu mastných kyselin, kyseliny arachidonové apod.⁽¹¹⁵⁾

Základní, známé údaje o enzymových aktivitách forem cytochromu P450 katalysujících biotransformaci xenobiotik jsou shrnuty v následující Tabulce 1:

Tabulka 1. Přehled lidských cytochromů P450 participujících na metabolismu xenobiotik ^(157,52)

CYP	Orgánová distribuce, iducibilita, polymorfismus	Substráty	Induktory	Inhibitory
1A1	<ul style="list-style-type: none"> * konstitutivně: plíce, ledviny, kůže, placenta, lymfocyty, gastrointestinální trakt (GIT) * inducibilní ve všech tkáních * polymorfismus * souvislost exprese, kouření a bronchogenní rakoviny 	<ul style="list-style-type: none"> * polycyklické aromatické uhlovodíky (benzo[a]pyren) * aflatoxiny * spíše aktivační funkce 	<ul style="list-style-type: none"> * polutanty PAU * kouření * výživa 	<ul style="list-style-type: none"> * N₂O * léčiva (ellipticin) * α-naftoflavon
1A2	<ul style="list-style-type: none"> * konstitutivně: játra (13 % CYP) a plíce * inducibilní ve všech tkáních * polymorfismus (vzácně se vyskytuje bodová mutace v čínské populaci) * souvislost exprese, metab. aromat. aminů a nádorů močového měchýře 	<ul style="list-style-type: none"> * aromatické a heterocyklické aminy (vznikající při vysokoteplotním zpracování masa) * některé steroidní látky * bufuralol, fenacetin, paracetamol, kofein, theofylin * spíše aktivační funkce 	<ul style="list-style-type: none"> * výživa (grilované maso, brokolice, růžičková kapusta) * kouření * tělesná námaha * polutanty (dioxiny) * léčiva (nífampicin, fenobarbital, insulin) 	<ul style="list-style-type: none"> * léčiva (estrogeny, ellipticin) * furafyllin
2B6	<ul style="list-style-type: none"> * konstitutivně: játra, plíce, GIT * inducibilní 	<ul style="list-style-type: none"> * nikotin * aflatoxiny * protinádorová léčiva (cyklofosfamid) * metadon 	<ul style="list-style-type: none"> * léčiva (barbituráty, dex. ametazon) 	<ul style="list-style-type: none"> * diamanthan
2C19	<ul style="list-style-type: none"> * konstitutivně: játra, duodenum * polymorfismus 	<ul style="list-style-type: none"> * diazepam * barbituráty * cyklofosfamid * progesteron * aminopyrin 	<ul style="list-style-type: none"> * rifampicin 	<ul style="list-style-type: none"> * fluoxetin
2D6	<ul style="list-style-type: none"> * konstitutivně: játra, GIT, bronchiální epitel, plicní parenchym, mozek * inducibilní * polymorfismus 	<ul style="list-style-type: none"> * větší hydrofobní molekuly * opioidní látky (kodein), neuroleptika, antidepressiva, stimulancia, např. „extáze“ (3,4-methyldioxyamfetamin) 	<ul style="list-style-type: none"> * těhotenství 	<ul style="list-style-type: none"> * léčiva: metamfetamin, fluoxetin (Prozac) * některá antihistaminika a neuroleptika * metadon, kokain
2E1	<ul style="list-style-type: none"> * konstitutivně: játra (7 % CYP), ledviny, nosní sliznice, plíce, GIT, lymfocyty * inducibilní * polymorfismus * souvislost s rakovinou hlavy, krku a plic 	<ul style="list-style-type: none"> * nízkomolekulární látky: etanol, aceton, hexan, benzen, diethyleter, chloroform, anilin, chlorozoxazon, nitrosaminy, paracetamol, kofein 	<ul style="list-style-type: none"> * výživa: hladovění (=endogenní tvorba acetonu) * alkohol * chronický příjem * diabetes mellitus * organická rozpouštědla (toluen, aceton) * polutanty 	<ul style="list-style-type: none"> * akutní příjem ethanolu * řezka
3A4, 3A5	<ul style="list-style-type: none"> * konstitutivně: játra, GIT, ledviny, děloha, plod, plíce, (3A=60 % jaterního CYP) * inducibilní * polymorfismus neprokázán * geneticky podmíněná různá míra inducibility * souvislost s rakovinou jater 	<ul style="list-style-type: none"> * extrémně široká substrátová specifita: léčiva (cyklofosfamid, metadon, erytromycin, diazepam, lovastatin, kodein, ritonavir, dextrametorfan) * látky steroidní progesteron, testosteron) * kancerogenní xenobiotika (PAU, aromatické aminy) * kofein, kokain, lidokain (oxidace aflatoxinů) * látky steroidní povahy 	<ul style="list-style-type: none"> * léčiva (nífampicin, barbituráty, steroidní látky) * polutanty 	<ul style="list-style-type: none"> * výživa (grapefruitový džus (ireverzibilně), chinin) * léčiva: erytromycin, clotrimazol, chloramfenikol * ketokonazol

1.3.2.4 Variabilita v aktivitě a hladině cytochromů P450

Hlavní zdroje, vyvolávající individuální variabilitu v aktivitách cytochromů P450, pocházejí především z našeho životního prostředí, zahrnují zejména inhibici nebo indukci cytochromů P450 různými xenobiotiky^(76, 183). Dalšími faktory, které se podílejí na variabilitě, jsou biologické faktory jako např. pohlaví⁽³⁰⁾, věk, hormonální rovnováha, zdravotní stav jedince (hladovění, diabetes, obezita, vysoký tlak, záněty a infekce)^(2, 148) a cirkadiální rytmy⁽⁹⁵⁾. Neméně významným faktorem je také genetický polymorfismus v genech pro cytochromy P450 nebo jejich regulátorech.

- Genetický polymorfismus cytochromů P450

Vrozené změny DNA v kódující či regulační části genu mohou vést k absenci některé formy cytochromu P450, dále ke změně inducibility, nebo k tvorbě formy s pozměněnou katalytickou aktivitou⁽⁵⁰⁾. Vyskytuje-li se taková změna u více než 3% populace, hovoříme o genetickém polymorfismu cytochromu P450. U genů, kódujících cytochromy P450 s klíčovou fyziologickou funkcí, může mít výskyt defektní alely katastrofální následky. U genů pro enzymy přeměňující xenobiotika nemívá variabilita alel přímé patologické důsledky, avšak může způsobit zvýšení citlivosti vůči škodlivým účinkům některých xenobiotik či léčiv.

Nejvýznamnější variabilita, vyplývající z genetického polymorfismu, byla pozorována u forem CYP2D6 a CYP2C19, dále pak u forem 1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4⁽¹⁸⁸⁾.

Dle fenotypu mohou být jednotlivci rozděleni do čtyř skupin na:

1. *pomalé metabolisatory*, kteří mají dvě nefunkční alely daného genu
2. *středně rychlé metabolisatory*, kteří mají nefunkční pouze jednu alelu genu
3. *rychlé metabolisatory*, kteří mají dvě kopie normálního genu
4. *ultrarychlé metabolisatory*, kteří mají tři a více kopií normálního genu^(116, 137).

- Regulace hladiny cytochromů P450 jejich indukci

Řada cytochromů P450 patří mezi inducibilní enzymy. Indukce enzymů je definována, jako nárůst exprese katalyticky aktivních forem enzymů, kdy dochází ke

zvýšení transkripce na základě stimulace chemickým signálem⁽⁵⁰⁾. Indukce cytochromů P450 většinou zvyšuje biotransformaci xenobiotika, která by měla vést k jeho detoxikaci a k vyloučení z organismu. Jedná se tedy především o ochranný mechanismus. Některé cytochromy P450 však mohou nereaktivní sloučeninu přeměňovat na chemicky aktivní, toxické či karcinogenní intermediáty, v tomto případě se nejedná o detoxikaci, ale o aktivaci.

Regulace exprese cytochromů P450 je řízena několika systémy. Jedná se o regulaci exprese na genové úrovni, zahrnující funkci specifických receptorů, rychlost přepisu DNA do RNA, či stabilizaci syntetizované mRNA, a dále o posttranslační regulaci založenou především na stabilizaci molekuly proteinu daného cytochromu P450⁽¹³⁴⁾. Ve dvou posledně jmenovaných případech se tedy nejedná o pravou indukci.

Tabulka 2. Mechanismus indukce cytochromů P450. U indukce způsobené zvýšením transkripce daného genu je uveden také induktorem využívaný intracelulární receptor^(76, 183, 37)

Mechanismus indukce	Formy cytochromu P450 takto indukované
zvýšení transkripce genu	
- cytoplazmatický receptor pro induktor	CYP1A1, 1A2, 1B1 AhR - „Aryl hydrocarbon Receptor“
- jaderný receptor pro induktor	CYP2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19 CAR - „Constitutive androstane receptor“ CYP3A4, 3A5 PXR - „Pregnane X receptor“ SXR - „Steroid xenobiotic receptor“ CYP4A11 PPAR - „Peroxisome proliferator - activated receptor“
zvýšení rychlosti transkripce „mRNA processing“	CYP1A2
stabilizace mRNA	CYP1A1, 2E1, 3A4
stabilizace enzymu	CYP2E1

- Regulace exprese cytochromu P450 pomocí intracelulárních receptorů

Hlavní mechanismus indukce enzymu je přes zvýšenou míru transkripce. Cizorodé látky mohou indukovat genovou expresi CYP prostřednictvím mechanismů závislých na receptorech (*Tabulka 2*).

Jedním z těchto mechanismů je indukce prostřednictvím Ah receptoru. Ah receptor (**AhR**, „aryl hydrocarbon receptor“) je cytosolární protein, patřící do rodiny transkripčních faktorů **PAS** (Per-Arnt-Sim). Stimuluje transkripci genů *CYP1A1*, *CYP1A2* a *CYP1B1* a *NQO1* a rovněž i některých enzymů II. fáze biotransformace (glutathion-S-transferasa a UDP-glukuronosyltransferasa). Na **AhR** se v cytoplasmě váží chaperonové molekuly, které jej udržují v konformaci schopné vázat ligand. Po vazbě molekuly xenobiotika

(ligandu) a disociaci chaperonových molekul přechází aktivovaný **AhR** do jádra buňky, kde tvoří s **Arnt** („AhR-nuclear translocator“) heterodimerní transkripční faktor, který je v oblasti enhanceru schopen interagovat s **XRE** („xenobiotic responsive element“). Funkce promotoru genu pro CYP1A1 je pod kontrolou tohoto enhanceru^(188, 37). Modelovými ligandy AhR jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, 3,4-benzo(a)pyren, složky tabákového kouře, β -naftoflavon (β -NF) a další^(47, 37).

Dalším mechanismem regulace genové exprese CYP xenobiotiky je regulace prostřednictvím *jaderných receptorů*. Do této skupiny patří **CAR** („constitutive androstane receptor“), který se podílí na indukci CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2A6. Modelovým ligandem je fenobarbital nebo rifampicin. Dalším jaderným receptorem je **PXR** („pregnane X receptor“) pro živočišné systémy a jeho lidský homolog, označený jako receptor **SXR** („steroid xenobiotic receptor“)⁽⁸⁹⁾. Mezi enzymy indukované prostřednictvím těchto receptorů patří CYP3A4 a CYP3A5. Interagujícími ligandy jsou např. rifampicin, pregnenolon-16 α -karbonitril (PCN), fenobarbital a dexametason. Mezi jaderné receptory patří i **PPAR** („peroxisome proliferator-activated receptor“), který je zodpovědný za regulaci indukce rodiny cytochromu P450 4A. Vhodným ligandem jsou léčiva diabetu II. typu (substituované deriváty sulfonfylmočoviny)^(37, 84). Existují ještě další jaderné receptory a to: **GR** („glucocorticoid receptor“) a **RXR** („retinoid receptor“). Jaderný receptor obsahuje dvě domény, a to DNA vazebnou doménu (DBD – „DNA binding domain“) a ligand vazebnou doménu (LBD – „ligand binding domain“).

1.4 Peroxidasy

Peroxidasy (donor:hydrogenperoxid oxidoreduktasy, EC 1.11.1) jsou enzymy, které katalyzují oxidoredukční reakce. Peroxidy (peroxid vodíku a/nebo organické hydroperoxydy) jsou peroxidasami redukovány za současné oxidace další sloučeniny (endogenní či xenobiotika). Společnou funkcí pro všechny peroxidasy je tedy schopnost rozkládat H₂O₂. Spektrum látek, které se podílejí na detoxikaci H₂O₂, je značně široké, avšak mezi látky nejlépe přeměňované se řadí fenoly a aromatické aminy. Svou širokou substrátovou specifitou se peroxidasy blíží MFO systému obsahujícímu cytochrom P450^(106, 158).

Peroxidasy mají typickou vlastnost katalyzovat velké množství různých typů reakcí:

- *klasické peroxidasové redoxní reakce* (vedoucí k dehydrogenaci)

- *halogenace a dehalogenace* (halogenperoxidasy, thyroid peroxidasa)
- *oxidace halogenidů* (myeloperoxidasa)
- *oxidační kondenzace aromatických aminů*
- *oxidační polykondenzace fenolu a jeho derivátů* (vznik ligninu)
- *dekarboxylační reakce* (např. dekarboxylace kyseliny indolyloctové)
- *oxidační štěpení azoskupiny* (vznik diazoniového iontu)
- *disproporcionace peroxidu vodíku* (peroxidasy, katalasa-peroxidasa)
- *oxygenace, hydroxylace*
- *N- a O-demethylace*⁽⁷⁷⁾

1.4.1 Klasifikace a charakterizace peroxidas

Názvosloví jednotlivých enzymů je tvořeno několika způsoby:

- *podle zdroje*, kde se vyskytují (křenová peroxidasa, myeloperoxidasa, laktoperoxidasa)
- *podle přeměňovaného substrátu* (halogenperoxidasa)
- *podle vznikajícího produktu* (prostaglandin endoperoxid synthasa)

Peroxidasy se dělí do dvou základních superrodin, a to na **superrodinu rostlinných peroxidas** a **superrodinu živočišných peroxidas**. Na základě sekvenční homologie, Welinder navrhla rozdělení superrodiny rostlinných peroxidas do tří tříd: **třída I** – intracelulární peroxidasy prokaryotického původu, **třída II** – intracelulární peroxidasy hub, **třída III** – sekreční rostlinné peroxidasy⁽¹⁸⁴⁾.

Dělení peroxidas dle struktury

Jiné dělení peroxidas vychází z jejich struktury. Peroxidasy jsou většinou **hemoglykoproteiny**⁽¹¹⁷⁾, jejichž prosthetickou skupinu tvoří převážně **ferriprotoporfyrin IX**. Železo této skupiny je pentakoordinované^(153, 152), přičemž pátý ligand tvoří dusík histidylového zbytku proteinové části enzymu. Porfyrinový skelet ale může být v peroxidasách pozmeněn, nebo dokonce chybět. V takových peroxidasách jsou přítomny například **ionty manganu** (Mn^{2+}) nebo **vanadu** (V^{5+})⁽¹¹⁷⁾. Právě podle charakteru aktivního místa jsou peroxidasy členěny do tří skupin na:

- **hemové peroxidasy** (nejpočetnější)
- **vanadové peroxidasy**
- **ostatní peroxidasy**

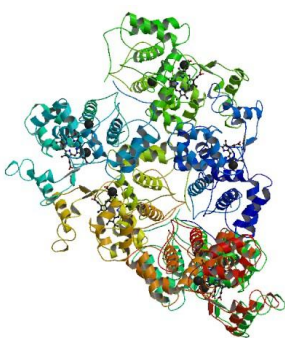
Obsah sacharidů se u jednotlivých peroxidas značně liší. Relativní molekulová hmotnost funkční peroxidasy se pohybuje v rozmezí 42 - 150 kDa⁽¹¹⁷⁾.

O peroxidasach je obecně známo, že se vyskytují ve **velkém množství forem** (pravděpodobně isoenzymů). Příkladem může být křenová peroxidasa, která se vyskytuje ve čtrnácti formách, laktoperoxidasa v šesti až deseti, myeloperoxidasa ve třech^(117,61). Jedná-li se skutečně o isoenzymy, které jsou dány i geneticky podmíněnými rozdíly v primární sekvenci aminokyselin nebo pouhé formy, vzniklé posttranslačními modifikacemi, není známo. Uvažuje se též o tom, nejedná-li se i o arteficiální rozdíly způsobené extrakcí, izolací či stanovením⁽²³⁾.

1.4.2 Rostlinné peroxidasy

Do **I třídy** patří například kvasinková cytochrom c peroxidasa, bakteriální katalasa-peroxidasa. Peroxidasy, které patří do této třídy, neobsahují disulfidové můstky, sacharidy, Ca^{2+} ani signální peptid pro sekreci. Ačkoliv jsou peroxidasy II. a III. třídy odlišně lokalizovány, obsahují cysteylové zbytky a tvoří tak disulfidové můstky (zajištění stability proteinu)⁽¹⁸⁴⁾, signální peptid pro sekreci⁽¹⁸⁴⁾, 2 Ca^{2+} , které jsou nezbytné pro správné strukturní uspořádání v okolí hemu⁽¹⁶⁾ a na povrchu jsou glykosylovány⁽¹⁸⁴⁾. Peroxidasy hub (třída II), až na jednu výjimku (1 isoenzym ligninperoxidasa), neobsahují tyrosylové zbytky. Do třídy **II** řadíme například lignin peroxidasu, do třídy **III** patří asi nejznámější a nejprostudovanější křenová peroxidasa (HRP). Porovnání aminokyselinové sekvence ukazuje, že hemové peroxidasy rostlin, hub a bakterií jsou evolučně příbuzné⁽¹⁸⁴⁾.

1.4.2.1 Křenová peroxidasa (HRP)



Obr. 9 Struktura HRP, převzato z⁽⁶⁸⁾

Křenová peroxidasa je jednou z nejprostudovanějších peroxidas. Vyskytuje se ve čtrnácti formách^(117, 61). Zatím bylo identifikováno 5 genů, kódujících isoenzymy HRP a byla určena jejich sekvenci homologie⁽⁴⁸⁾. **Isoenzym C křenové peroxidasy (HRP C)** převažuje svým množstvím mezi isoenzymy peroxidasy izolované z kořenu křenu selského. Enzym obsahuje **heminovou prosthetickou skupinu, 2 ionty Ca^{2+} a sacharidovou složku**, která tvoří až 30 % molekulové hmotnosti (experimentálně určená molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 40 000 – 45 900 Da^(146, 126)). Sacharidová složka je tvořena 8 N-glykosidicky vázanými oligosacharidovými řetězci⁽¹⁸⁶⁾, přičemž každý obsahuje zbytky Fuc, Xyl, Man, GlcNac. Jednotlivé sacharidové řetězce jsou navzájem heterogenní⁽²⁷⁾.

Všechna glykosylační místa jsou vně enzymu (tzn. ční vně molekuly) a glykosylace je rozmístěna rovnoměrně po celém povrchu⁽¹⁸⁵⁾.

1.4.3 Živošišné peroxidasy

Jedná se o úzce příbuzné **hemové peroxidasy**, které byly detekovány v žlázách a žlázových sekretech. Příkladem jsou laktoperoxidasa (LPO), thyroid peroxidasa, myeloperoxidasa (MPO) a prostaglandin endoperoxid synthasa (prostaglandin H synthasa, PHS nebo také cyklooxygenasa)⁽³⁹⁾.

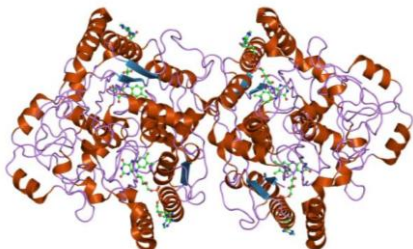
1.4.3.1 Laktoperoxidasa

Laktoperoxidasa (LPO) je glykoprotein s molekulovou hmotností přibližně 78 kDa obsahující hemovou skupinu. Gen pro tento enzym je lokalizován na 17. chromosomu. V přítomnosti peroxidu vodíku katalyzuje přeměnu thiokyanátu (SCN⁻) na HOSCN, který má širokospektré antimikrobiální účinky⁽¹⁷⁴⁾. Laktoperoxidasa se dále může také účastnit degradace katecholaminů, např. noradrenalinu⁽¹⁰⁵⁾. Laktoperoxidasa je produkována žlázami s vnější sekrecí, a to do mléka, slin, slz a dalších biologických sekretů, byla nalezena také v lidském mlezivu⁽⁴⁾.

1.4.3.2 Myeloperoxidasa

Lidská myeloperoxidasa (MPO) je přítomna ve velkém množství v granulech neutrofilů, je také v monocytech, makrofázích, mikroglíích⁽¹³⁶⁾ a neuronech⁽¹¹³⁾. Gen pro tento enzym je lokalizován na 17. chromosomu. Jedná se o tetramerní protein složený ze dvou stejných dimerů, z nichž každý obsahuje hemovou prostetickou skupinu. Myeloperoxidasa se účastní řady redoxních reakcí, které jí umožňují produkovat kyselinu chlornou (HOCl), rozkládat peroxid vodíku na kyslík a vodu, přeměňovat thyroxin a jiné fenoly a aniliny na volné reaktivní radikály a hydroxylovat aromatické substráty aktivitou podobnou cytochromům P450⁽⁸⁶⁾. Klebanoff⁽⁸⁷⁾ jako první ukázal, že myeloperoxidasa vykazuje vysokou antimikrobiální aktivitu díky své schopnosti produkovat kyselinu chlornou uvnitř fagosomů fagocytů, kde reaguje a zabíjí fagocytované bakterie. Fyziologickým substrátem myeloperoxidasy je superoxid.

1.5 NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1, cytosolární enzym katalyzující redukční reakce xenobiotik



Obr. 10 Struktura NQO1, převzato z ⁽⁶⁷⁾

NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1 známá též jako DT-diaforasa, EC 1.6.99.2) je flavoprotein katalyzující dvouelektronové redukce chinonů a chinoidních sloučenin na hydrochinony, a to bez tvorby radikálů⁽¹³⁹⁾. Donorem elektronů pro tyto reakce může být jak NADH, tak i NADPH s totožnou efektivitou⁽¹⁴⁴⁾. Katalytické účinky NQO1 byly poprvé popsány v roce 1958⁽⁴⁴⁾, enzym jako takový byl purifikován a charakterizován v roce 1960⁽⁴³⁾. NQO1 je homodimer, v každém aktivním centru má jednu prosthetickou skupinu (FAD)⁽⁷⁵⁾. Obě identické podjednotky jsou v „head-to-tail“ uspořádání a obě aktivní centra tvoří části těchto podjednotek⁽⁹⁷⁾. Byla také zjištěna významná homologie v sekvenci aminokyselinových zbytků 142 až 158 DT-diaforasy izolované z jaterního cytosolu potkanů a v sekvencích vázajících pyrofosfát v jiných NAD(P)H – dependentních enzimech⁽²⁰⁾.

Toxické efekty chinoidních sloučenin spočívají v jejich kovalentní vazbě na DNA, RNA, proteiny a také v účasti na jednoelektronových oxidačně-redukčních pochodech vedoucích k tvorbě oxidativního stresu, poškození DNA, lipoperoxidaci, membránovému poškození, cytotoxicitě a tvorbě nádorů⁽⁷⁹⁾. Ochranná role tohoto enzymu (NQO1) souvisí s jeho schopností redukovat chinony na hydrochinony a na jeho schopnosti kompetovat s dalšími reduktasami (např. NADPH: CYP oxidoreduktasa), které tvoří reaktivní formy kyslíku při katalyze jednoelektronových redukcí chinonů na semichinony⁽¹⁴⁴⁾. Vzniklé hydrochinony jsou následně inaktivovány UDP-glukuronosyltransferasami^(20,100).

Vedle redukce chinonů může DT-diaforasa rovněž redukovat (a aktivovat) cytostatika (např. mitomycin C nebo tirapazamin – 3-amino-1,2,4-benzotriazen-1,4-dioxid), nebo toxické polutanty jako azobarviva, nitroso- a nitroaromáty^(54, 92, 125, 70). Experimenty prováděné v naší laboratoři (katedra biochemie, PŘF UK Praha) potvrdily, že potkaní

a lidská DT-diaforasa vykazují také nitroreduktasovou aktivitu vůči aristolochovým kyselinám (AA)^(164, 162).

NQO1 je primárně cytosolární enzym, přítomný ve všech tkáních⁽⁹⁹⁾, jeho činnost se ale může značně lišit jak mezi jednotlivci, tak i mezi tkáňovými druhy stejného jedince, a rozdíly jsou i mezi normální a nádorovou tkání⁽¹³³⁾. V nádorových buňkách byla zaznamenána vyšší aktivita NQO1 v porovnání s buňkami zdravé tkáně. Zvýšená aktivita NQO1 byla nalezena v buňkách karcinomu tlustého střeva, jater, plic a prsu, zatímco buňky adenokarcinomu žaludku měly ve srovnání s buňkami zdravé tkáně aktivitu DT-diaforasy nižší^(138, 150). Enzym je neúčinnější v anaerobních podmínkách, které jsou typické pro maligně transformované buňky^(163, 17).

Hlavní cytosolární forma *lidské NQO1* (obsahuje 274 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 30 867 Da) je kódována genem *NQO1* lokalizovaným na chromosomu 16q2.2⁽⁸⁰⁾. V lidské populaci se vyskytují dvě rozdílné alely genu *NQO1*. Vzácnější forma, nazývaná též nulová alela⁽¹⁵¹⁾ kóduje NQO1 se změněnou katalytickou aktivitou. Nález nulové alely genu *NQO1* výrazně zvyšuje riziko vzniku urologických malignit⁽¹⁵¹⁾ a karcinomu plic^(74, 140). Lidská NQO1 je složena ze dvou polypeptidových řetězců. Tyto řetězce jsou identické z hlediska primární struktury, liší se ale na sekundární úrovni (zastoupením α -helixů a β -struktur). Každý řetězec obsahuje výraznou, stočenou antiparalelní strukturu.

Potkaní isoforma DT-diaforasy je složena ze dvou polypeptidových řetězců (stejně jako lidská DT-diaforasa), z nichž každý obsahuje 273 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 30 801 Da. Rovněž její řetězce obsahují výraznou, stočenou antiparalelní strukturu. Řetězec A je složen ze 7 α -helixů a 8 β -struktur, zatímco řetězec B obsahuje 8 α -helixů a 8 β -struktur.

1.5.1 Indukce DT-diaforasy

Schopnost indukovat DT-diaforasu vyazuje mnoho strukturálně odlišných sloučenin⁽⁸⁰⁾, kterými jsou např. polycyklické aromatické uhlovodíky, azobarviva a těžké kovy. Kromě toho může být hladina tohoto enzymu ovlivněna i genetickým polymorfismem. Byly identifikovány dva polymorfismy v genu pro NQO1, jeden je spjat se zvýšeným rizikem uroteliální rakoviny a druhý s dětskou leukémií.

Gen pro NQO1 obsahuje v blízkosti 5' konce transkripční jednotky dva různé regulační elementy. Jsou jimi **ARE** („antioxidant response element“) a **XRE** („xenobiotic response element“), označovaný též jako **AhRE**. U XRE probíhá mechanismus indukce prostřednictvím AhR receptoru, stejně jako v případě CYP1A1⁽¹³⁹⁾. Tímto, pravděpodobně nejdůležitějším mechanismem, stimulují expresi tohoto enzymu PAU a azobarviva⁽³³⁾. Mechanismus indukce zprostředkovaný ARE je zvyšován působením antioxidantů, tumorových promotorů a H₂O₂⁽⁹⁸⁾. XRE obsažen v genu pro NQO1 sdílí značnou signifikantní homologii s XRE v genu pro CYP1A1. Oba geny mohou být indukovány TCDD a polycyklickými aromatickými uhlovodíky, Sudanem I, β-naftoflavonem, butylovaným hydroxytoluenem (BHT), butylovaným hydroxyanisolem (BHA)^(20, 34).

V případě NQO1 existuje ještě další specifický receptor, podílející se na mechanismu indukce. Je jím receptor pro estrogény (ER). Ligandem je např. tamoxifen a transhydroxytamoxifen, patřící do skupiny antiestrogenů⁽¹³⁹⁾.

Jiná skupina induktorů, do níž patří např. terc-buthylhydrochinon, k indukci DT-diaforasy žádný intracelulární receptor nepotřebuje⁽¹⁰⁸⁾.

1.6 Aromatické aminy a aromatické nitrosloučeniny

Významným zdrojem aromatických aminů a nitroaromátů je průmyslová výroba barviv, pesticidů a umělých hmot, kde se vyskytují jako meziproducty. Tyto sloučeniny jsou rovněž významnými polutanty životního prostředí. Byly u nich zjištěny genotoxické a cytotoxické účinky, které jsou většinou potencované při jejich biotransformaci, kdy dochází ke vzniku vysoce reaktivních N-hydroxylovaných sloučenin⁽¹⁴³⁾. Tyto reaktivní sloučeniny jsou při II. fázi biotransformace dále přeměněny na sloučeniny obsahující nitréniový (a karbeniový) ion, které se vážou na DNA⁽⁵¹⁾.

1.6.1 Aromatické aminy

Hlavním zdrojem aromatických aminů je jejich průmyslová výroba. Tvoří také významnou součást cigaretového kouře. Heterocyklické aromatické aminy vznikají pyrolysou aminokyselin nebo proteinů při tepelné úpravě stravy. Aminovou skupinu obsahuje i mnoho léčiv např. lidokain (analgetikum, antiarytmikum). Velké expozici aromatickými aminy jsou vystaveni pracovníci v průmyslu např. barvářského nebo gumárenského, a to při výrobě barviv, pigmentů, fotografických chemikálií a hlavně azobarviv⁽¹⁰²⁾. Aromatické aminy se využívají i v dalších průmyslových odvětvích, kterými

jsou např. textilní a kožedělný průmysl, zpracování gumy, plastů a ropy, tiskařský průmysl a farmaceutický průmysl. Existují ovšem i endogenní zdroje těchto aminů např. serotonin (prekursor melatoninu) a další neurotransmitery a hormony⁽³⁵⁾.

Aromatické aminy jsou středně až extrémně toxické. Mezi hlavní rizika spojená s expozicí těmito látkami patří methemoglobinemie a karcinogeneze⁽¹⁴³⁾. Několik aromatických aminů bylo označeno za mutagenní, a to při použití Amesova testu⁽³⁶⁾. Aromatické aminy vstupují do organismu dýchacím systémem (inhalačně), dále přes gastrointestinální trakt (perorálně) a také kůží (transdermálně). Příčinná souvislost byla pozorována mezi expozicí aromatických aminů a výskytem nádorů močového měchýře a tlustého střeva. U pracovníků v průmyslu vystavených aminům je toto riziko 100 a více násobné⁽¹⁸⁰⁾.

1.6.1.1 Biotransformace aromatických aminů

Detoxikační cesta aromatických aminů v organismu vede v I. fázi biotransformace přes oxidaci atomů uhlíku na aromatickém jádře. Aktivační cesta je zprostředkována N-oxidací, při které vzniká "proximální" karcinogenní derivát⁽⁸¹⁾. MFO systém obsahující **cytochrom P450**, je zodpovědný za N-oxidativní biotransformaci aromatických aminů játrech.

Na přeměně aromatických aminů se cytochromy P450 podílejí různou měrou, a to jak podle isoformy daného cytochromu P450, tak dle struktury metabolizované sloučeniny. Kromě oxidace cytochromy P450 se na **I. fázi biotransformace** aromatických aminů podílejí i další enzymy, kterými jsou **peroxidasy**^(106, 7), a které se vyskytují především mimo jaterní tkáň. V močovém měchýři je zastoupena prostaglandin H synthasa, v mléčné žláze to je laktoperoxidasa, v plicích a krvi pak myeloperoxidasa⁽¹²¹⁾. Jejich funkcí je odstranění elektronu ze substrátu. Tím dochází ke vzniku volného amino kationradikálu. Tyto vzniklé radikály spolu dále reagují disproporcionační či rekombinační reakcí za vzniku chinoniminu, azoderivátů nebo oligomerních produktů. Na N-oxygenaci primárních aminů se malou mírou podílí **Zieglerův enzym**, neboli flavin obsahující monooxygenasa(FMO), který je poměrně hojně zastoupen v plicích. V **II. fázi biotransformace** (konjugační fáze) dochází k dalšímu zvýšení polarity biotransformované sloučeniny. Konjugace aminové skupiny s glutathionem vede ke zvýšení polarity aminoskupiny, a tím i ke snadnějšímu vyloučení xenobiotika z organismu. Tímto mechanismem je zprostředkována detoxikační cesta^(58, 129). Aktivační cesta probíhá

následujícím mechanismem: N-hydroxylovaný arylamin se konjuguje s určitou endogenní kyselinou, za vzniku velmi reaktivních esterů, které se dále rozpadají na reaktivní intermediáty. Příkladem je reakce s acetyl-CoA, kterou katalysují N-acetyltransferasy (NAT1, NAT2), kdy dochází ke vzniku N-acetyloxyarylamínů⁽⁵⁶⁾.

Vysoce reaktivní sloučeniny se tvoří v játrech při konjugaci N-hydroxylovaného arylaminu s PAPS, za katalýzy arylsulfotransferasami. O-sulfatace N-hydroxylovaných arylaminů vede ke vzniku nitreniového a karbeniového iontu⁽¹⁹²⁾.

1.6.2 Aromatické nitrosloučeniny

Hlavní zdroj aromatických nitrosloučenin je v chemickém průmyslu, kde jsou tyto sloučeniny využívány jako meziprodukty při výrobě plastických hmot, polyuretanu, barviv, pesticidů a výbušnin. Aromatické nitrosloučeniny jsou také významnou složkou znečištění životního prostředí. Byly detekovány v ovzduší, půdě a vodě. Aromatické nitrosloučeniny jsou také složkou cigaretového kouře⁽⁵⁹⁾.

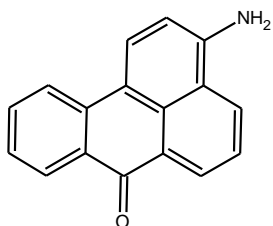
Nadměrná expozice nitroaromátům může resultovat v methemoglobinémii a cyanózu. U velké většiny aromatických nitrosloučenin byla v Amesově testu prokázána mutagenita⁽¹⁹⁾. Aromatické nitrosloučeniny vstupují do organismu podobně jako aromatické aminy inhalačně, perorálně a transdermálně.

1.6.3 3-Nitrobenzanthron, prekurzor 3-ABA

3-nitrobenzanthron, 3-nitro-7H-benz-[d,e,]-anthracen-7on, (3-NBA), polycyklická aromatická nitrosloučenina, je jedním z nejsilnějších mutagenů a potenciálních karcinogenů pro hlodavce. Jeho mutagenita byla prokázána v testu s několika kmeny *Salmonella typhimurium*. Jeho genotoxicita byla rovněž prokázána v řadě testů s potenciálem tvořit adukty s DNA detekovatelné v experimentech *in vitro*, v buněčných kulturách a experimentech *in vivo* (např. laboratorní potkan, myš^(22, 24 85, 6)). 3-NBA se vyskytuje ve složkách životního prostředí a jako součást výfukových plynů dieslových motorů byl prokázán teprve nedávno^(41, 15, 14). Někdy je dokonce označován za „ďábla dieslových motorů“⁽¹⁵⁾. Tvořen je pravděpodobně buď nedokonalým spalováním nafty, nebo reakcí parentálního PAU s oxidy dusíku z atmosféry. Výskyt 3-NBA je však daleko širší. Nedávno byl detekován také v půdě na zemském povrchu a jako součást srážkových vod^(41, 111, 110, 182). Tato sloučenina tedy ohrožuje veliké skupiny lidské populace. Vyšší riziko jeho toxického působení připadá na skupiny působící v pracovním prostředí

některých odvětví. Ohroženi jsou především řidiči z povolání, pracovníci garáží, mechanici či horníci. Jeho redukční metabolit, 3-ABA, byl nalezen v moči pracovníků solných dolů vystavených působení výfukových plynů⁽¹⁴⁵⁾. 3-NBA je potenciálním karcinogenem pro člověka^(41,1, 15, 114).

1.6.4 3-Aminobenzanthron



Jak bylo uvedeno výše, 3-aminobenzanthron (3-amino-7H-benz-[d,e]-anthracen-7-on, 3-ABA), je hlavním redukčním metabolitem 3-NBA, který byl objeven jako metabolit 3-NBA teprve nedávno, a to v moči pracovníků solných dolů⁽¹⁴⁵⁾. Tito pracovníci používají k výkonu svého povolání sbíječky s dieselovými motory, a tím jsou vystaveni vysokým koncentracím uvedených emisí. 3-ABA by proto mohl být označen jako vhodný biomarker pro expozici člověka 3-NBA.

V porovnání s 3-NBA je 3-ABA je méně cytotoxickou sloučeninou, ale zdá se, že by se mohl podílet na modulaci imunitní odpovědi, např. zvýšenou indukci cytokininů^(94,124).

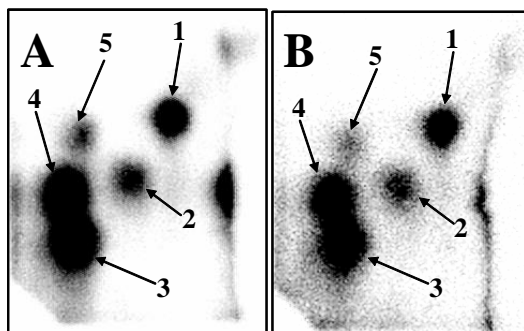
1.6.5 Předpokládaná metabolická aktivace 3-ABA a 3-NBA

Teprve nedávno bylo zjištěno, že všechny procesy metabolické aktivace 3-NBA a 3-ABA jsou v organismu zprostředkovány enzymově katalysovanými reakcemi. Enzymy, které se nejspíše podílejí na metabolické přeměně těchto sloučenin, byly určeny teprve nedávno. Jsou to cytochromy P450 (oxidace 3-ABA na N-hydroxylamin), na redukci 3-NBA na N-hydroxylamin se podílí např. NADPH:CYP oxidoreduktasa, NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1 a xanthinoxidasa^(13, 10, 12).

V případě 3-ABA se na jeho metabolické aktivaci podílí cytochromy P450⁽¹³⁾, které jsou obsaženy v jaterním mikrosomálním systému. Kromě cytochromů P450 se na jeho metabolické aktivaci mohou podílet i další enzymy, které katalyzují oxidační reakce. Takovými enzymy jsou peroxidasy např.: prostaglandin H synthasa⁽¹⁸²⁾, která se hojně vyskytuje v močovém měchýři. Nedávno byly provedeny studie *in vitro* také s dalšími peroxidasami, laktoperoxidasou, myeloperoxidasou a křenovou peroxidasou⁽⁷⁾. Všechny zmíněné enzymy jsou schopné aktivovat 3-ABA za tvorby aduktů s DNA (**Obr. 11, str. 38**).

V metabolických studiích bylo zjištěno, že po enzymové aktivaci 3-ABA dochází k tvorbě takových aduktů s DNA,^(13, 10, 11, 8) které jsou shodné s adukty tvořenými z nitroaromatického prekurzora 3-NBA, tedy z 3-NBA (**Obr. 11**). Adukty byly detekovány metodou ³²P postlabeling⁽¹⁵⁶⁾, a to jak v experimentech *in vitro*^(13, 10, 22, 6, 8, 11, 15, 9, 21, 85), tak i *in vivo*, v různých tkáních laboratorního potkana.

Na obrázku 11 jsou pro ilustraci uvedeny aduktů 3-NBA a 3-ABA po jejich metabolické aktivaci s DNA. Adukty byly detekovány pomocí metody ³²P postlabeling⁽¹³⁰⁾.

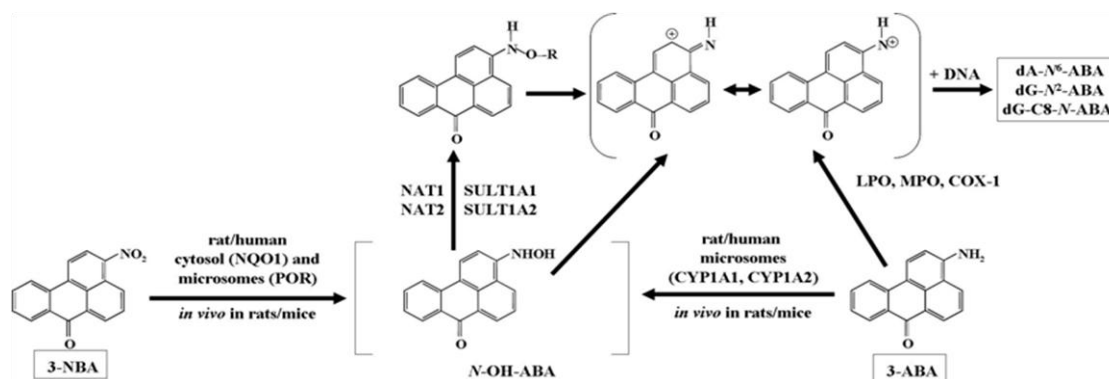


Obr. 11 Autoradiografický snímek aduktů DNA generovaných 3-NBA (A) po aktivaci jaterními cytosoly potkana a na obr. (B) aduktů tvořených po aktivaci 3-ABA jaterními mikrosomy potkana. Použita byla modifikace metody ³²P postlabelingu, (n-butanolová extrakce) Skvrny odpovídají jednotlivým aduktům. Skvrna označená 1 odpovídá aduktu (dA-N⁶-ABA), 2-(2'-deoxyadenosin-N⁶-yl)-3-aminobenzanthron; skvrna 3 odpovídá aduktu (dG-N²-ABA), N-(2'-deoxyguanosin-N²-yl)-3-aminobenzanthron a skvrny 4/5 aduktu (dG-C8-N-ABA), N-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthron⁽¹¹⁾.

Předpokládané schéma metabolické aktivace 3-ABA a 3-NBA je uvedeno na obrázku 12, str. 39⁽⁷⁾. U 3-nitrobenzanthronu lze předpokládat možnost redukce -NO₂ skupiny, proto jeho biotransformace v organismu probíhá zřejmě hlavně redukční cestou. Nitroskupina 3-NBA je redukována na N-OH-ABA (N-hydroxylamin). Tato sloučenina (N-OH-ABA) je vysoce nestabilním intermediátem pro tvorbu elektrofilních nitreniových či karbeniových iontů, které jsou schopné reagovat s nukleofilními centry na molekule DNA za tvorby aduktů. Tvorbu nitreniového iontu zvyšuje konjugace s aktivním sulfátem nebo acetátem.

Hydroxylamin, může být dále redukován a vzniká 3-aminobenzanthron. Tato aromatická aminosloučenina může být naopak oxidována a vzniká zpět hydroxylamin.

U 3-aminobenzanthronu je naopak předpokládána oxidační metabolická cesta, zprostředkovaná cytochromy P450, a to především isoformami 1A1 a 1A2, nebo peroxidasami.



Obr. 12 Předpokládaná metabolická aktivace 3-ABA a tvorba DNA aduktů z aktivovaného 3-NBA a 3-ABA, upraveno a převzato z⁽⁷⁾ HRP, křenová peroxidasa; LPO, laktoperoxidasa; MPO, myeloperoxidasa; SULT, sulfotransferasa; NAT, N-acetyltransferasa; PHS, prostaglandin H synthasa. R = -COCH₃ nebo -SO₃H; dA-N⁶-ABA, 2-(2'-deoxyadenosin-N⁶-yl)-3-aminobenzanthron; dG-N²-ABA, N-(2'-deoxyguanosin-N²-yl)-3-aminobenzanthron; dG-C8-N-ABA, N-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthron.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem disertační práce bylo studium metabolické aktivace 3-nitrobenzanthronu a jeho metabolitu 3-aminobenzanthronu. Cílem práce bylo i studium potenciálu obou sloučenin indukovat biotransformační enzymy, které participují na jejich metabolismu. V rámci disertační práce byly řešeny následující problematiky:

Studium metabolismus 3-aminobenzanthronu cytochromy P450 jaterních mikrosomů potkanů a určení majoritních cytochromů P450 oxidujících 3-aminobenzanthronu v těchto subcelulárních systémech

Cílem této studie bylo zjistit, které cytochromy P450 participují na metabolismu 3-aminobenzanthronu. K řešení této části práce byly užity mikrosomy izolované z jater potkanů kontrolních a premedikovaných induktory cytochromů P450. Pro daný cíl bylo využito rovněž selektivních inhibitorů cytochromů P450. U mikrosomálních systémů nejúčinnějších v oxidaci 3-aminobenzanthronu pak byla studována i kinetika oxidace této sloučeniny. K provedení těchto experimentů bylo předem nutné příslušné mikrosomy z jater experimentálních zvířat izolovat.

Studium metabolismus 3-aminobenzanthronu rekombinantními cytochromy P450

Cílem této části práce bylo identifikovat potkaní a lidské cytochromy P450 participující na oxidaci 3-aminobenzanthronu a poznat efektivitu těchto rekombinantních cytochromů P450 v jeho oxidaci. U cytochromů P450 nejúčinnějších v oxidaci 3-aminobenzanthronu pak byla studovány i kinetiky oxidace této sloučeniny.

Poznání metabolismus 3-aminobenzanthronu peroxidasami

Cílem těchto experimentů bylo zjistit, zda je 3-aminobenzanthron oxidován také peroxidasami. Ke studiu oxidace byly použity rostlinné a živočišné peroxidasy (křenová, myeloperoidasa a laktoperoidasa). U křenové peroxidasy pak byla studována kinetika oxidace 3-aminobenzanthronu.

Studium indukčního potenciálu 3-nitrobenzanthronu na expresi biotransformačních enzymů po intraperitoneální premedikaci potkanů

Cílem těchto experimentů bylo zjistit, zda v ledvinné a plicní tkáni potkanů kmene Wistar, vystavených intraperitoneálnímu působení 3-nitrobenzanthronu dochází ke změnám v obsahu a aktivitách vybraných biotransformačních enzymů, participujících na jeho metabolismu. Jmenovitě NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromu P450 1A1. Účelem bylo zjistit, zda 3-nitrobenzanthron samotný ovlivňuje vlastní aktivační metabolismus, který vede k tvorbě kovalentních aduktů s DNA a objasnit, zda moduluje i aktivaci svého redukčního metabolitu 3-aminobenzanthronu.

Studium indukčního potenciálu 3-aminobenzanthronu na expresi biotransformačních enzymů po intraperitoneální premedikaci potkanů

Vedle vlivu 3-NBA na indukci a aktivity biotransformačních enzymů bylo cílem těchto experimentů zjistit, zda působením jeho redukčního metabolitu, 3-aminobenzanthronu dochází, po intraperitoneální premedikaci v ledvinné a plicní tkáni potkanů kmene Wistar, ke změnám v obsahu a aktivitách NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromu P450 1A1. Účelem bylo rovněž zjistit, zda 3-aminobenzanthron ovlivňuje vlastní aktivační metabolismus, vedoucí k tvorbě kovalentních aduktů s DNA a sledovat, zda dochází k aktivaci jeho prekursoru, 3-nitrobenzanthronu.

Studium indukčního potenciálu 3-nitrobenzanthronu na expresi biotransformačních enzymů po jeho aplikaci potkanům intratracheální instilací

Cílem této studie bylo zjistit, zda 3-nitrobenzanthron vykazuje potenciál měnit hladiny a aktivity výše uvedených biotransformačních enzymů, jmenovitě NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromů P450 1A1/2, v jaterní, ledvinné a plicní tkáni potkana po intratracheální instilaci 3-NBA. Intratracheální instilace má totiž nejbližší k přirozené expozici lidské populace karcinogennímu 3-nitrobenzanthronu. Vedle indukčního potenciálu 3-nitrobenzanthronu byl také studován jeho vliv na metabolickou aktivaci jak vlastního 3-nitrobenzanthronu, tak 3-aminobenzanthronu za tvorby aduktů s DNA.

3 MATERIÁL A METODY

Většina metod používaných při vypracování předkládané disertační práce je popsána v publikacích, které tvoří součást práce a jsou uvedeny jako přílohy 1-6. Pro větší přehlednost a detailnější znalost jsou však některé z metod, a také i použitý materiál, chemikálie a přístroje uvedeny v této kapitole disertační práce.

3.1 Použitý materiál a chemikálie

Chemikálie a materiál použitý v experimentech, pocházejí z následujících zdrojů:

British Drug House, Velká Británie

Sudan I

Firma Kulich, Česká republika

fenobarbital sodný

Fluka, Švýcarsko

dodecylsulfát sodný (SDS), 2-merkaptoethanol, methanol, tokoferol (vitamin E), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), cytochrom c

Gentest , USA

Supersomy™

Chemopetrol, Česká republika

suchý led

Lachema Brno / Lach-Ner, Česká republika

aceton, bromfenolová modř, dekahydrát uhličitanu sodného, dihydrát dihydrogen fosforečnanu sodného, (di)hydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan sodný, dithioničitan sodný, ethanol, ethylacetát, glycin, glycerol, hydrogenuhličitan sodný, hydroxid draselný, hydroxid sodný, chlorid draselný, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, methanol, pentahydrát síranu měďnatého, uhličitan sodný, vinan sodný

Linde, Česká republika

kapalný dusík, oxid uhelnatý

Merk, Německo

acetonitril, ethylacetát, menadion

Millipore Corp., USA

ImmobilonTM-P transfer membrána (PVDF)

Serva, Německo

coomassie Brilliant Blue R-250, N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin (TEMED),
akrylamid, N,N- methylen-bisakrylamid

Setuza a.s., Česká Republika

Vegetol, slunečnicový olej

Sevapharma, a.s, Česká republika

hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma, USA

5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT),
7-O-methoxyresorufin, 7-O-ethoxyresorufin, buthanol, 4,4'-dikarboxy-2,2'-
bicinchoninová kyselina (BCA), akrylamid, β -naftoflavon (β -NF), BSA,
diamantan, diethyldithiokarbamát (DDTC), dimethylsulfoxid (DMSO), fenacetin,
ketokonazol, králičí protilátka IgY značená alkalickou fosfatasou, kuřecí
protilátka IgY značená alkalickou fosfatasou, králičí protilátka proti NQO1,
nikotinamidadenin dinukleotid fosfát (NADPH), nikotinamidadenin-dinukleotid
(NADH), pregnenolon-16 α -karbonitril (PCN), resorufin, standardy pro
polyakrylamidovou gelovou elektroforesu v prostředí SDS „Wide range“,
standard pro western blot Color BURST, sulfafenazol

Wathman, USA

Papír na „Western blotting“, Číslo 3

PML, Česká Republika

Sušené mléko Laktino

Velaz, Česká republika

laboratorní potkani kmene Wistar

3-aminobenzanthron, 3-nitrobenzanthron a *N*-OH-3-aminobenzanthron byly

připraveny v Německém centru pro výzkum rakoviny v Heidelbergu, postupem popsáním v práci Arlta a spol⁽⁸⁾.

Kuřecí protilátky proti potkaní CYP1A1 a CYP1A2 byly připraveny Prof. Petrem Hodkem CSc., PřF UK, katedra biochemie.

3.2 Použité přístroje

Centrifugy:

Centrifuga MLW T52.2 (Německo), Janetzki K23 (Německo), Janetzki K24 (Německo), Sanyo Micro Centaur MSE (Velká Británie), Spectrafuge Mini Centrifuge Labnet International (USA), Ultracentrifuga: Beckman Coulter, Optima – LE-80K (USA),

Váhy:

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

Spektrofotometry:

Hewlett Packard E8453 (USA), SPECORD M40 Carl-Zeiss Jena (Německo), Spektromom 195D (MOM) (Maďarsko), Fluorimetr Perkin-Elmer Luminiscence Spectromether LS55 (USA)

HPLC systém:

pumpa: DIONEX PUMP P580, termokomora pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101, ASI- 100 Automated Sampler Injector, detektor UV/VIS UVD 170S/340S (USA), kolona Macherey–Nagel CC 250/4 NUCLEOSIL 100-5 C18 HD (Německo). Předkolona Macherey-Nagel CC8/4 nucleosil 100-5 c18 1Pkg/3Stk, program CHROMELEON™ 6.01

Sada pro elektroforézu a imunoblot

MiniVE Vertical complete electrophoresis system, Amersham Biosciencis Corp. (USA); zdroj Amersham pharmacia Biotech, Whatman Biometra Fastblot B43, Biometra (Německo)

Další přístroje:

pH metr ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (USA) (kalibrace přístroje pomocí standardů Hamilton (Švýcarsko)); magnetická míchačka KMO2 basic, IKA (Německo); dotyková míchačka IKA Vortex, Genius 3 (Německo); Minishaker 1 IKA (Německo); Microshaker typ ML-1, sonikátor Elmasonic E 30H, Elma (Německo); termostatovaná vodní lázeň Julabo TW8, Julabo Labortechnik (Německo); vakuová odparka SpeedVac DNA 110, Savant (USA); inkubátor Thermomixer Compact Eppendorf 5350 (Německo); Inkubátor G24-Environmental New Brunswick Scientific Co. Inc (USA); třepačka OS 2 basic Yellow line, IKA (Německo); automatické pipety: BIOHIT (Finsko), Nichiryo NICHIPET EX (Japonsko); Hamiltonova mikropipeta (Švýcarsko); Potterův-Elvehjemův homogenizátor

3.3 Premedikace laboratorních potkanů

K premedikaci za účelem indukce cytochromů P450 byli použiti samci laboratorních potkanů kmene Wistar o hmotnosti 150 až 200 gramů, kteří byli drženi při teplotě 22 ± 2 °C. Voda a granulovaná strava jim byly podávány *ad libitum*. Případná premedikace byla zahájena po zhruba týdenní aklimatizaci. Den před zabitím byla potkanům odebrána strava. Chov zvířat a studie na nich prováděné byly v souladu s Vyhláškou Ministerstva zemědělství o chovu a využití pokusných zvířat (č. 311/1997 Sb.), novelizovanou Vyhláškou Ministerstva zemědělství o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat (č. 207/2004 Sb.) a Zákonu na ochranu zvířat proti týrání (409/2008 Sb.).

Premedikace potkanů ***β-naftoflavonem*** probíhala intraperitoneálně, po dobu tří za sebou následujících dnů v dávkách 60 mg/kg, *β*-naftoflavon byl rozpuštěn v rostlinném oleji Vegetol (4 mg/ml). Premedikace potkanů ***fenobarbitalem*** probíhala perorálně. Samci potkanů byli premedikováni 0,1% roztokem fenobarbitalu, který jim byl podáván rozpuštěný ve vodě, ke které měli přístup *ad libitum*. Premedikace probíhala po dobu sedmi dní. Premedikace ***pregnenolon-16-α-karbonitrilem*** probíhala intubačně 5 mg/ml PCN v oleji v pěti dávkách po 1 ml v 12 hod intervalech. Premedikace ***ethanolem*** probíhala perorálně, potkani byli premedikováni 10% roztokem ethanolu v pitné vodě, ke které měli přístup *ad libitum*. Premedikace probíhala po dobu sedmi dní.

Premedikace 3-NBA a 3-ABA probíhala intraperitoneální jednorázovou aplikací 0,4, 4 a 40 mg 3-NBA nebo 3-ABA/ kg hmotnosti zvířete. 3-NBA a 3-ABA byl rozpuštěn ve slunečnicovém oleji. Při intratracheální instilaci 3-NBA byly užity samice potkanů kmene Sprague-Dawley. Byly aplikovány dávky 0,2 a 2 mg/kg hmotnosti zvířete. Premedikace zvířat byla prováděna v Německém centru výzkumu rakoviny postupem, který je detailně popsán v příloze 6 této práce (rukopis v přípravě). Kontrolním potkanům bylo podáno pouze rozpouštědlo (tricaprylin).

3.4 Izolace mikrosomů a cytosolů z jaterní, ledvinné a plicní tkáně laboratorního potkana

Mikrosomy byly z jater, plic a ledvin potkanů premedikovaných vybranými induktory cytochromů P450 či 3-NBA nebo 3-ABA a potkanů nepremedikovaných izolovány frakční centrifugací podle Stiborové a spol.^(160, 161). Kontrolním skupinám potkanů bylo podáváno pouze rozpouštědlo.

3.5 Metody stanovení koncentrací a aktivit vybraných enzymů

3.5.1 Stanovení obsahu cytochromu P450

Principem metody pro stanovení obsahu cytochromu P450 v mikrosomálních preparátech bylo využití charakteristické absorpce komplexu cytochromu P450 v redukovaném stavu s oxidem uhelnatým při 450 nm⁽¹²²⁾. Na základě tohoto jevu se provádělo stanovení koncentrace cytochromu P450 metodou diferenčních spekter⁽⁴⁹⁾ v křemenných kyvetách na dvoupraskovém přístroji Specord M40.

Koncentrace cytochromu byla vypočtena z následujícího vztahu:

$$c_{P450} = A_{450} - A_{490} / \varepsilon_{P450} \cdot \text{ředění} \quad [\mu M]$$

c_{P450}	koncentrace cytochromu P450
A_x	absorbance při vlnové délce x nm
ε_{P450}	molární absorpční koeficient cytochromu P450; ($\varepsilon = 0,091 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$)

3.5.2 Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Wiechelmana⁽¹⁸⁹⁾

Koncentrace proteinů v izolovaných mikrosomálních frakcích byla stanovena metodou dle Wiechelmana a kol.⁽¹⁸⁹⁾. Při tomto stanovení se využívá tvorby modře zbarveného komplexu měďných iontů s 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchinovou kyselinou (BCA) v alkalickém prostředí. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA). Modré zabarvení, odpovídající koncentraci bílkoviny bylo stanoveno spektrofotometricky (A_{562}) na spektrofotometru MOM 195D.

3.5.3 Stanovení aktivity CYP1A1 oxidací Sudanu I

Oxidace Sudanu I byla měřena metodou vyvinutou V. Martínkem⁽¹⁶⁶⁾. Tato metoda využívá schopnosti CYP1A1 oxidovat Sudan I na tři metabolity. Separace vzniklých metabolitů probíhá na HPLC s reverzní fází. Aktivita CYP1A1 odpovídá ploše integrovaných píků jednotlivých produktů oxidace Sudanu I (4',6 -di-OH derivát Sudanu I, 6-OH-Sudanu I a 4'-OH-Sudanu I). Vyhodnocení ploch „píků“ jednotlivých metabolitů bylo provedeno programem ChromeleonTM. Jelikož je Sudan I, jako modelový substrát CYP1A1 oxidován také CYP3A1/2 byl do inkubační směsi kontroly přidán ketokonazol, jako inhibitor cytochromů P450 podrodiny 3A, které rovněž Sudan I oxidují⁽¹⁶⁶⁾.

- Složení inkubační směsi 50 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, pH 7,4

500 µl	10 µM Sudan I (5 mM zásobní roztok v MetOH)
	Příslušné mikrosomy premedikované 3-NBA nebo 3-ABA
	v takovém množství, aby výsledná koncentrace v reakční směsi byla 0,5 mg/ml.
	1 mM NADPH (10 mM zásobní roztok)

Inkubační směs kontroly o objemu 500 µl neobsahovala 10 µM Sudan I, ale směs 10 µM Sudan I + 10 µM ketokonazol (zásobní roztok 5 mM Sudanu I + 5 mM Ketokonazol v poměru 1:1)

Nejdříve bylo do skleněných zkumavek nepipetováno vše kromě NADPH, 2 minuty probíhala preinkubace při 37°C ve vodní lázni JULABO, pak byla reakce nastartována přidavkem NADPH. Inkubace probíhala 20 min při 37°C a cca 350 RPM v inkubátoru Environmental incubator shaker G24. Reakce byla zastavena přidavkem 1000 µl ethylacetátu. Extrakce byla prováděna na vortexu, intenzivním třepáním 2000 RPM po dobu 2 minut. Následně byla směs centrifugována na centrifuze MLW T52.2 při 8 000 RPM po dobu 10 minut. Organická fáze, obsahující produkty reakce, byla odebrána a k vodné fázi bylo opět přidáno 1000 µl ethylacetátu. Stejným postupem byla provedena

druhá extrakce. Obě organické fáze byly spojeny a odpařeny do sucha (30 min) na vakuové odparce „Speed Vac“ (DNA 110, firma Savant). Těsně před analýzou byly jednotlivé vzorky rozpuštěny ve 30 μ l methanolu.

Podmínky HPLC:

kolona	C18, 250 x 4 mm, 5 μ m (Nucleosil, Macherey Nagel)
mobilitní fáze	0,1 M NH ₄ HCO ₃ (pH 8,5) a methanol v poměru 1:9.
průtok	0,7 ml/min
nástřik	20 μ l
teplota	35 °C
detekce při vlnové délce	480 nm

3.5.4 Stanovení specifických aktivit pro isoformy cytochromu P450 1A1 a 1A2

K měření byly použity specifické substráty cytochromu P450: 7-ethoxyresorufin a 7-methoxyresorufin. Tyto substráty jsou příslušnými cytochromy P450 dealkylovány na fluorescenční produkt resorufin. O-deethylace 7-ethoxyresorufinu (EROD) pro stanovení CYP1A1/2 a O-demethylace 7-methoxyresorufinu (MROD) pro stanovení CYP1A2 dle Burkeho^(25, 26).

• Reagencie pro fluorimetrické stanovení	100 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 10 μ M zásobní roztok resorufinu v MetOH Příslušné mikrosomy premedikované 3-NBA nebo 3-ABA v takovém množství, aby výsledná koncentrace v reakční směsi byla 0,5mg/ml. 17 μ l NADPH (5 mM zásobní roztok) 0,2 mM 5 μ l 0,2 mM 7 ethoxyresorufinu (v DMSO) nebo 5 μ l 0,2 mM 7-methoxyresorufinu v MetOH
--	--

Ze zásobní reakční směsi o objemu 500 μ l bylo odebráno 445 μ l do mikrozkuhavky eppendorf. K této směsi bylo přidáno buď 5 μ l 0,2 mM 7-ethoxyresorufinu (v DMSO), nebo 5 μ l 0,2 mM 7-methoxyresorufinu v MetOH. Tato reakční směs byla inkubována 2 minuty za laboratorní teploty, z mikrozkuhovek eppendorf bylo vždy odebráno 150 μ l reakční směsi a aplikováno do jamky na 96-jamkové mikrotitrační destičce. Reakce byla startována přidáním 17 μ l NADPH (zásobní roztok 5 mM NADPH). Samotná reakce probíhala ve quadrupletech od každého vzorku, navíc byl ke každému vzorku připraven i vlastní „blank“ (bez NADPH). Při tomto aktivním stanovení byla měřena fluorescence vznikajícího resorufinu v inkubačních

směsí a jejich příslušných „blanků“ na přístroji Luminiscence Spectrometer Perkin Elmer LS-55. Každý vzorek byl proměřen 11 cykly, doba trvání jednoho cyklu byla 60 sec. Kalibrační křivka byla sestrojena s resorufinu jako standardu (10 μM zásobní roztok v MetOH, rozsah kalibrace 1,875; 3,75; 7,5; 15; 22,5; 30; 45 a 60 pmol resorufinu/jamku)

Fluorimetrické měření:	$\lambda_{\text{excitace}} = 530 \text{ nm}$, excit. štěrba 15
	$\lambda_{\text{emis}} = 585 \text{ nm}$, emis. štěrba 10

Z výsledných hodnot bylo pro každou inkubační směs vypočítáno látkové množství v jednotkách pmol vznikajícího resorufinu za min na mg proteinu jaterní mikrosomální frakce (pmol/min/mg prot.).

3.5.5 Stanovení aktivity NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 (NQO1)

Ke stanovení NQO1 byly použity dvě metody popsané Larsem Ernsterem⁽⁴²⁾ Jedna využívá sledování úbytku koncentrace kofaktoru, NADPH, měřená při 340 nm za přítomnosti substrátu enzymu, menadionu. Detailně je tato metoda popsána v publikacích, které tvoří součást této disertační práce jako přílohy 2 a 4. Druhá metoda je založená na sprážením redukce menadionu s redox reakcemi cytochromu c, na principu měření úbytku cytochromu c v důsledku jeho redukce při 550 nm. Tato metoda je využívána při nízkých koncentracích NQO1 ve vzorcích, neboť je více než 10-ti násobně účinnější. Použili jsme ji při stanovení aktivit NQO1 uvedených v kapitole 4.4.3, kde byly využívány cytosoly potkanů Speague-Dawley.

Reakční směs o objemu 1000 μl obsahovala:	25 mM TrisHCl, pH 7,5
	200 μM NADH (20 mM zásobní roztok)
	10 μM menadion (5 mM zásobní roztok v MetOH)
	77 μM cytochrom c (3,85 mM zásobní roztok)
	0,14% BSA (3,5% zásobní roztok)
	20 μl vzorku

Všechny reakční komponenty, kromě vzorku cytosolu, byly pipetovány přímo do kyvety. Nejdříve byl v programu Kinetics na spektrofotometru Helwett Packard při 550 nm proměřen „blank“, poté byla reakce startována přidávkem stanovovaného vzorku cytosolu. Kinetika byla proměřována po dobu 2 minut. Ze získaných hodnot ΔA byla vypočtena aktivita a specifická aktivita NQO1 stanovovaných mikrosomů.

$$\text{aktivita} = (\Delta A / \varepsilon * l * t) * \text{ředění}$$

molární absorpční koeficient cytochromu c $\varepsilon = 18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
 l – délka kyvety (1 cm)
 t – doba měření (2 minuty)

Jednotky aktivity $\mu\text{mol cytc}/\text{min}$, specifická aktivita byla vztažena na množství proteinu.

3.6 Elektromigrační metody

3.6.1 SDS elektroforéza

Elektroforéza mikrosomálních proteinů v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) byla prováděna na polyakrylamidovém gelu v diskontinuálním uspořádání za použití 10 % nebo 8% separačního a 3 % zaostřovacího gelu⁽⁹³⁾. Elektromigrace probíhala ve vertikálním uspořádání v aparatuře MiniVE Amersham Biosciencis Corp. při pH=8,3 a při počátečním napětí 80 V pro průchod zaostřovacím gelem, které bylo po 30 minutách zvýšeno na 150 V. Gely byly obarveny coomasie brilliant blue.

3.6.2 Metoda „Western blotting“

Při metodě „Western blotting“ byl gel po skončení elektroforézy 20 minut inkubován v „*transferovém pufru*“ (0,025 M TRIS, 0,192 M glycin, 10% MetOH, pH 8,3). Do aparatury pro western blotting Biometra Fast blot B43 byly postupně navrstveny 3 ks chromatografického papíru Whatman 3 (rozměry chromatografického papíru byly o 10% větší než gel), PVDF membrána, gel a to vše překryto dalšími 3 ks chromatografického papíru. Membrány byly „smočeny“ dle údajů výrobce a spolu s chromatografickými papíry také předem ponořeny do transferového pufru. Elektropřenos byl prováděn 50 minut při 3,5 mA/cm² gelu.

3.6.3 Imunochemická detekce CYP1A1, CYP1A2 a NQO1

Membrána se sorbovanými proteiny byla v případě imunodetkce CYP1A1 a CYP1A2 přes noc blokována v „*blokovacím roztoku*“ (5% sušené mléko v PBS (1,8 mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 0,134 M NaCl; pH 7,2), 0,3% Triton X-100) při 6°C. Při imunodetekci NQO1 byla blokace prováděna po dobu 3 hodin.

Inkubace se specifickou slepičí primární protilátkou proti CYP1A1 a CYP1A2 (anti CYP1A1 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a anti CYP1A2 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ „blokovacího roztoku“) probíhala 120 minut za třepání při laboratorní teplotě. Obě protilátky o zásobní koncentraci 0,3 mg/ml

byly nejdříve inkubovány přes noc s kouskem lidské kůže, aby došlo k tzv. „vysycení“ protilátky, přesněji řečeno k zablokování vazebných míst pro keratin⁽⁹⁰⁾. Při imunodetekci NQO1 (0,3 µg/ml „blokovacího roztoku“) byla inkubace se specifickou primární protilátkou prováděna přes noc za třepání při teplotě 4°C.

Primární protilátka byla poté odstraněna promytím v „blokovacím roztoku“ (5 x 4 minuty) a následně byla membrána vložena do roztoku se sekundární protilátkou (králíčí IgG proti kuřecí IgY s navázanou alkalickou fosfatou, 7 µl/10 ml „blokovacího roztoku“), kde byla inkubována za laboratorní teploty a za míchání po dobu 60 minut. Po promytí v „blokovacím roztoku“ (4 x 5 minuty) a 0,3%-ním Tritonu v PBS (4 x 5 minuty) byla membrána vložena na 10 minut do destilované vody. K „vyvolání“ byl použit roztok připravený rozpuštěním jedné tablety BCIP/NBT (substrát pro alkalickou fosfatou) v 10 ml Ultra čisté vody Millipore. Reakce byla zastavena vložením membrány do destilované vody. Intenzita vzniklých zón na PVDF membráně, ilustrující množství enzymů, byla kvantifikována programem ELFOMAN 2.0.

3.7 Studium oxidace 3-ABA cytochromy P450

Ke studiu metabolismu 3-ABA byly využity mikrosomální frakce jater potkana izolované z pěti skupin laboratorních potkanů. A to z potkanů: premedikovaných β-naftoflavonem, fenobarbitalem, etanolem, pregenenolon-16-αkarbonitrilem a pátá frakce byla z nepremedikovaných, kontrolních potkanů.

3.7.1 Studium oxidace 3-ABA mikrosomální frakcí potkanů premedikovaných vybranými typy induktorů cytochromů P450

• Složení inkubační směsi:	100 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
500 µl	20 µM 3-ABA (2 mM zásobní roztok rozpuštěný v DMSO) 1 mM NADPH (10 mM zásobní roztok) jaterní mikrosomy potkana* v µl (0,5 mg/ml) *(mikrosomy kontrolní nebo: indukované: β-naftoflavonem, fenobarbitalem, PCN, etanolem)

Postup:

Do inkubační směsi o celkovém objemu 500 µl byl pipetován fosfátový pufr, dále 50 µl 10 mM NADPH (roztok NADPH byl připraven vždy těsně před přípravou inkubační směsi), příslušné mikrosomy potkana v tak, aby výsledná koncentrace proteinu v inkubační směsi byla 0,5 mg/ml. Vše bylo promícháno pipetou a reakční směs byla

startována přidáním 5 μ l 2 mM 3-ABA. Směs byla opět dobře promíchána a inkubována v otevřených mikrozkušavkách v termomixeru eppendorf při 400 RPM po dobu 120 minut při teplotě 37°C.

Reakce byla po přidání 5 μ l 1 mM fenacetinu, jako vnitřního standardu a promíchání na „vortexu“ ukončena přidáním 1000 μ l ethylacetátu. Extrakce do tohoto organického rozpouštědla probíhala následovně: mikrozkušavky byly promíchávány na Microshakeru ML-1 po dobu dvou minut při 2 700 RPM. Následně byla směs centrifugována na centrifuze Micro Centaur při 13 000 RPM po dobu tří minut. Organická fáze, obsahující produkty reakce, byla odebrána a k vodné fázi bylo opět přidáno 1000 μ l ethylacetátu. Stejným postupem byla provedena druhá extrakce.

Obě organické fáze byly spojeny a odpařeny do sucha v digestoři (cca 3-4 hodiny). Odpařené vzorky byly uchovávány v mrazícím boxu při -20°C. Takto byly vždy připraveny 2 paralelní vzorky a ke každé sadě vzorků byla připravena kontrola bez mikrosomů a bez NADPH.

Těsně před analýzou byly odparky vzorků získané extrakcí ethylacetátem rozpuštěny ve 30 μ l methanolu. Produkty reakce byly separovány a kvantifikovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Podmínky HPLC:

kolona	C18, 250 x 4 mm, 5 μ m (Nucleosil, HD, Macherey Nagel)
mobilní fáze	70 % methanol
průtok	0,6 ml/min
nástřik	20 μ l
teplota	35 °C
detekce při vlnové délce	254 nm

3.7.2 Studium časové závislosti oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy

Složení inkubačních směsí a postup byl stejný jako v kap. 3.7.1, až na dobu inkubace, která byla měněna v následujících intervalech: 0, 30, 60, 120 a 180 minut.

3.7.3 Studium kinetiky oxidace 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy potkana

Kinetické studie oxidace 3-ABA mikrosomálními systémy potkana byly prováděny za reakčních podmínek popsanych v kap. 3.7.1. Dle detailní časové závislosti byla zvolena doba inkubace na 5 minut. V této studii byla měněna koncentrace 3-ABA v reakční směsi, a to dle následující škály:

5 μM 3-ABA v reakční směsi (0,5 mM zásobní roztok)
10 μM 3-ABA v reakční směsi (1 mM zásobní roztok)
20 μM 3-ABA v reakční směsi (2 mM zásobní roztok)
30 μM 3-ABA v reakční směsi (3 mM zásobní roztok)
40 μM 3-ABA v reakční směsi (4 mM zásobní roztok)
50 μM 3-ABA v reakční směsi (5 mM zásobní roztok)

Všechny vzorky byly vždy připraveny ve dvou paralelních inkubacích. K nim byl připraven i kontrolní vzorek, který neobsahoval mikrosomy.

3.7.4 Studium inhibice metabolismu 3-ABA specifickými inhibitory cytochromu P450

Inkubační směs o objemu 500 μl byla připravena dle reakčních podmínek kapitoly 3.7.1. K reakční směsi byl přidat vždy příslušný inhibitor daných CYP, a to o koncentraci 0,01 – 0,1 mM v reakční směsi, inhibitor byl rozpuštěn v 7,5 μl daného rozpouštědla:

Inhibitor CYP 450	Jaterní mikrosomy potkana	rozpuštědlo
α -naftoflavon (CYP1A1/2)	β -NF- MS (CYP1A1/2)	(metOH: EtAc) 3:2
furafylin (CYP1A2)	β -NF- MS (CYP1A1/2)	ethanol
diamantan (CYP2B)	PB-MS (CYP2B)	ethanol
ketokonazol (CYP 3A1/2)	PCN-MS (CYP 3A1/2)	ethanol
DDTC (CYP2E1)	EtOH-MS (CYP2E1)	H ₂ O
DDTC (CYP2E1)	kontrolní MS	H ₂ O
sulfafenazol (CYP2C)	kontrolní MS	ethanol
ketokonazol (CYP 3A1/2)	kontrolní MS	ethanol

Kontrolou byl vzorek bez inhibitoru. Podmínky HPLC viz kap. 3.7.1.

3.7.5 Studium metabolismu 3-ABA lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450

Inkubační směs o objemu 250 μ l byla připravena dle reakčních podmínek kapitoly 3.7.1, doba inkubace byla 20 minut. Koncentrace jednotlivých supersomů v inkubační směsi byla 50 nmol CYP.

• Složení inkubační směsi: 250 μ l	100 mM KH_2PO_4 , pH 7,4
	20 μ M 3-ABA (2 mM zásobní roztok rozpuštěný v DMSO)
	1 mM NADPH (10 mM zásobní roztok)
	potkaní/lidské rekombinantí Supersomy v μ l (50 nmol CYP)

Před koncem reakce byl do reakční směsi přidán 1mM fenacetin (2,5 μ l). Extrakce byla provedena 2 krát přidáním 500 μ l ethylacetátu. Separace na HPLC probíhala za stejných podmínek, jak je uvedeno v kap. 3.7.1.

3.7.6 Studium kinetiky oxidace 3-ABA lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450

Kinetické studie oxidace 3-ABA rekombinantními CYP byly prováděny za reakčních podmínek popsaných v kap. 3.7.1. Dle detailní časové závislosti byla pro jednotlivé isoformy CYP zvolena optimální doba inkubace:

Typ cytochromu P450	Doba inkubace [min]
lidský CYP1A1	20
lidský CYP1A1+b ₅	20
lidský CYP3A4	20
lidský CYP3A4+b ₅	20
potkaní CYP1A1	20
potkaní CYP1A1+b ₅	20
potkaní CYP3A1+b ₅	20
potkaní CYP3A2+b ₅	40

V této studii byla měněna koncentrace 3-ABA v reakční směsi, a to dle škály uvedené v kap. 3.7.3 a tato škála koncentrací byla rozšířena o následující koncentrace 3-ABA 60 μ M, 70 μ M, 80 μ M.

3.8 Studium metabolismu 3-ABA peroxidasami

• Složení inkubační směsi:	0,1 M Na-fosfátový pufr, pH 4,5 – 8,4 (směs 0,1 M Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O a 0,1 M NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O)
500 µl	1; 5; 10; nebo 30 µg dané peroxidasy (HRP, LPO, MPO)/500 µl
	2 mM 3-ABA rozpuštěný v DMSO
	40 µM H ₂ O ₂ (1 mM zásobní roztok H ₂ O ₂ , připraven vždy těsně před použitím)

Postup:

Do inkubační směsi o celkovém objemu 500 µl byl pipetován fosfátový pufr, dále 5 µl 2 mM 3-ABA, příslušné peroxidasy v µl tak, aby výsledná koncentrace proteinu v inkubační směsi byla 1, 5 a 10 popřípadě 30 µg/500 µl. Vše bylo promícháno pipetou a reakční směs byla startována přidáním 20 µl 1 mM H₂O₂. Směs byla opět dobře promíchána a inkubována 20 minut při 37°C v termomixeru při 300 RPM. Před koncem inkubace bylo do reakční směsi přidáno 5 µl fenacetinu, jako vnitřní standard a reakce byla ukončena přidáním ethylacetátu, tak jak je uvedeno v kap. 3.7.1 Podmínky separace produktů oxidace na HPLC byly stejné jako v kap. 3.7.1.

3.8.1 Studium kinetiky oxidace 3-ABA křenovou peroxidasou

Reakční podmínky dle kapitoly 3.8. Detailní časovou závislostí byla pro křenovou peroxidasu stanovena optimální doba inkubace na 60 sec. V této studii byla měněna koncentrace 3-ABA v reakční směsi, a to dle škály uvedené v kap. 3.7.3, která byla rozšířena o tyto koncentrace 3-ABA:

60 µM 3-ABA v reakční směsi (6 mM zásobní roztok)
70 µM 3-ABA v reakční směsi (7 mM zásobní roztok)
80 µM 3-ABA v reakční směsi (8 mM zásobní roztok)
100 µM 3-ABA v reakční směsi (10 mM zásobní roztok)

Podmínky separace na HPLC stejné jako v předchozí kapitole.

3.9 Izolace a stanovení mRNA CYP1A1 a NQO1

Izolace mRNA CYP1A1 a NQO1 metodou RT-PCR z tkání potkana premedikovaného intraperitoneálně 3-NBA a 3-ABA byla prováděna RNDr. Helenou Dračínskou, Ph.D. dle postupu doporučeného výrobcem. Detaily, prováděné metody

jsou popsány v citaci ⁽¹⁵⁵⁾ a publikacích, které tvoří součást disertační práce jako *přílohy 2 a 4*.

3.10 Detekce aduktů 3-NBA a 3-ABA s DNA metodou ³²P-postlabeling

Analýzy DNA aduktů byly provedeny školitelkou, Prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc. na spolupracujícím pracovišti Německého centra pro výzkum rakoviny v Heidelbergu metodou „³²P-postlabeling⁽¹⁶⁹⁾“. Detaily, prováděné metody jsou popsány v citaci⁽¹⁶⁹⁾ a publikacích, které tvoří součást disertační práce jako *přílohy 2 a 4*.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Studium metabolismu 3-aminobenzanthronu cytochromy P450

Metabolismus 3-aminobenzanthronu byl v předkládané disertační práci studován v podmínkách *in vitro*, za použití enzymových systémů obsahujících cytochromy P450. Nejdříve to byly subcelulární frakce (mikrosomy), získané z jaterních buněk laboratorního potkana. Mikrosomy byly izolovány z jaterních buněk potkanů premedikovaných induktory jednotlivých cytochromů P450 a rovněž i z potkanů kontrolních (izolované z nepremedikovaných zvířat). Přehled připravených jaterních mikrosomů je uveden v Tabulce 3.

Oxidace 3-aminobenzanthronu byla dále studována také jednotlivými jaterními rekombinantními cytochromy P450, a to jak cytochromy P450 potkaními, tak i lidskými.

Tabulka 3 - Přehled připravených jaterních mikrosomů potkana

Jaterní mikrosomy potkana	Induktor	„Nabohacený“ cytochrom P450
β-NF-MS	β-naftoflavon	1A1/2
PB-MS	Fenobarbital	2B1/2
PCN -MS	Pregnenolon-16α-karbonitril	3A1/2
EtOH- MS	Ethanol	2E1

Mikrosomy kontrolních potkanů (nepremedikovaných) obsahují především následující cytochromy P450: CYP1A2, CYP2C11, CYP2D1, CYP2E1 a CYP3A1⁽⁹⁶⁾

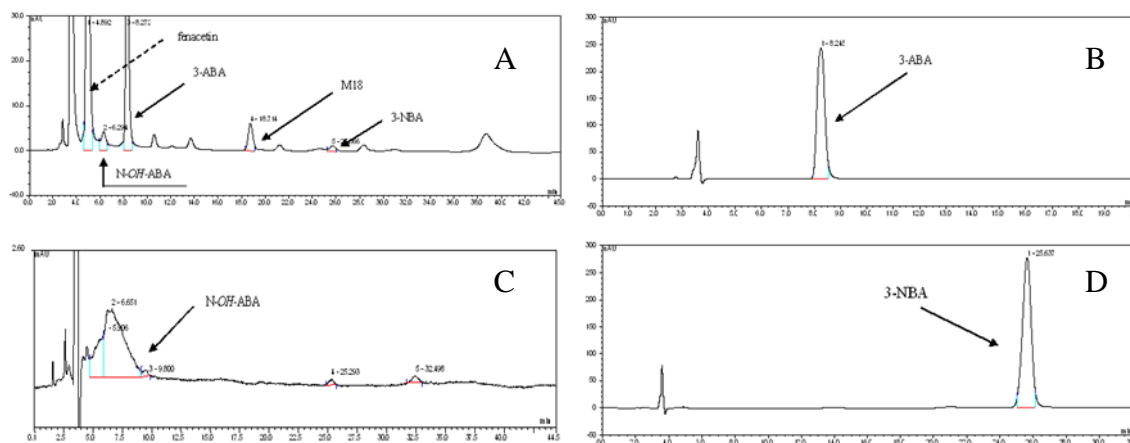
Jednotlivé izolované mikrosomální frakce byly charakterizovány z hlediska koncentrace celkového CYP a koncentrace proteinu (**Tabulka 4**).

Tabulka 4 - Charakterizace používaných jaterních mikrosomů potkana

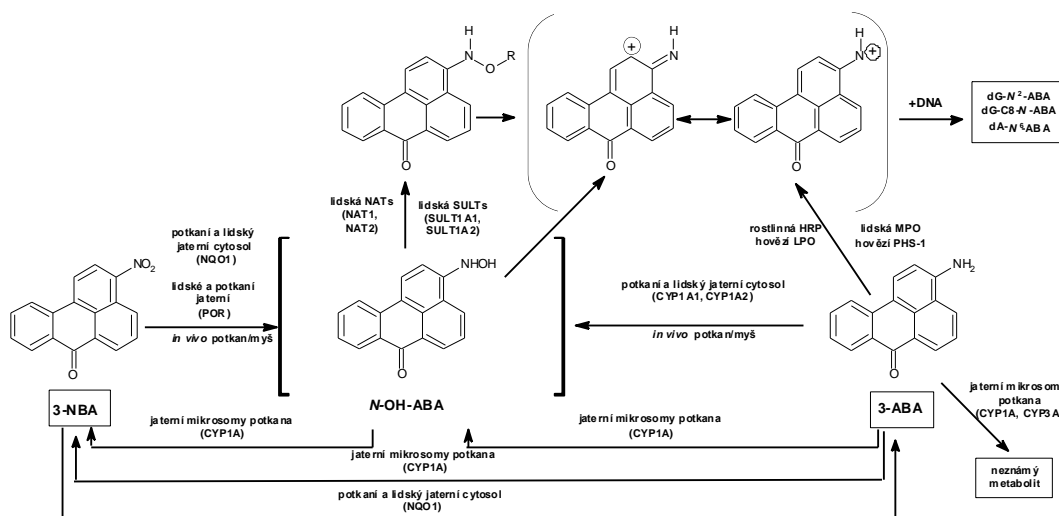
Typ mikrosomů	Koncentrace proteinu [mg/ml]	Koncentrace CYP [μM]	Specifický obsah CYP [nmol/mg]
β-NF-MS	26,3	39,3	1,49
PB-MS	35,1	70,4	2,00
PCN -MS	52,8	65,9	1,25
EtOH- MS	21,5	16,7	0,78
kontrolní MS	29,56	20,5	0,69

Pro separaci a charakterizaci jednotlivých produktů oxidace 3-ABA byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Bylo zjištěno, že cytochromy P450, obsažené v jaterních mikrosomech potkana, oxidují 3-ABA při inkubaci delší než 30 minut

na tři metabolity (**Obr. 13**). Struktura dvou metabolitů byla určena „kromatografií“ se syntetickými standardy. Zjistili jsme, že 3-ABA je cytochromy P450 oxidován zpět na 3-NBA prostřednictvím reaktivního intermediátu *N*-hydroxy-ABA (*N*-OH-3-ABA). Jako první metabolit byl s retenčním časem 6,5 minut eluován *N*-OH-3-ABA, jako druhý metabolit byl eluován 3-nitrobenzanthron, s retenčním časem 25 minut. Struktura třetího metabolitu, označeného jako M18, eluovaného v 18. minutě nebyla dosud charakterizována. Schéma předpokládaného metabolismu 3-ABA a 3-NBA je zobrazeno na obrázku 14, str. 59.



Obr. 13 - HPLC reakční směsi sledující oxidaci 3-ABA mikrosomy potkana indukovaného β -naftoflavonem. Doba inkubace 120 minut, koncentrace 3-ABA v inkubaci 2 mM (A). HPLC standardního vzorku 3-ABA, koncentrace 3-ABA 0,33 μ M (B). HPLC standardního vzorku *N*-hydroxy-3-ABA (C). HPLC standardního vzorku 3-NBA, koncentrace 0,17 μ M (D).

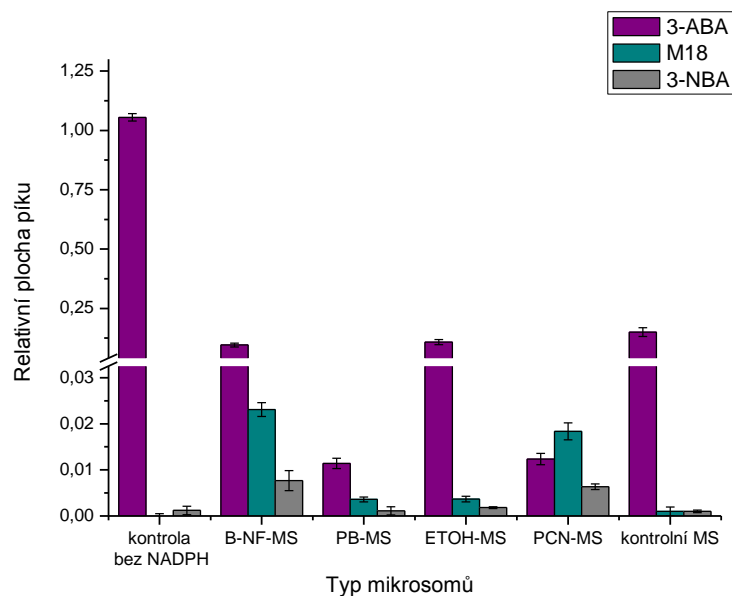


Obr. 14 Schéma předpokládaného metabolismu 3-ABA a 3-NBA a tvorby aduktů tvořených 3-ABA a 3-NBA s DNA. NQO1 (NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1, NAT, N-acetyltransferasa; SULT, sulfotransferasa; PHS-1, prostaglandin H synthasa 1 (cyklooxygenasa 1); CYP, cytochrom P450; LPO, laktoperoxidasa; MPO, myeloperoxidasa; POR, NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa. R = -COCH₃ nebo -SO₃H; dA-N⁶-ABA, 2-(2'-deoxyadenosin-N⁶-yl)-3-aminobenzanthron; dG-N²-ABA, N-(2'-deoxyguanosin-N²-yl)-3-aminobenzanthron; dG-C8-N-ABA, N-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthron.

4.1.1 Oxidace 3-aminobenzanthronu mikrosomální frakcí potkanů premedikovaných vybranými typy induktorů cytochromů P450

Reakční směs pro oxidaci 3-ABA jaterními mikrosomy, byla připravena dle postupu popsaného v *kap. 3.7.1* a metabolity byly separovány pomocí HPLC. Plochy jednotlivých „píků“ byly kvantitativně vyhodnoceny pomocí integrace ploch „píků“ a vztahené na vnitřní standard, fenacetin, (relativní plocha píku). Pro oxidaci 3-ABA byly použity jednotlivé jaterní mikrosomální systémy potkana, jejichž přehled je uveden v Tabulce 4, str. 57.

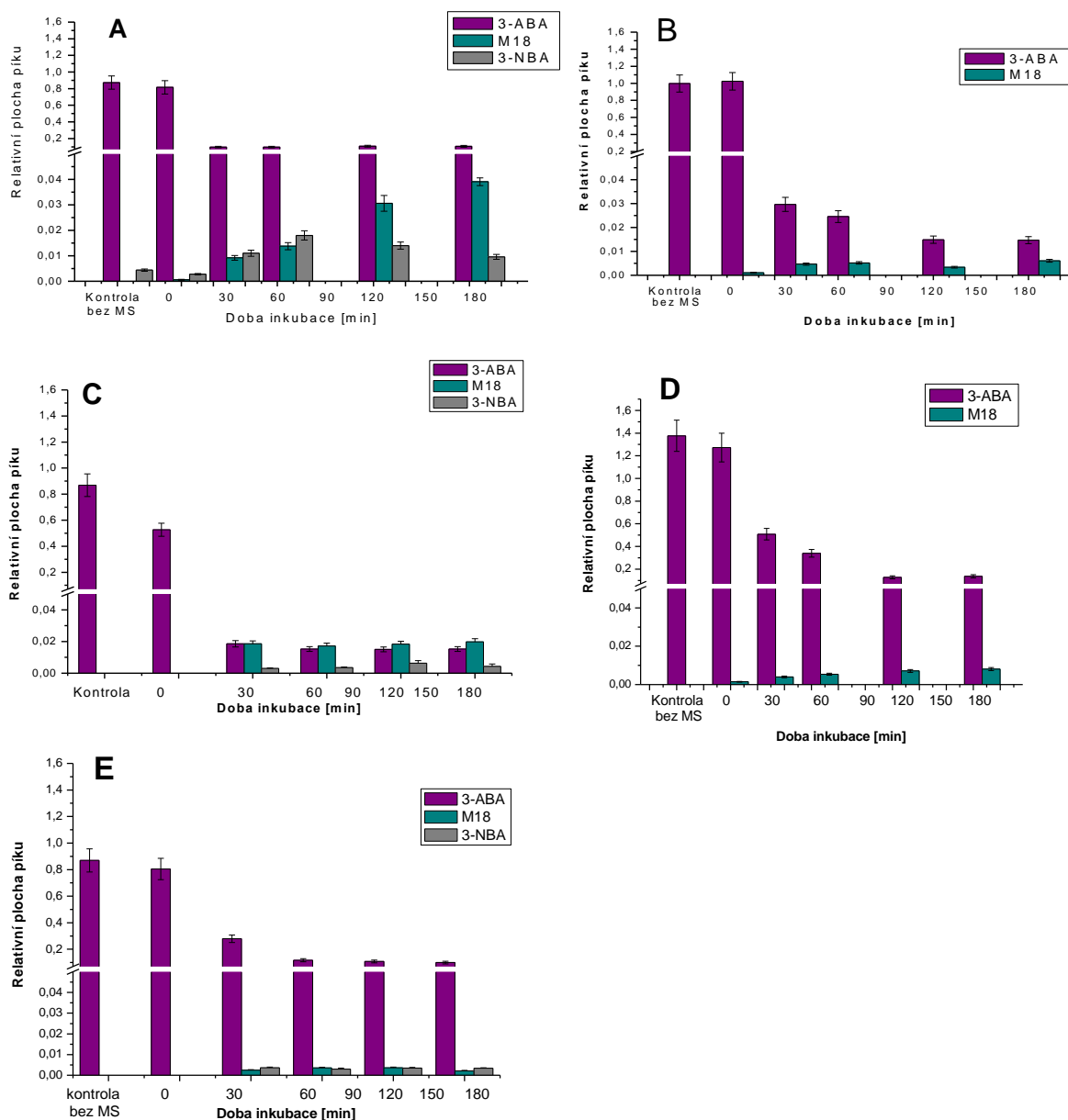
Při porovnání účinnosti vybraných mikrosomálních systémů z hlediska oxidace 3-ABA bylo zjištěno, že nejefektivnějším systémem jsou jaterní mikrosomy potkana indukovaného fenobarbitalem, (frakce „nabohacená“ CYP2B1/2) (**Obr. 15, str. 60**). Dalším efektivním systémem pro oxidaci 3-ABA byl jaterní mikrosomální systém potkana indukovaného pregnenolon-16 α -karbonitrem (frakce „nabohacená“ CYP3A1 a 3A2) (**Obr. 15, str. 60**). Třetím účinným systémem v oxidaci 3-ABA byly jaterní mikrosomy potkana premedikovaného β -naftoflavonem (frakce „nabohacená“ CYP1A1 a 1A2).



Obr. 15 - Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného β -naftoflavonem, fenobarbitalem, ethanolem, pregnenolon-16 α -karbonitrem a mikrosomy nepremedikovaného potkana. Složení reakční směsi je popsáno v kapitole 3.7.1, doba inkubace byla 120 minut. Kontrolou je inkubační směs obsahující kontrolní mikrosomy bez NADPH. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

4.1.2 Studium časové závislosti oxidace 3-aminobenzanthronu jaterními mikrosomálními systémy

V první části této oblasti studované v disertační práci byla oxidace 3-ABA sledována za účasti jaterních mikrosomálních systémů potkana při době inkubace 120 min (**Obr. 15**). Pro detailnější pohled na průběh oxidace 3-ABA byla sledována oxidace 3-ABA v závislosti na různé době inkubace. Závislost oxidace 3-ABA na době inkubace byla sledována pro všech pět použitých mikrosomálních systémů potkana (**Obr. 16, str. 61**).



Obr. 16 Časová závislost oxidace 3-ABA mikrosomy potkana premedikovaného β -naftoflavonem (A), premedikovaného fenobarbitalem PB-MS (B), premedikovaného PCN (C), mikrosomy potkana kontrolního, nepremedikovaného (D), mikrosomy potkana premedikovaného EtOH (E). Kontrolou je inkubační směs bez mikrosomů, inkubována 120 minut. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

Nejefektivnějším systémem, z hlediska oxidace 3-ABA, byl opět mikrosomální systém potkana premedikovaného fenobarbitalem, dále mikrosomální systém potkana premedikovaného pregnolon-16 α -karbonitrilem a v neposlední řadě mikrosomy potkana premedikovaného β -naftoflavonem. Výsledky naznačují, že cytochromy P450 2B, 3A a 1A

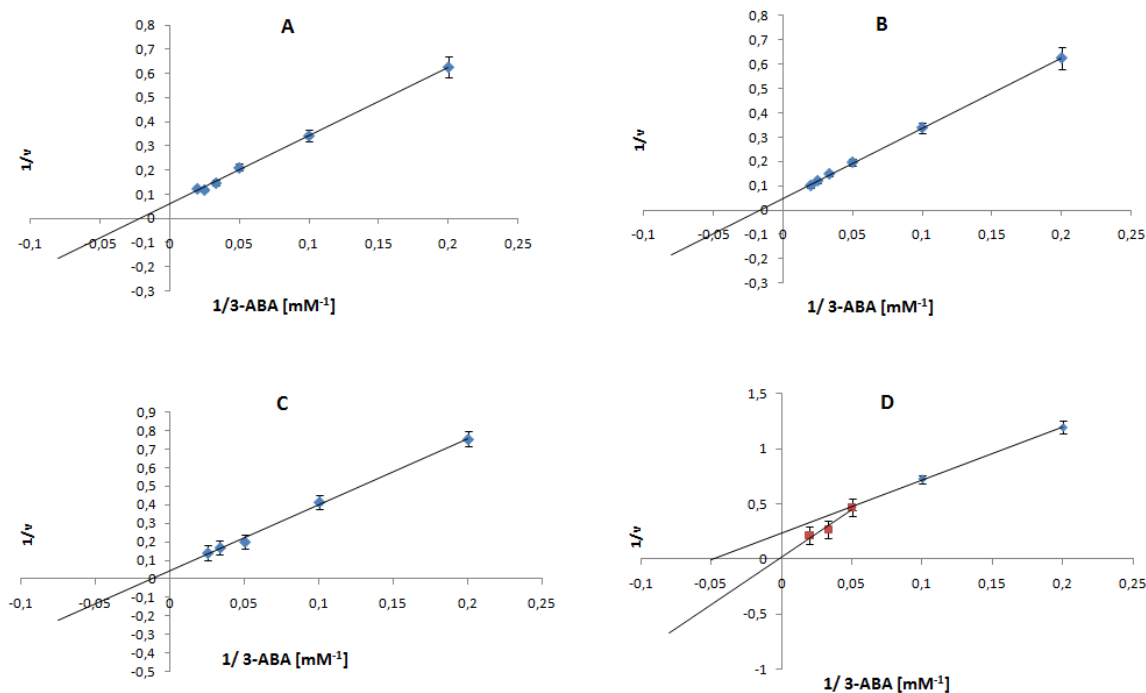
participují na metabolismu 3-aminobenzanthronu v potkaních jaterních mikrosomech. Hlavní oxidační metabolit 3-ABA, 3-nitrobenzanthron byl v kvantifikovatelném množství tvořen pouze dvěma mikrosomálními systémy potkana. A to mikrosomy potkana premedikovaného β -naftoflavonem (*Obr. 16 A, str. 61*) a pregenolon-16 α -karbonitrilem (*Obr. 16 C, str. 61*) V dalších mikrosomálních systémech k tvorbě tohoto metabolitu prakticky nedochází. Neznámý metabolit, označený jako M18, byl tvořen všemi testovanými mikrosomálními systémy (*Obr. 16. A-E, str. 61*). *N*-OH-3-ABA nebyl v této studii při zvolené době inkubace kvantifikován. Obtížná kvantifikace *N*-OH-3-ABA byla způsobena jeho reaktivitou. Tato sloučenina se efektivně přeměňuje na nitréniový či karbéniový ion (*obr. 14, str. 59*).

V některých kontrolních vzorcích bez mikrosomů byly identifikovány oxidační metabolity 3-ABA, metabolit M18 a 3-NBA, nicméně v zanedbatelné míře (*Obr. 16, str. 61*). K tvorbě těchto dvou metabolitů mohlo zřejmě dojít autooxidací 3-aminobenzanthronu.

Výsledky studií uvedených v těchto kapitolách jsou součástí publikací, které jsou v disertační práci uvedeny jako *přílohy 1 a 3*.

4.1.3 Kinetika oxidace 3-aminobenzanthronu jaterními mikrosomálními systémy potkana

U čtyř vybraných mikrosomálních systémů potkana byla dále sledována kinetika oxidace 3-ABA. Kinetickým měřením předcházelo detailnější zpracování časové závislosti oxidace 3-ABA, pro určení do jaké doby inkubace je rychlost oxidace 3-ABA lineární. Tato kinetická studie pak byla prováděna při takové době inkubace, při které měla oxidace 3-ABA ještě lineární charakter. Doba inkubace, při které má oxidace 3-ABA použitými jaterními potkaními mikrosomálními systémy lineární průběh, byla zjištěna na 5 minut (výsledky nejsou uvedeny). Vzhledem k takto krátké době inkubace (5 minut), byla kinetika oxidace 3-ABA sledována pouze sledováním jeho spotřeby (*Obr. 17, str. 63*). Oxidační metabolity 3-aminobenzanthronu nebyly při takto krátké době inkubace prakticky detekovány.



Obr. 17 – Dvojnásobné reciproké vynesení oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana premedikovaného β -naftoflavonem –(A), PB-MS (B), PCN-MS (C), kontrolní MS (D)

Klasická kinetika dle Michaelis-Mentenové byla pozorována v případě oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana premedikovaného β -NF a PB a stejný trend oxidace byl zjištěn i za použití mikrosomů potkana premedikovaného PCN. Jak je ukázáno na *obrázku 17 A-C* dvojnásobné reciproké vynesení mělo lineární průběh. Pro kinetiky oxidace 3-ABA byly vypočteny kinetické parametry, jmenovitě V_{\max} a K_m (*Tabulka 5, str. 64*). Odlišný průběh oxidace 3-ABA byl pozorován při použití kontrolních mikrosomů nepremedikovaného potkana. Zde byl pozorován nelineární průběh dvojnásobného reciprokého vynesení (*Obr. 17 D*). Tento „lomený“ průběh oxidace 3-ABA naznačuje, že se na oxidaci 3-ABA může podílet více než jeden CYP, přítomný v těchto mikrosomech. Pro uvedený průběh oxidace 3-ABA byly vypočteny dvě Michaelisovy konstanty a dvě maximální rychlosti reakce. Jedna z vypočtených hodnot K_m a V_{\max} pro kontrolní mikrosomy se blížila hodnotám získaným z kinetiky oxidace 3-ABA „ β -naftoflavonovými“ mikrosomy (indukovaná podrodina CYP1A). Lze tedy předpokládat, že právě cytochromy P450 podrodiny 1A hrají v oxidaci 3-ABA v kontrolních jaterních potkaních mikrosomech důležitou roli.

Tabulka 5 Kinetické parametry K_m a V_{max} pro oxidaci 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy

Typ MS/ CYP	V_{max} [nmol 3-ABA min ⁻¹ mg ⁻¹]		K_m [μM]	
β-NF MS (CYP1A1/2)	13,42 ± 0,134		47,5 ± 0,50	
PB-MS (CYP2B)	16,8 ± 0,17		60,7 ± 0,61	
PCN-MS (CYP3A)	30,3 ± 0,30		80,8 ± 4,0	
	V_{max1}	V_{max2}	K_{m1}	K_{m2} [μM]
	[nmol 3-ABA min ⁻¹ mg ⁻¹]			
Kontrolní MS	3,4 ± 0,34	48,5 ± 4,90	20,7 ± 0,2	417,5 ± 4,20

Data v tabulce jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

Výsledky studií uvedených v této kapitole jsou součástí publikace, která je v disertační práci uvedena jako *příloha 5*.

4.1.4 Inhibice metabolismu 3-aminobenzanthronu specifickými inhibitory cytochromu P450

Pro potvrzení výsledků získaných studiem oxidace 3-aminobenzanthronu mikrosomálními systémy „nabohacenými“ různými cytochromy P450 byla další část práce zaměřena na studium inhibice oxidace 3-ABA za použití specifických inhibitorů cytochromů P450.

Nejúčinnějším inhibitorem, snižujícím oxidaci 3-ABA byl diamantan, (selektivní inhibitor podrodiny cytochromů P450 2B) (**Tabulka 6, str. 65**). Diamantan byl ve své účinnosti následován ketokonazolem (selektivní inhibitor cytochromů P450 podrodiny 3A), α-naftoflavonem, selektivním inhibitorem cytochromů P450 podrodiny 1A a sulfafenazolem (selektivní inhibitor cytochromů P450 podrodiny 2C). Hodnoty IC_{50} pro jednotlivé typy použitých specifických inhibitorů cytochromů P450 jsou uvedeny v Tabulce 6, str. 65.

Tabulka 6 Inhibice metabolismu 3-ABA specifickými inhibitory CYP

Inhibitor CYP 450	Jaterní mikrosomy potkana	IC ₅₀ [μM]
α-naftoflavon (CYP1A1/2)	β-NF- MS (CYP1A1/2)	10,9
furafylin (CYP1A2)	β-NF- MS (CYP1A1/2)	16,6
diamantan (CYP2B)	PB-MS (CYP2B)	0,9
ketokonazol (CYP 3A1/2)	PCN-MS (CYP 3A1/2)	20,0
DDTC (CYP2E1)	EtOH-MS (CYP2E1)	80,6
DDTC (CYP2E1)	kontrolní MS	96,8
sulfafenazol (CYP2C)	kontrolní MS	10,8
ketokonazol (CYP 3A1/2)	kontrolní MS	3,5

Data v tabulce jsou průměrem dvou stanovení.

Ze získaných hodnot IC₅₀ opět vyplývá, že cytochromy P450 1A, 2B a 3A, obsažené v jaterních mikrosomech potkanů, jsou vysoce účinné v oxidaci 3-ABA.

Výsledky studií uvedených v této kapitole jsou součástí publikací, které jsou v disertační práci uvedeny jako *přílohy 3 a 5*.

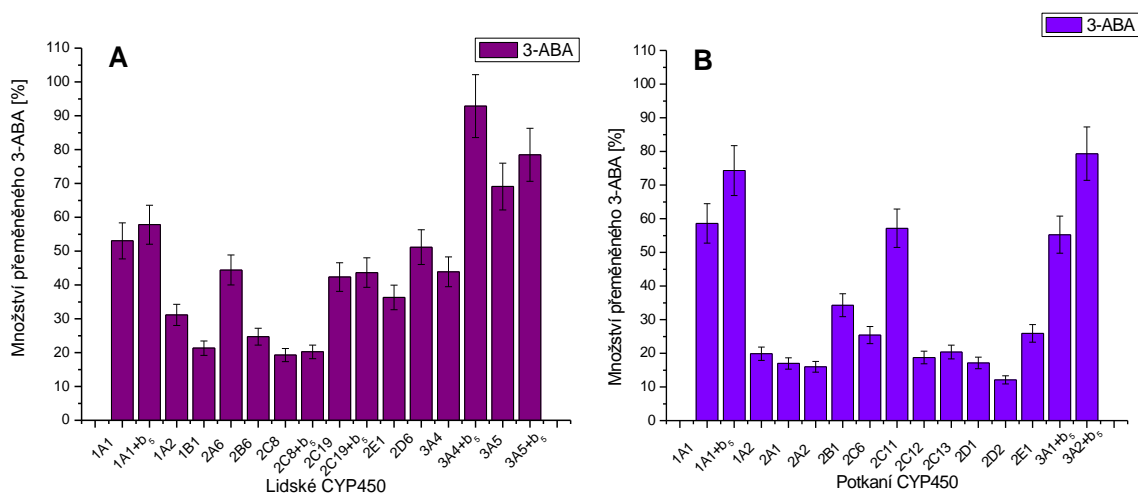
4.2 Metabolismus 3-aminobenzanthronu lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450

V této části disertační práce jsme sledovali oxidaci 3-ABA potkaními a lidskými rekombinantními cytochromy P450. U vybraných cytochromů P450 pak byla studována i kinetika oxidace 3-ABA těmito enzymy.

4.2.1 Studium metabolismu 3-aminobenzanthronu lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450 obsaženými v SupersomechTM

Rekombinantní potkaní a lidské cytochromy P450 použité v experimentech byly exprimovány v SupersomechTM (mikrosomy izolované z hmyzích buněk transfekovaných bakulovirem). Ze získaných výsledků vyplývá, že nejúčinnějším lidským cytochromem P450 v oxidaci 3-ABA je cytochrom P450 3A4, následovaný cytochromem P450 3A5 (*Obr. 18, str. 66*). Cytochrom b₅, který je součástí mikrosomálních systémů jako jejich fakultativní složka, stimuloval oxidaci 3-ABA katalyzovanou CYP3A4, 3A5 a 1A1 (*Obr. 18, str. 66*). Dalším účinným cytochromem P450 v oxidaci 3-ABA byl cytochrom P450 1A1. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 18 A, str. 66.

Z potkaních cytochromů P450 byl v oxidaci 3-ABA nejúčinnější cytochrom P450 3A2 za přítomnosti cytochromu b_5 , dále pak cytochrom P450 1A1 s cytochromem b_5 . 3-ABA také oxidují i potkaní cytochrom P450 2C11 a lidský cytochrom P450 2D6. Výsledky oxidace 3-ABA jednotlivými potkaními cytochromy P450 jsou uvedeny na obrázku 18 B.



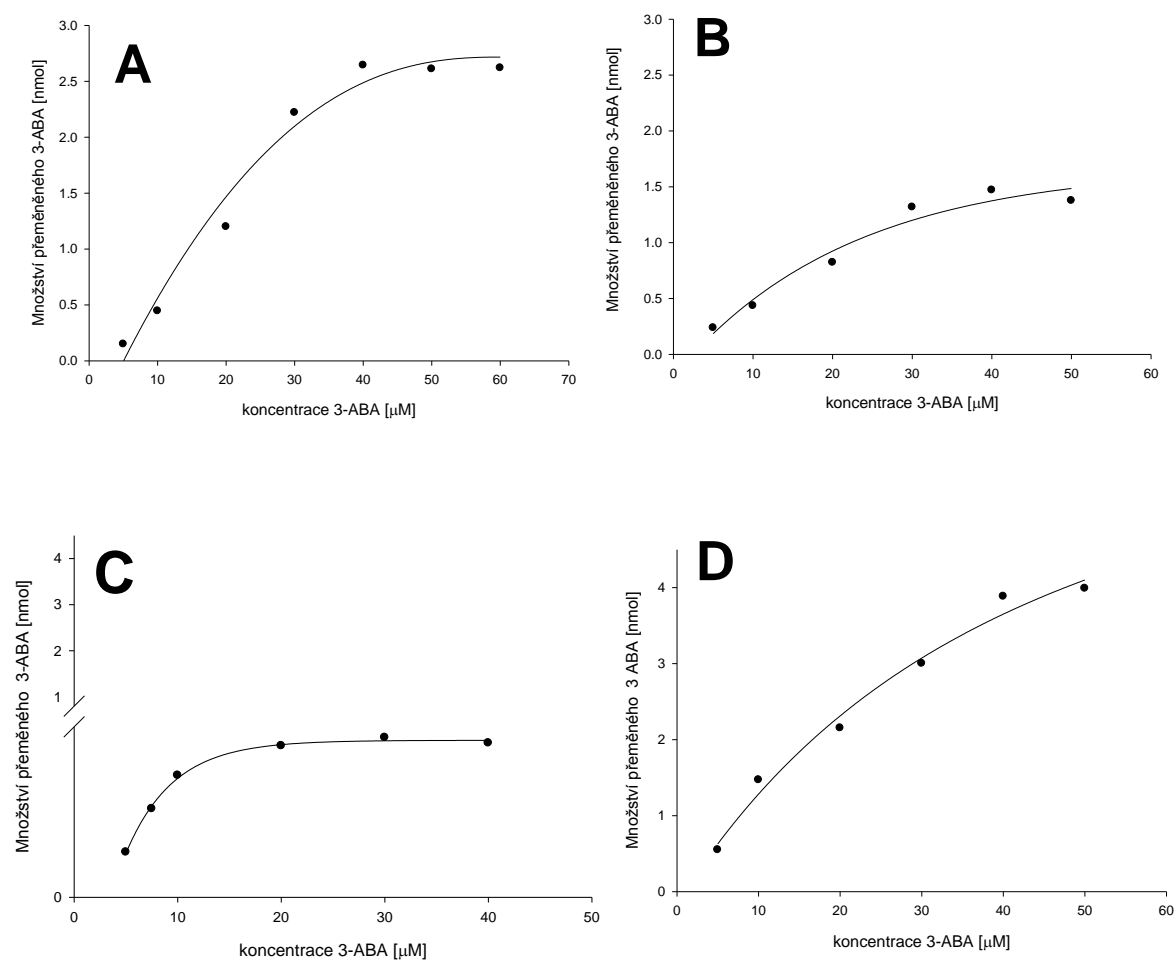
Obr. 18 Oxidace 3-ABA lidskými (A) a potkaními (B) rekombinantními CYP. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů. Doba inkubace byla 20 minut.

Výsledky získané v této části práce byly dále rozšířeny o studium kinetiky oxidace 3-aminobenzanthronu (viz kapitola 4.2.2). Kinetickým měřením předcházelo sledování časové závislosti rychlosti oxidace 3-ABA nejúčinnějšími lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450 (CYP1A1, CYP3A4 + cytochrom b_5 , CYP3A1 + cytochrom b_5 , CYP3A2 + cytochrom b_5). Rychlost oxidace 3-ABA byla lineární při době inkubace do 20 minut pro potkaní a lidský CYP1A1, a dále také pro lidský CYP3A4 a potkaní CYP3A1. V případě potkaního CYP3A2 byla oxidace 3-ABA lineární až do doby inkubace 40 minut.

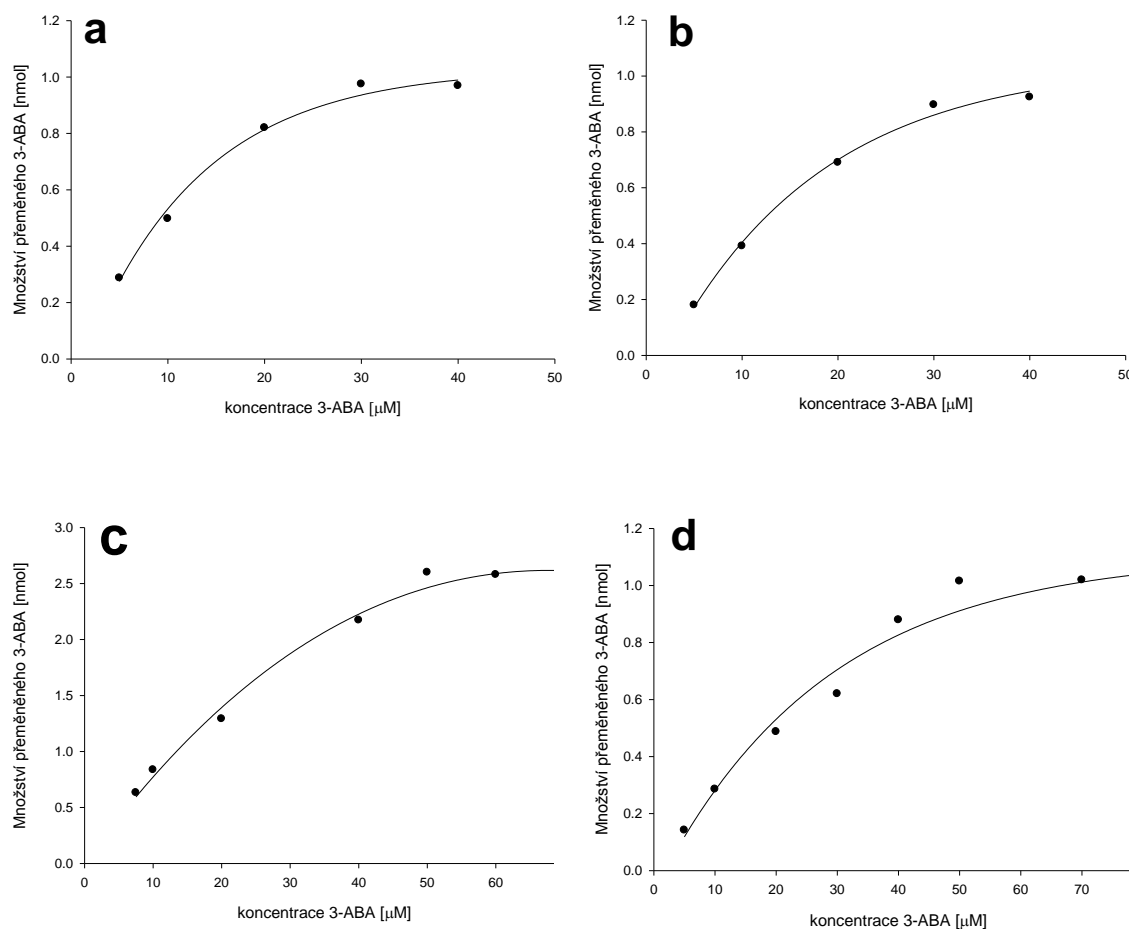
Výsledky studií uvedených v této kapitole jsou součástí publikace, která je v disertační práci uvedena jako *příloha 5*.

4.2.2 Kinetika oxidace 3-aminobenzanthronu lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450

U všech zvolených potkaních i lidských enzymů byl pozorován hyperbolický průběh oxidace 3-ABA (*Obr. 19 a Obr. 20, str. 68*). Z dvojnásobného reciprokého vynesení byly určeny základní kinetické parametry, K_m a V_{max} (*Tabulka 7, str. 69*).



Obr. 19 Kinetika oxidace 3-ABA lidskými cytochromy P450: CYP1A1 (A), CYP1A1+b₅ (B), CYP3A4 (C), CYP3A4+b₅ (D). Data v obrázku jsou průměrem dvou paralelních stanovení.



Obr. 20 Kinetika oxidace 3-ABA potkaními cytochromy P450: CYP1A1 (a), CYP1A1+b₅ (b), CYP3A1+b₅ (c), CYP3A2+b₅ (d). Data v obrázku jsou průměrem dvou paralelních stanovení.

Zjištěné hodnoty V_{\max} potvrzují výsledky získané oxidací 3-ABA jednotlivými lidskými a potkaními rekombinantními cytochromy P450. Z lidských cytochromů P450 byl v oxidaci 3-ABA nejefektivnější cytochrom P450 3A4 za přítomnosti cytochromu b₅, (*Tabulka 7, str. 69*). V případě potkaních cytochromů P450 byl v oxidaci 3-aminobenzanthronu nejefektivnějším cytochrom P450 3A2 za přítomnosti cytochromu b₅ (*Tabulka 7, str. 69*).

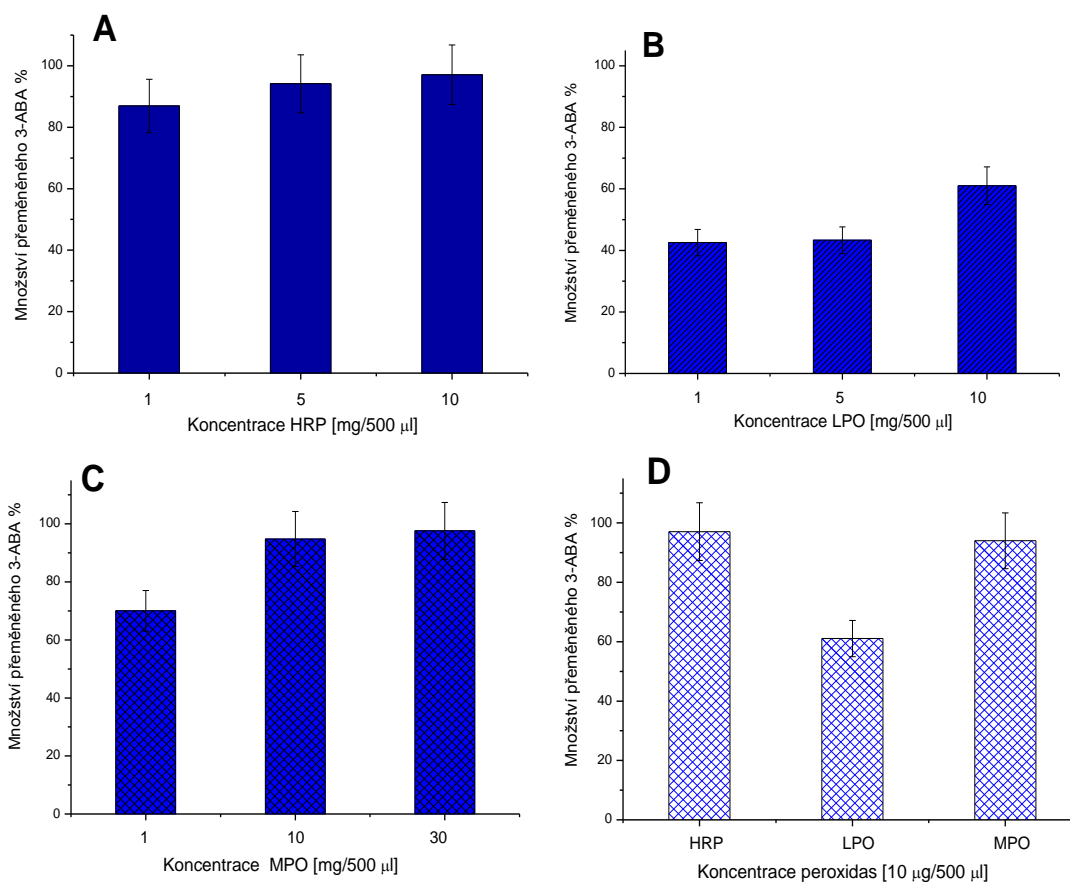
Tabulka 7 Kinetické parametry K_m a V_{max} pro oxidaci 3-ABA rekombinantními CYP

Typ cytochromu P450	K_m [μM]	V_{max} [min^{-1}]	K_m/V_{max} [$\mu\text{M} \cdot \text{min}$]
lidský CYP1A1	75,50	21,0	3,60
lidský CYP1A1+b ₅	122,80	24,0	5,12
lidský CYP3A4	68,27	10,0	6,83
lidský CYP3A4+b ₅	38,41	28,0	1,37
potkaní CYP1A1	27,70	7,0	3,96
potkaní CYP1A1+b ₅	42,11	8,0	5,26
potkaní CYP3A1+b ₅	49,99	13,0	3,85
potkaní CYP3A2+b ₅	62,51	20,0	3,13

Data v tabulce jsou průměrem dvou paralelních stanovení.

4.3 Metabolismus 3-aminobenzanthronu peroxidasami

Kromě oxidace 3-aminobenzanthronu cytochromy P450 byla jeho oxidace studována také peroxidasami. Pro studium oxidace 3-ABA byly použity křenová peroxidasa, laktoperoxidasa a myeloperoxidasa.



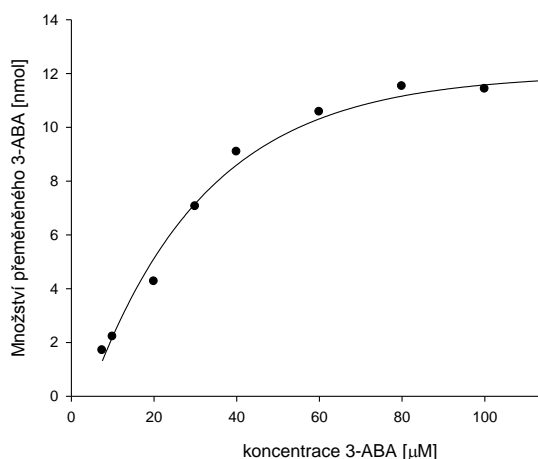
Obr. 21 Oxidace 3-ABA peroxidasami, křenovou peroxidasou (A), laktoperoxidasou (B) a myeloperoxidasou (C), shrnutí oxidace 3-ABA všemi použitými peroxidasami (D). Data v obrázku jsou průměrem dvou paralelních stanovení.

Nejefektivnější v přeměně 3-aminobenzanthronu byla křenová peroxidasa, dále pak myeloperoxidasa a laktoperoxidasa (**Obr. 21, str. 69**). Na jaké metabolity, se 3-ABA peroxidasami oxiduje, dosud nebylo zjišťováno. Při přeměně 3-ABA peroxidasami nebyla pozorována tvorba ani metabolitu M18 ani 3-NBA. Lze předpokládat, že je 3-ABA oxidován peroxidasami na iminoderivát, podobně jako jsou peroxidasami oxidovány i jiné aromatické aminy⁽¹⁶⁸⁾. Vzhledem k reaktivitě této sloučeniny může docházet k její vazbě na protein peroxidasy v inkubační směsi.

4.3.1 Kinetika oxidace 3-aminobenzanthronu křenovou peroxidasou

Oxidace 3-aminobenzanthronu peroxidasami probíhala v jiných časových intervalech, než byly časové intervaly užití při oxidaci 3-aminobenzanthronu cytochromy P450. Vzhledem k vysoké účinnosti peroxidasy, jsme sledovali oxidaci 3-ABA peroxidasami při inkubaci do doby 5 minut. Z výsledků vyplývá, že oxidace 3-aminobenzanthronu křenovou peroxidasou měla lineární charakter do doby inkubace 60 sec (data nejsou uvedena).

Kinetika oxidace 3-ABA křenovou peroxidasou je uvedena na obrázku 22. Z hyperbolického průběhu kinetiky oxidace křenovou peroxidasou, je patrná saturace této peroxidasy nad koncentrací 3-ABA 80 μM .



Obr. 22 Kinetika oxidace 3-aminobenzanthronu křenovou peroxidasou. Data v obrázku jsou průměrem dvou paralelních stanovení.

Hodnota Michaelisovy konstanty K_m byla 271,76 μM , maximální rychlosti reakce V_{\max} pak 12,66 nmol 3-ABA/min/ μg peroxidasy. Kinetiky oxidace 3-aminobenzanthronu myeloperoxidasou a laktoperoxidasou nebyly dosud studovány a mohou být předmětem dalšího studia.

4.4 Studium indukčního potenciálu 3-nitrobenzanthronu a 3-aminobenzanthronu pro expresi enzymů metabolisujících xenobiotika

Z výsledků získaných v dřívější práci naší laboratoře⁽¹⁵⁵⁾ bylo zjištěno, že jak 3-nitrobenzanthron, tak i jeho hlavní redukční metabolit 3-aminobenzanthron indukují expresi některých enzymů metabolisujících xenobiotika v jaterní tkáni potkanů. Konkrétně enzymů, které se na metabolismu 3-NBA a 3-ABA podílejí. V potkaních a lidských játrech metabolisují 3-NBA a 3-ABA především NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1) a cytochromy P450 1A1 a 1A2⁽¹⁵⁵⁾.

Další část disertační práce byla zaměřena na sledování schopnosti 3-nitrobenzanthronu a 3-aminobenzanthronu indukovat tyto biotransformační enzymy, a to nejen v tkáni jaterní, ale i v plicích, cílovém orgánu karcinogenity 3-NBA, a ledvinách. A to při dvou rozdílných způsobech aplikace studovaných látek, intraperitoneálně a intratracheálně. Expres biotransformačních enzymů byla sledována v jaterní, ledvinné a plicní tkáni potkana, a to na úrovni mRNA, proteinů enzymů a jejich enzymových aktivit.

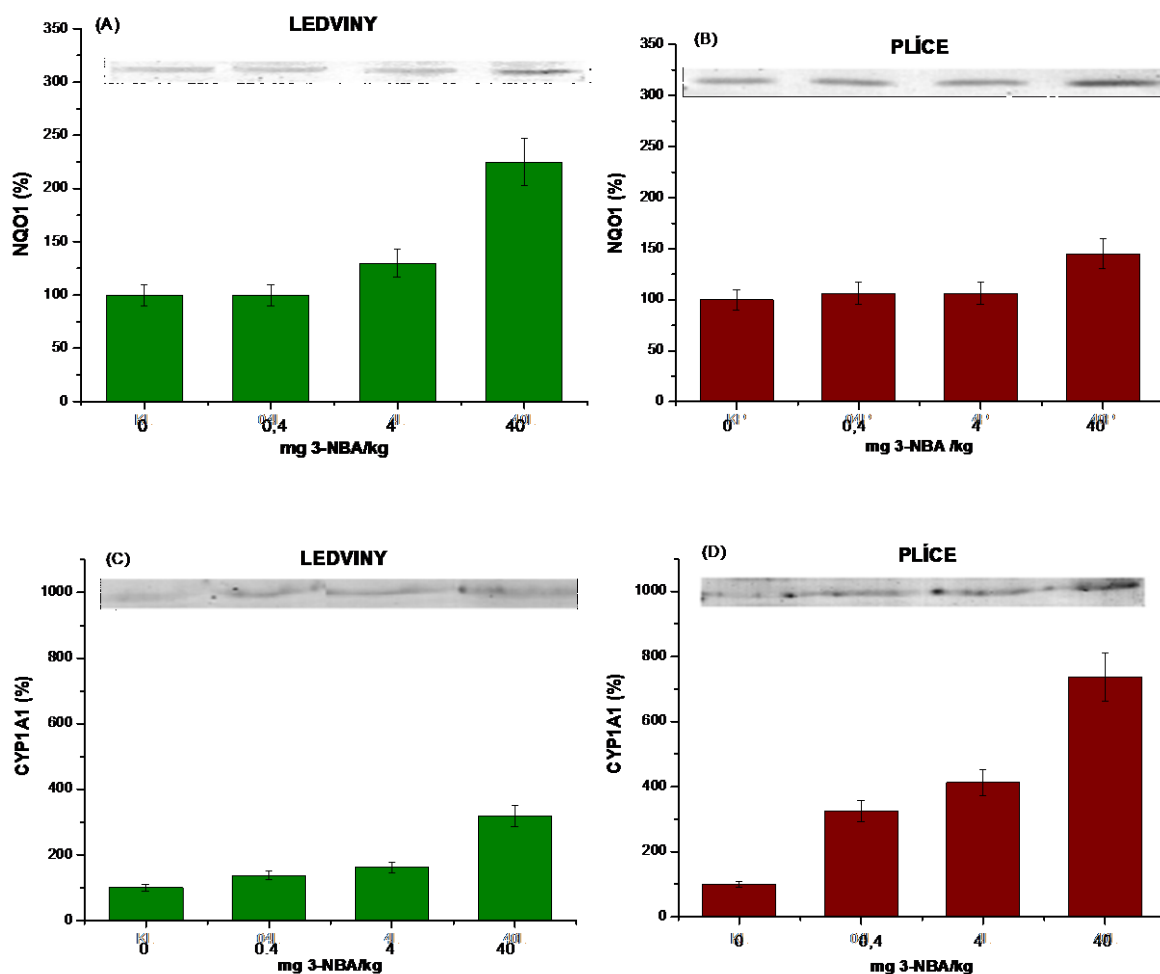
4.4.1 Studium vlivu 3-nitrobenzanthronu na expresi

NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromu P450 1A1 v tkáních potkana po intraperitoneální aplikaci

Pro studium potenciálu 3-nitrobenzanthronu indukovat expresi cytosolárního enzymu NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 (NQO1) a mikrosomálního cytochromu P450 1A1 v plicní a ledvinné tkáni byly použiti samci potkanů kmene Wistar. 3-Nitrobenzanthron byl aplikován intraperitoneálně, v dávce o koncentraci 0,4, 4, 40 mg 3-NBA na kg hmotnosti zvířete. Kontrolním zvířatům byl aplikován olej, který byl použit pro rozpuštění 3-NBA. Z plic a ledvin potkanů byly po premedikaci izolovány mikrosomální a cytosolární frakce, které byly následně charakterizovány.

4.4.1.1 Stanovení obsahu proteinu NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromu P450 1A1 v ledvinách a plicích potkana po intraperitoneální aplikaci 3-nitrobenzanthronu

Ke sledování změn obsahu cytosolárního enzymu NQO1 a mikrosomálního cytochromu P450 1A1 byla použita metoda „Western blot“ s detekcí specifickými protilátkami (kap. 3.6). Bylo zjištěno, že 3-NBA u potkanů ovlivňuje obsah obou enzymů (*Obr. 23, str. 73*). V případě NQO1 docházelo ke zvýšení exprese jak v ledvinné, tak i v plicní tkáni potkana, přičemž indukce v ledvinách byla výraznější. V ledvinách dochází při premedikaci 3-NBA dávkou 40 mg/kg k 2,3 násobnému nárůstu exprese NQO1, zatímco v plicích byl nárůst exprese oproti kontrole roven 1,4 násobku. U cytochromu P450 1A1 byl zaznamenán opačný trend, kdy dochází k většímu nárůstu exprese tohoto enzymu v plicích oproti ledvinám. Zvýšená exprese CYP1A1 byla v plicích oproti kontrole rovna 7,4 násobku, v ledvinách pak 3,4 násobku exprese CYP1A1 oproti kontrolním zvířatům. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 23, str. 73.



Obr. 23 Vliv intraperitoneální aplikace 3-NBA na indukci exprese cytosolárního proteinu NQO1 (A, B) a mikrosomálního proteinu CYP1A1 (C, D) v ledvinách a plicích potkanů kontrolních a premedikovaných 3-NBA v dávkách 0,4, 4 a 40 mg/kg hmotnosti zvířete. Stanovení hladiny proteinů bylo provedeno metodou „Western blotting“, kapitola 3.6. Imunoblotty cytosolární NQO1 byly detekovány protilátkou proti lidské NQO1. Imunoblotty mikrosomálního CYP1A1 byly detekovány protilátkou proti potkanímu CYP1A1. Densitometrické vyhodnocení bylo provedeno programem Elfoman. Hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření.

4.4.1.2 Stanovení enzymové aktivity cytosolární NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 a mikrosomálního cytochromu P450 1A1 v ledvinách a plicích po intraperitoneální aplikaci 3-nitrobenzanthronu

Pro potvrzení vlivu 3-nitrobenzanthronu na indukci cytosolárního enzymu NQO1 bylo ve všech ledvinných a plicích cytosolech sledováno měření aktivity NQO1 se specifickým substrátem tohoto enzymu, menadionem. Výsledky specifických aktivit NQO1 jsou uvedeny v Tabulce 8, str. 74.

Tabulka 8 Specifická aktivita NQO1 v ledvinném a plicním cytosolu potkanů

Nepremedikovaní potkani	Potkani premedikovaní 3-NBA		
	0,4 mg/kg	4 mg/kg	40 mg/kg
0,09 ± 0,01	0,15 ± 0,01 (1,7)*	0,15 ± 0,01 (1,7)*	0,23 ± 0,02 (2,5)**
0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01 (1,2)	0,06 ± 0,01 (1,2)	0,09 ± 0,01 (1,8)*

Jednotka aktivity NQO1 je definovaná jako takové množství enzymu, které redukuje 1 μ mol NADPH/min/mg proteinu, při použití menadionu jako substrátu NQO1. Výsledky jsou průměry a směrodatné odchylky určené z pěti paralelních měření. Hodnoty uvedené v závorce představují násobek kontroly, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Pro potvrzení indukce cytochromu P450 1A1 3-nitrobenzanthronem byly v ledvinných a plicních mikrosomech potkanů kontrolních a premedikovaných 3-NBA měřeny enzymové aktivity také CYP1A1. Pro měření aktivity byly použity markerové substráty CYP1A. Pro stanovení cytochromu P450 1A1/2 byla použita O-deethylace 7-ethoxyresorufinu (EROD). Pro stanovení aktivity CYP1A1 byla použita oxidace Sudanu I. Markerový substrát CYP1A1, Sudan I, je kromě CYP1A1 oxidován ještě podrodinou cytochromu P450 3A⁽¹⁵⁵⁾. Proto byl do inkubační směsi přidán ketokonazol, který tyto enzymy inhibuje. Produkty oxidace Sudanu I byly separovány a kvantifikovány metodou HPLC, viz kapitola 3.5.3, dle práce V. Martíčka⁽¹⁶⁶⁾, kdy aktivita cytochromu P450 1A1 odpovídá součtu ploch píků jednotlivých metabolitů Sudanu I (4'-OH Sudan I, 6-OH-Sudan I a 4',6-OH-Sudan I) vzniklých oxidací CYP1A1. Výsledky získané z obou použitých metod jsou uvedeny v Tabulce 9. Hodnoty aktivit CYP1A1 indukci 3-nitrobenzanthronu se rovněž, podobně jako jeho proteinu, zvyšovaly.

Tabulka 9 Specifická aktivita CYP1A1 v ledvinných a plicních mikrosomech potkanů

Aktivita CYP	Nepremedikovaní potkani		Potkani premedikovaní 3-NBA (40 mg/kg hmotnosti)	
	Ledviny	Plice	Ledviny	Plice
EROD	9,4 ± 0,4	4,6 ± 0,5	50,2 ± 1,8 (5,3)*	29,9 ± 2,1 (6,5)*
Oxidace Sudanu I	9,3 ± 1,0	4,7 ± 0,5	30,3 ± 2,3 (3,2)*	29,8 ± 2,8 (6,3)*

Každá hodnota (pmol reakčního produktu /min/nmol CYP) představuje průměr a směrodatnou odchylku určenou ze tří nezávislých stanovení. Hodnoty uvedené v závorce představují násobek kontroly. Výsledky jsou z tkání kontrolních a premedikovaných potkanů dávkou 40 mg/kg 3-NBA, * $p < 0.001$.

4.4.1.3 Stanovení obsahu mRNA NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromu P450 1A1 v ledvinné a plicní tkáni potkana po intraperitoneální aplikaci 3-nitrobenzanthronu

Kromě sledování vlivu 3-NBA na indukci exprese NQO1 a CYP1A1 jsme sledovali tento vliv i na expresi mRNA obou enzymů. Relativní množství mRNA CYP1A1 a NQO1 bylo stanoveno metodou RT-PCR (kap. 3.9). Zjistili jsme, že se při použití dávky 40 mg 3-NBA/kg hmotnosti zvířete zvyšuje množství mRNA příslušných enzymů v obou studovaných tkáních, ledvinách a plicích. Přičemž v plicích došlo k vyššímu nárůstu exprese mRNA obou studovaných enzymů, než v ledvinné tkáni. Při kvantifikaci CYP1A1 mRNA bylo zaznamenáno 3,9-ti násobné zvýšení exprese mRNA v plicní tkáni oproti kontrole. V případě mRNA NQO1 bylo pozorováno 1,4 násobné zvýšení exprese oproti kontrole. Výsledky exprese mRNA pro tyto biotransformační enzymy jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 10 Exprese mRNA CYP1A1 a NQO1

	CYP1A1		NQO1	
	Δc_T^a	F	Δc_T^a	F
Kontrolní potkani				
Ledviny	4,45 ± 0,36	-	9,37 ± 0,67	-
Plice	10,48 ± 0,16	-	5,44 ± 0,34	-
3-NBA premedikovaní potkani				
Ledviny	2,60 ± 0,65	3,6**	9,07 ± 0,22	1,2*
Plice	8,51 ± 0,70	3,9**	4,98 ± 0,21	1,4**

^a ± směrodatná odchylka (SD) tří paralelních měření (kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných 40 mg 3-NBA/kg hmotnosti zvířete, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, F – násobek kontroly, Δc_T^T , počet cyklů do prahové hodnoty („Threshold cycle“).

Jak již bylo výše uvedeno, studie předcházející této disertační práci byla zaměřena na potenciál 3-NBA a 3-ABA indukovat CYP1A1 a NQO1 v játrech potkanů po intraperitoneální premedikaci⁽¹⁵⁵⁾. Porovnáme-li naše výsledky z exprese proteinů CYP1A1 a NQO1 v ledvinách a plicích potkana po intraperitoneální premedikaci 3-NBA s výsledky dřívější práce⁽¹⁵⁵⁾, můžeme říci, že k největšímu nárůstu exprese CYP1A1 došlo v játrech potkanů premedikovaných 40 mg 3-NBA/kg. V jaterní tkáni bylo nalezeno 16-ti násobné zvýšení exprese CYP1A1 oproti kontrole. Přibližně poloviční nárůst exprese CYP1A1 oproti játrům byl pozorován v plicní tkáni a k nejnižší indukci exprese CYP1A1 došlo v ledvinách. Zde byl nalezen přibližně čtvrtinový nárůst exprese oproti hodnotám exprese CYP1A1 v játrech.

Zaměříme-li se na porovnání výsledků indukce exprese NQO1 v ledvinné a plicní tkáni potkana po intraperitoneální aplikaci 3-NBA s výsledky získanými v předešlé práci⁽¹⁵⁵⁾, lze říci, že k největšímu nárůstu exprese NQO1 došlo rovněž v játrech potkanů premedikovaných 40 mg 3-NBA/kg hmotnosti zvířete (16-ti násobné zvýšení jeho exprese oproti kontrole). Pokud se týká účinnosti indukce exprese NQO1 3-NBA, tak po jeho největší indukci v játrech následoval nárůst exprese v ledvinách.

Indukce lidských a potkaních CYP1A1 a NQO1 je způsobená řadou sloučenin, např. planárními aromatickými sloučeninami, které se váží na Ah receptor. Mezi takové látky patří např. TCDD a polycyklické uhlovodíky, obsažené v cigaretovém kouři^(132, 72). Indukce cytosolárního enzymu NQO1 je navíc způsobena řadou látek, působících různým mechanismem⁽¹³⁹⁾. Mezi induktory NQO1 patří také tumorové promotory a peroxid vodíku^(98, 127). V disertační práci jsme potvrdili vliv intraperitoneální aplikace 3-NBA na indukci exprese cytochromu P450 1A1 a NQO1. A to na úrovni indukce exprese proteinu, aktivity a také na úrovni zvýšené exprese mRNA obou enzymů.

Výsledky studií uvedených v této kapitole jsou součástí publikace, která je v disertační práci uvedena jako *příloha 2*.

4.4.2 Studium vlivu 3-aminobenzanthronu na expresi

NADPH:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromu P450 1A1 v ledvinné a plicní tkáni potkana po intraperitoneální aplikaci

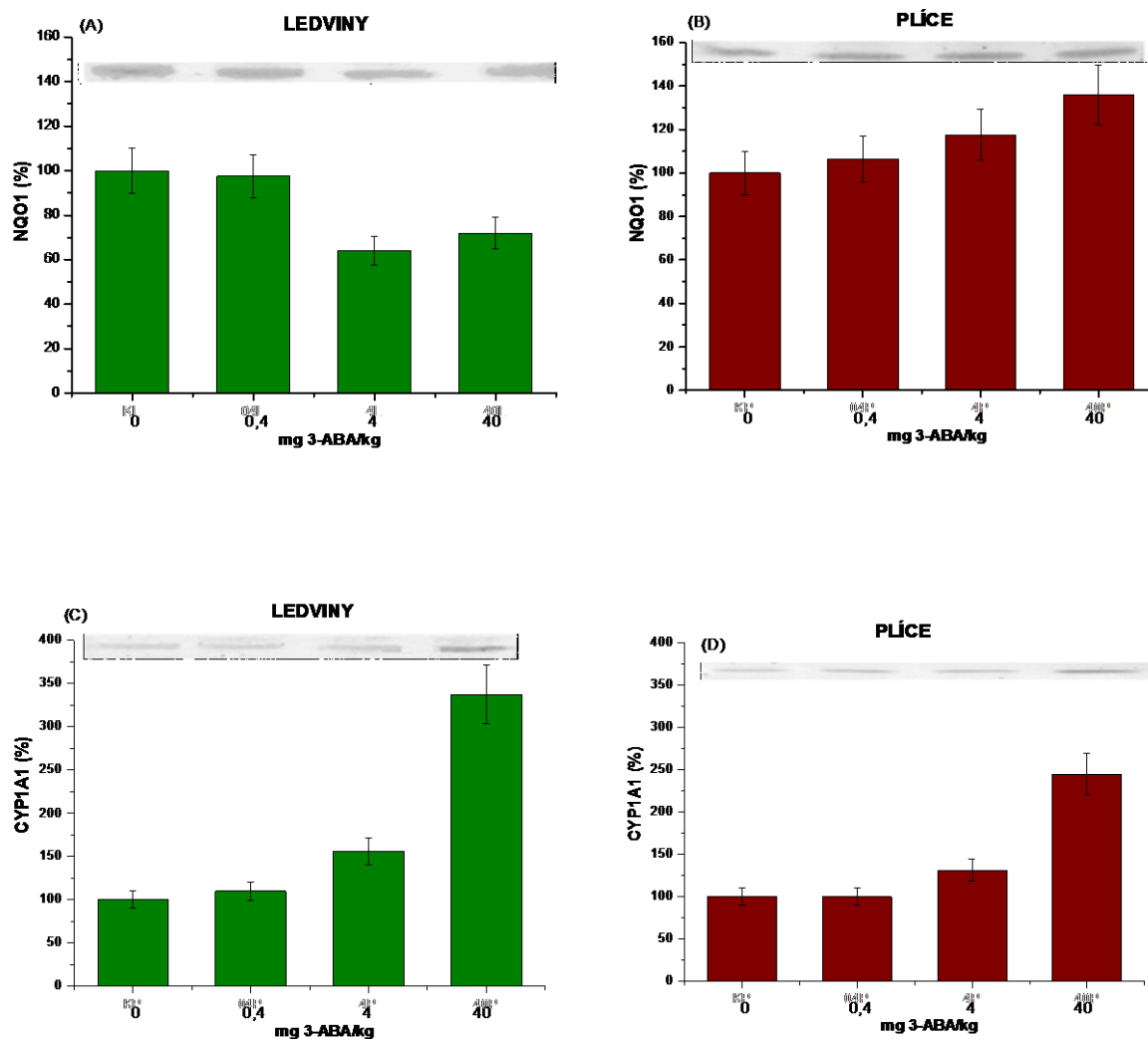
V další části disertační práce byl studován potenciál 3-aminobenzanthronu indukovat expresi biotransformačních enzymů. Pro studium indukce exprese CYP1A1 a NQO1 byly rovněž použiti samci potkanů kmene Wistar. 3-Aminobenzanthron byl aplikován intraperitoneálně, a to jednorázovou dávkou 0,4, 4, 40 mg 3-ABA na kg hmotnosti zvířete. Kontrolním zvířatům byl aplikován olej, který byl použit pro rozpuštění 3-ABA. Z plic a ledvin potkanů byli po premedikaci izolovány mikrosomální a cytosolární frakce, které byly následně charakterizovány.

4.4.2.1 Stanovení obsahu proteinu a enzymové aktivity

NADPH:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromu P450 1A1 v ledvinách a plicích potkana po intraperitoneální aplikaci 3-aminobenzanthronu

Změna obsahu studovaných enzymů, NQO1 a CYP1A1 byla opět sledována imunodetekcí metodou „Western blot“. Bylo zjištěno, že intraperitoneální aplikací 3-ABA zvířatům dochází v ledvinách a plicích potkanů ke změnám hladin jak CYP1A1, tak i NQO1 (*Obr. 24, str. 78*).

V případě CYP1A1 docházelo ke zvýšení exprese jak v ledvinné tkáni potkana, tak i v plicích, přičemž indukce v ledvinách byla výraznější. V ledvinách dochází při premedikaci 3-ABA dávkou 40 mg/kg k 3,4 násobnému nárůstu exprese CYP1A1 (*Obr. 24 C, str. 78*), zatímco v plicní tkáni byl nárůst exprese oproti kontrole roven 2,5 násobnému nárůstu (*Obr. 24 D, str. 78*). Odlišné výsledky jsme získali v případě exprese cytosolárního enzymu NQO1. Zde byl zaznamenán dokonce pokles exprese NQO1 v ledvinné tkáni při použití premedikačních dávek 3-ABA 4 a 40 mg/kg. Naopak v plicní tkáni 3-ABA expresi NQO1 při použití všech premedikačních dávek indukoval. Nejvyšší nárůst exprese NQO1 v plicích byl zaznamenán při premedikaci dávkou 40 mg 3-ABA/kg (1,4 násobný nárůst exprese NQO1 oproti kontrole, (*Obr. 24 B, str. 78*))



Obr. 24 Vliv intraperitoneální aplikace 3-ABA na indukcii exprese cytosolárního proteinu NQO1 (A, B) a mikrosomálního proteinu CYP1A1 (C, D) v ledvinách a plicích potkanů kontrolních a premedikovaných 3-ABA v dávkách 0,4, 4 a 40 mg/kg hmotnosti zvířete. Stanovení hladiny proteinů bylo provedeno metodou „Western blotting“, kapitola 3.6. Imunoblotty cytosolární NQO1 byly detekovány protilátkou proti lidské NQO1. Imunoblotty mikrosomálního CYP1A1 byly detekovány protilátkou proti potkanímu CYP1A1. Densitometrické vyhodnocení bylo provedeno programem Elfoman. Hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření.

Pro rozšíření a potvrzení indukce cytochromu P450 1A1 3-aminobenzanthronem byly v ledvinách a plicích mikrosomech potkanů kontrolních a premedikovaných dávkou 40 mg/kg 3-NBA měřeny enzymové aktivity CYP1A1. Pro měření aktivity byly použity obdobné markerové substráty CYP1A1 jako při měřeních uvedených v předchozí kapitole.

Výsledky získané z obou použitých metod pro stanovení aktivity CYP1A1 jsou uvedeny v Tabulce 11, str. 79. Hodnoty aktivit CYP1A1 indukcí 3-aminobenzanthronu se rovněž, podobně jako jeho proteinu, zvyšovaly. V ledvinách došlo takřka k 5-ti násobnému

nárůstu aktivity CYP1A1 oproti kontrole, při použití premedikační dávky 3-ABA 40 mg/kg. V plicích byl zaznamenán 2,5 násobný nárůst aktivity CYP1A1 oproti kontrolním zvířatům, při dávce 40 mg/kg 3-ABA. Je třeba ještě podotknout, že hodnota aktivity CYP1A1 v plicích byla poloviční oproti hodnotám aktivity tohoto enzymu v ledvinách.

Tabulka 11 Specifická aktivita CYP1A1 v ledvinných a plicních mikrosomech potkanů

Aktivita CYP	Nepremedikovaní potkani		Potkani premedikovaní 3-ABA	
	Ledviny		Ledviny	
		0,4 mg/kg	4 mg/kg	40 mg/kg
EROD	9,4 ± 0,4	20,0 ± 0,05** (2,1)	39,6 ± 0,9** *(4,2)	45,0 ± 2,5*** (4,8)
Oxidace Sudanu I	9,3 ± 1,0	21,8 ± 1,2** (2,3)	21,9 ± 0,9* *(2,3)	34,5 ± 1,9** (3,7)
Aktivita CYP	Plice		Plice	
		0,4 mg/kg	4 mg/kg	40 mg/kg
EROD	4,6 ± 0,5	5,1 ± 0,5 (1,1)	6,4 ± 0,4* (1,4)	11,5 ± 0,8** (2,5)
Oxidace Sudanu I	4,7 ± 0,5	4,7 ± 0,5 (1,0)	6,2 ± 0,3* (1,3)	10,9 ± 0,7* *(2,3)

Každá hodnota (pmol reakčního produktu/min/nmol CYP) představuje průměr a směrodatnou odchylku určenou ze tří nezávislých stanovení. Hodnoty uvedené v závorce představují násobek kontroly, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Ve všech studovaných tkáních potkana byla také sledována specifická aktivita NQO1. Nárůst aktivity cytosolárního enzymu NQO1 v plicích též závisí na podané dávce 3-ABA a souvisí s hladinou exprese enzymu (**Tabulka 12**). V plicích byl při aplikační dávce 40 mg 3-ABA/kg hmotnosti zvířete pozorován 1,6-ti násobný nárůst aktivity tohoto proteinu, NQO1 oproti hodnotám aktivity NQO1 v kontrolním cytosolu (**Tabulka 12**).

Tabulka 12 Specifická aktivita NQO1 v ledvinném a plicním cytosolu potkanů kontrolních a premedikovaných 3-aminobenzanthronem..

	Nepremedikovaní potkani	Potkani premedikovaní 3-ABA		
		0,4 mg/kg	4 mg/kg	40 mg/kg
Ledviny	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01 (0,9)	0,10 ± 0,01 (1,1)	0,10 ± 0,01 (1,1)
Plice	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01* (1,2)	0,07 ± 0,01* (1,4)	0,08 ± 0,01** (1,6)

Jednotka pro aktivitu NQO1 je definovaná jako takové množství, které zredukuje 1 μ mol NADPH/min/mg proteinu, při použití menadionu jako substrátu NQO1. Výsledky jsou průměry a směrodatné odchylky určené z pěti paralelních měření. Hodnoty uvedené v závorce představují násobek kontroly, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.4.2.2 Stanovení obsahu mRNA NADPH:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromu P450 1A1 v ledvinách a plicích potkana po intraperitoneální aplikaci 3-aminobenzanthronu

Vliv indukce 3-ABA na expresi cytochromů P450 1A1 a NQO1 se projevil jak na úrovni exprese proteinů, tak i na zvýšení enzymové aktivity těchto biotransformačních enzymů (viz předchozí kapitoly). Sledovali jsme jejich indukci i na úrovni mRNA. Ke stanovení relativního množství mRNA CYP1A1 a NQO1 byla použita metoda RT-PCR. Zjistili jsme, že při použití aplikační dávky 40 mg 3-ABA/kg hmotnosti zvířete se zvyšuje množství mRNA jak CYP1A1, tak NQO1 v plicní tkáni. V ledvinné tkáni došlo pouze k indukci exprese mRNA NQO1. Při kvantifikaci mRNA CYP1A1 bylo v plicní tkáni zjištěno 1,4 násobné zvýšení exprese mRNA oproti kontrole. A v případě mRNA NQO1 bylo pozorováno zvýšení exprese mRNA tohoto enzymu oproti kontrole obdobné. Výsledky exprese mRNA pro tyto biotransformační enzymy jsou uvedeny v Tabulce 13.

Tabulka 13 Expresa mRNA CYP1A1 a NQO1

	CYP1A1		NQO1	
	Δc_T^a	F ^b	Δc_T	F
Kontrolní potkani				
Ledviny	4,45 ± 0,36	-	9,37 ± 0,67	-
Plice	10,48 ± 0,16	-	5,44 ± 0,34	-
3-ABA premedikovaní potkani				
Ledviny	4,49 ± 0,06	1,0	9,07 ± 0,22*	1,2
Plice	10,02 ± 0,10**	1,4	4,97 ± 0,11**	1,4

^a ± směrodatná odchylka (SD) tří paralelních měření (kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných 40 mg 3-NBA/kg hmotnosti zvířete, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, F – násobek kontroly, Δc_T , počet cyklů do prahové hodnoty (Threshold cycle).

Indukce exprese mikrosomálního CYP1A1 a cytosolární NQO1 na úrovni mRNA byla po intraperitoneální premedikaci 3-ABA v porovnání nižší, než indukce exprese proteinů CYP1A1 a NQO1 a enzymové aktivity těchto proteinů. Podobné rozdíly mezi indukci NQO1 a CYP1A1 mRNA a hladinou exprese proteinů byly zaznamenány i v jaterní tkáni po aplikaci 3-ABA⁽¹⁵⁵⁾. Tyto výsledky naznačují, že některé induktory enzymů mohou prodlužovat poločas života mRNA, zatímco jiné induktory zvyšují transkripci. Kromě toho „poločasy života“ u mRNA jsou obvykle mnohem kratší než u proteinů.

Pro přehlednost i zde porovnáme naše výsledky z intraperitoneální premedikace 3-aminobenzanthronem v ledvinách a plicích potkana s výsledky získanými v předchozí studii, vypracované v naší laboratoři ⁽¹⁵⁵⁾.

Potenciál 3-aminobenzanthronu byl co do indukce CYP1A1 v játrech nižší než potenciál 3-nitrobenzanthronu indukovat tento protein ve všech studovaných orgánech. Při použití 40 mg 3-ABA na kg hmotnosti zvířete došlo k trojnásobnému nárůstu exprese CYP1A1 oproti kontrole. 3-NBA byl při stejné premedikační dávce více jak pět krát účinnější oproti 3-ABA. Zde došlo k 16-ti násobnému nárůstu exprese CYP1A1 oproti kontrole.

Porovnáme-li vliv 3-ABA na indukci exprese CYP1A1 ve všech třech studovaných orgánech, lze konstatovat, že k největšímu nárůstu exprese CYP1A1 došlo v ledvinách (4,8 násobný nárůst), dále v játrech (3 násobný nárůst) a nakonec v plicích (2,5 násobný nárůst).

Porovnáme-li indukční vliv 3-ABA a 3-NBA na expresi NQO1, můžeme říci, že 3-NBA byl v indukci opět účinnější než 3-ABA. Při použité premedikační dávce 40 mg 3-ABA na kg hmotnosti zvířete došlo v jaterním cytosolu ke 12-ti násobnému nárůstu exprese NQO1 oproti kontrole. U 3-nitrobenzanthronu byla zaznamenána 16-ti násobně vyšší exprese oproti kontrolnímu jaternímu cytosolu.

Podíváme-li se na účinnost indukce exprese NQO1 ve všech třech studovaných orgánech (játra, ledviny, plíce), po intraperitoneální premedikaci 3-ABA, můžeme říci, že nárůst její exprese v játrech byl po premedikaci 3-ABA nejvyšší. V plicích došlo rovněž k nárůstu exprese NQO1, ale v daleko menší míře (1,4 násobný nárůst exprese NQO1 oproti kontrole).

Hlavní rozdíl v indukčním potenciálu 3-ABA však shledáváme v případě indukce exprese NQO1 v ledvinách. Zde byl při použité premedikační dávce 4 a 40 mg/kg 3-ABA zaznamenán dokonce pokles exprese tohoto enzymu.

3-ABA je schopný indukovat CYP1A1 a NQO1 v plicní tkáni. Tato sloučenina také indukuje expresi CYP1A1 v ledvinné tkáni, ale neindukuje expresi NQO1 v ledvinách. Tento hlavní rozdíl v indukčním potenciálu 3-ABA přisuzujeme možné variantě, že v ledvinách dochází přednostně k indukci enzymů podílejících se na jeho vlastním metabolismu. Lze předpokládat, že indukci je pak usnadněno i vylučování této sloučeniny

z těla. Vliv premedikace 3-ABA na indukce enzymů cytochromů P450 a NQO1 se také projevuje na úrovni zvýšené exprese mRNA obou typů enzymů.

Výsledky studií uvedených v této kapitole jsou součástí publikací, které jsou v disertační práci uvedeny jako *přílohy 2 a 4*.

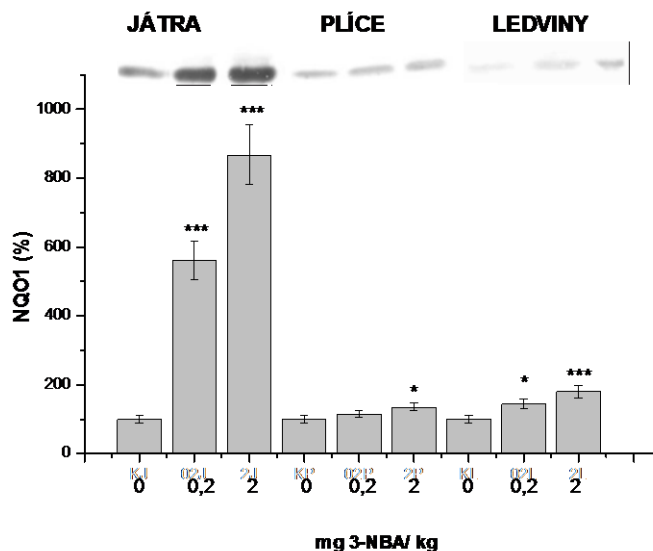
4.4.3 Studium vlivu 3-nitrobenzanthronu na expresi

NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1 a cytochromu P450 1A1 v jaterní, ledvinné a plicní tkáni potkana po intratracheální instilaci

Vedle sledování vlivu 3-nitrobenzanthronu na expresi cytosolárního enzymu NQO1 a mikrosomálního CYP1A1 v tkáních potkana po intraperitoneální aplikaci (viz předešlé kapitoly), sledovali jsme rovněž potenciál této látky indukovat uvedené biotransformační enzymy po intratracheální aplikaci 3-NBA. Důvodem volby tohoto intratracheálního způsobu aplikace 3-NBA, bylo přiblížit se co možná nejvíce skutečnému způsobu expozice 3-NBA, která probíhá u člověka, ve většině případů, inhalačně.

3-NBA byl aplikován samicím potkanů kmene Sprague-Dawley jednorázově, v dávkách 0,2 a 2 mg/kg 3-NBA. Dva dny po aplikaci 3-NBA byla zvířata usmrcena a následně jim byly odebrány játra, plíce a ledviny. Z těchto tkání premedikovaných a kontrolních potkanů byly izolovány mikrosomální a cytosolární frakce a dále charakterizovány. Exprese proteinů enzymů byla studována imunodetekcí za použití polyklonálních protilátek (kap. 3.6), kvantifikace byla provedena jako v předchozích stanoveních pomocí programu Elfoman. Výsledky z exprese NQO1 jsou uvedeny na obrázku 25, str. 83.

K nárůstu exprese proteinu NQO1 působením 3-NBA došlo ve všech studovaných tkáních. Největší nárůst exprese byl pozorován v jaterním cytosolu při premedikaci zvířat dávkou 2 mg/kg 3-NBA. Zde došlo k 8,7 násobnému nárůstu exprese NQO1 oproti kontrole. V ledvinách byl zaznamenán 1,8 násobný nárůst exprese NQO1 oproti kontrole. Nejmenší nárůst studovaného enzymu pak byl pozorován v plicním cytosolu potkanů, skoro 1,4 násobný nárůst exprese NQO1.



Obr. 25 Vliv intratracheální aplikace 3-NBA na obsah cytosolárního proteinu NQO1 v jaterní, ledvinové a plicní tkáni kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných 0,2 a 2 mg 3-NBA/kg hmotnosti zvířete. Stanovení hladiny proteinů bylo provedeno metodou „Western blotting“ (kap. 3.6). Imunoblotty cytosolární NQO1 byly detekovány protilátkou proti lidské NQO1. Denzitometrické vyhodnocení bylo provedeno programem Elfoman. Hodnoty v obrázku jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Pro potvrzení vlivu 3-nitrobenzanthronu na indukcí cytosolárního enzymu NQO1 byla ve všech jaterních cytosolech rovněž sledována aktivita NQO1 (viz kap. 3.5.5) (*Tabulka 14*). Nárůst aktivity NQO1 byl zjištěn v jaterním cytosolu po premedikaci jak 0,2 mg/kg tak i 2 mg/kg 3-NBA. Došlo až k sedminásobnému nárůstu aktivity tohoto enzymu oproti kontrole. V případě cytosolu ledvin a plic byla nalezena nízká aktivita NQO1, proto vliv indukce 3-NBA na aktivitu tohoto enzymu nebyl sledován.

Tabulka 14 Specifická aktivita NQO1 v jaterním cytosolu potkanů.

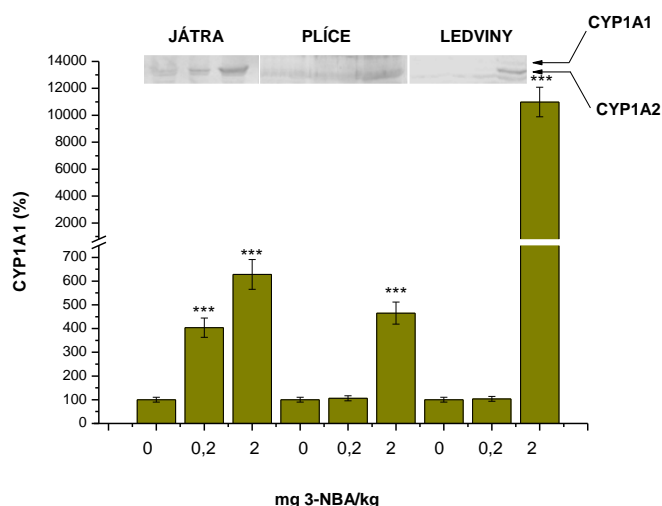
	Nepremedikovaní potkani	Potkani premedikovaní 3-NBA	
		0,2 mg/kg	2 mg/kg
Játra	237,63 ± 20,11	1136,08 ± 25,6*** (4,8)	1742,52 ± 31,70*** (7,3)

Jednotka pro aktivitu NQO1 je definovaná jako takové množství, které zredukuje 1 μmol cyt c /min/mg proteinu. Výsledky jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze čtyř paralelních měření. Hodnoty uvedené v závorce představují násobek kontroly, *** $p < 0.001$.

K indukci exprese CYP1A1 došlo ve všech třech studovaných tkáních (*Obr. 26, str. 84*). Největší nárůst indukce exprese CYP1A1 byl pozorován v ledvinách po premedikaci potkanů 2 mg/kg 3-NBA. Zde byl denzitometrickou kvantifikací „imunoblotu“ zjištěn dokonce 109-ti násobný nárůst indukce oproti kontrole. Tuto hodnotu

je však třeba brát pouze jako orientační. V kontrolním vzorku ledvinných mikrosomů byla totiž exprese CYP1A1 tak nízká (prakticky nebyla detekována), že mohla zkreslit celkový nárůst exprese působením 3-NBA. Nárůst exprese CYP1A1 v jaterní tkáni byl při premedikaci

2 mg/kg 3-NBA více jak 6-ti násobný oproti kontrole. V plicích došlo při premedikaci 2 mg/kg 3-NBA k pětinasobnému zvýšení exprese CYP1A1 oproti kontrole.



Obr. 26 Vliv intratracheální aplikace 3-NBA na obsah mikrosomálního proteinu CYP1A1 v jaterní, ledvinné a plicní tkáni kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných 0,2 a 2 mg 3-NBA/kg hmotnosti zvířete. Stanovení hladiny proteinů bylo provedeno metodou „Western blotting“ (kapitola 3.6). Imunoblotty mikrosomálního CYP1A1 byly detekovány specifickou protilátkou proti potkaní CYP1A1. Denzitometrické vyhodnocení bylo provedeno programem Elfoman. Hodnoty v obrázku jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření. * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$.

V jaterních mikrosomálních tkáních potkana byla také stanovena specifická aktivita CYP1A1, a to jak oxidací Sudanu I (*Tabulka 15*), tak i aktivitou CYP1A1 a 1A2, dealkylací 7-ethoxyresorufinu (EROD). Největší hodnota specifické aktivity CYP1A1 byla zjištěna v jaterních mikrosomech potkana premedikovaného 3-NBA, a to dávkou 2 mg 3-NBA/kg. Vzhledem k nízkým hodnotám aktivit CYP1A1 v mikrosomech ledvin a plic, nebylo jejich ovlivnění indukcí 3-NBA sledováno (*Tabulka 15*).

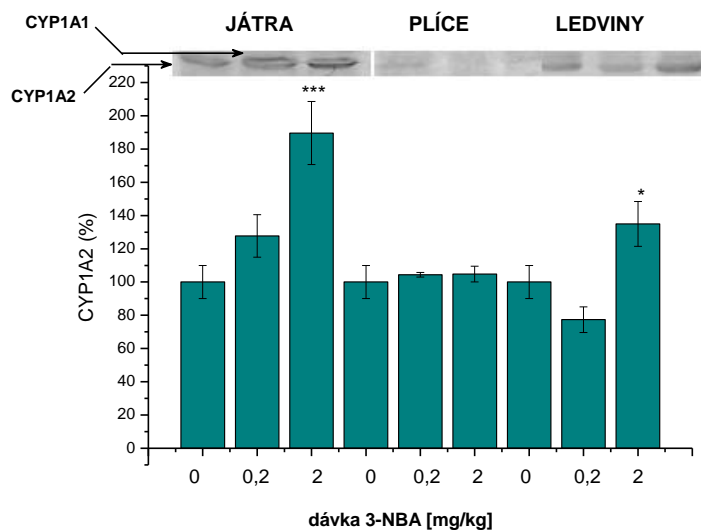
Tabulka 15 Specifická aktivita CYP1A1 v jaterních mikrosomech potkanů.

Aktivita CYP1A1	Játra		
	Nepremedikovaní potkani	Potkani premedikovaní 3-NBA	
		0,2 mg/kg	2 mg/kg
Oxidace Sudanu I	9,66 ± 1,0	13,35 ± 1,2 (1,4)	14,92 ± 1,5 (1,54)
EROD	10,53 ± 1,02	12,06 ± 1,19*** (1,2)	20,69 ± 1,82*** (2)

Každá hodnota (pmol reakčního produktu /min/mg proteinu) představuje průměr a směrodatnou odchylku určenou ze tří nezávislých stanovení. Hodnoty uvedené v závorce představují násobek kontroly, *** $p < 0.001$.

Výsledky ze stanovení aktivity CYP1A1/2 v jaterní tkáni kontrolního a premedikovaného potkana pomocí EROD jsou uvedeny v Tabulce 15, str. 84. K největšímu nárůstu aktivity došlo při premedikaci potkanů 2 mg/kg 3-NBA. Byl zde pozorován 2 násobný nárůst aktivity CYP1/2 oproti kontrole.

Při použití kuřecí protilátky proti CYP1A1, připravené Prof. Petrem Hodkem, CSc., došlo po vizualizaci enzymu v membráně k detekci dvou „proužků“ odpovídajících CYP1A. Dále byl na „imunoblotu“ ve vzorku ledvinných mikrosomů detekován „proužek“ proteinu přítomný těsně pod „proužkem“ proteinu příslušejícímu CYP1A1 (**Obr. 26, str. 84**). Dle vzdálenosti obou detekovaných „proužků“ (**Obr. 26, str. 84**) a s ohledem na molekulovou hmotnost CYP1A1 (cca 57 kDa) a molekulovou hmotnost CYP1A2 (cca 53 kDa) lze říci, že protilátka proti CYP1A1 se v tomto případě navázala i na vazebná místa pro CYP1A2. Expres CYP1A2 by tedy mohla být sledována i za použití protilátky proti CYP1A1. V další části práce jsme nicméně sledovali ovlivnění exprese CYP1A2 3-NBA za použití kuřecí protilátky proti potkanímu CYP1A2. Indukce exprese CYP1A2 byla detekována v jaterní a ledvinné tkáni. V plicní tkáni byla exprese CYP1A2 na hranici detekovatelnosti (**Obr. 27, str. 86**). K největšímu nárůstu indukce exprese CYP1A2 došlo v jaterní tkáni potkana premedikovaného dávkou 2 mg 3-NBA/kg, byl zde zjištěn 1,9-ti násobný nárůst oproti kontrole a v případě ledvin pak 1,3 násobný nárůst indukce exprese tohoto enzymu oproti kontrole (**Obr. 27, str. 86**). I v tomto případě došlo po vizualizaci enzymu v membráně k detekci dvou „proužků“ odpovídajících CYP1A. Nejintenzivnější zóny odpovídající CYP1A1 byly detekována ve vzorku jaterních mikrosomů.



Obr. 27 Vliv intratracheální aplikace 3-NBA na obsah mikrosomálního proteinu CYP1A2 v jaterní, ledvině a plicní tkáni potkana kontrolního a potkana premedikovaného 0,2 a 2 mg 3-NBA/ váhy zvířete. Stanovení hladiny proteinů bylo provedeno metodou „Western blotting“, kap. 3.6. Imunoblotty mikrosomálního CYP1A2 byly detekovány specifickou protilátkou proti potkaní CYP1A2. Denzitometrické vyhodnocení bylo provedeno programem Elfoman. Hodnoty v obrázku jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření. * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$.

Aktivita CYP1A2 byla stanovena pouze v jaterní tkáni potkana vzhledem k nízkým aktivitám v mikrosomech ledvin a plic, a to za použití specifické reakce demethylace 7-methoxyresorufinu (MROD), (*Tabulka 16*). Největší hodnota aktivity CYP1A2 byla zjištěna v jaterních mikrosomech potkana premedikovaného dávkou 2 mg 3-NBA na kg hmotnosti zvířete, došlo k 1,9-ti násobnému nárůstu aktivity CYP1A2 oproti kontrole. Při premedikaci 0,2 mg/kg 3-NBA bylo pozorován 1,3 násobné zvýšení aktivity CYP1A2 oproti kontrole.

Tabulka 16 Specifická aktivita CYP1A2 v jaterních mikrosomech potkanů, určená metodou MROD

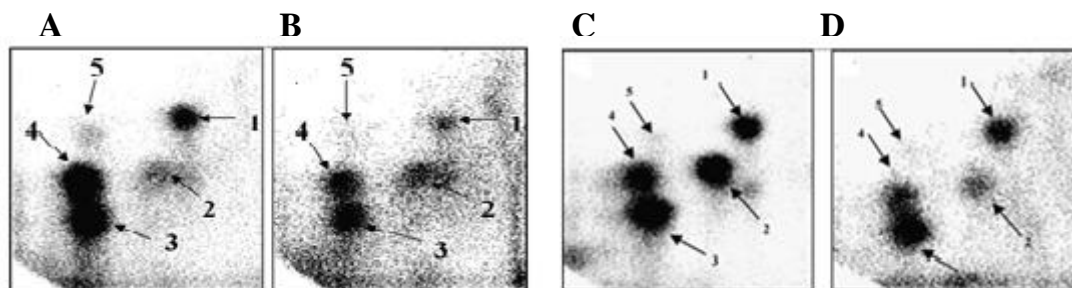
Játra	Nepremedikovaní potkani		Potkani premedikovaní 3-NBA
Aktivita CYP1A2			
MROD	10,12 ± 1,07	12,40 ± 1,31 (1,2)	18,80 ± 1,79*** (1,9)

Každá hodnota (pmol resorufinu/min/mg proteinu) představuje průměr a směrodatnou odchylku určenou ze tří nezávislých stanovení. Hodnoty uvedené v závorce představují násobek kontroly, *** $p < 0.001$.

Výsledky získané v této kapitole disertační práce jsou součástí rukopisu publikace, který je v disertační práci uveden jako *příloha 6*.

4.5 Aktivace 3-aminobenzanthronu a 3-nitrobenzanthronu za tvorby aduktů s DNA

Jak již bylo uvedeno v úvodní části této disertační práce, cytochromy P450 aktivují 3-aminobenzanthron za vzniku pěti majoritních kovalentních aduktů s DNA^(9, 10, 11, 13), které jsou shodné s adukty tvořenými z nitroaromatického prekursoru 3-ABA, 3-nitrobenzanthronu (*Obr. 28*).



Obr. 28 Autoradiografické snímky aduktů DNA generovaných 3-NBA (A) po aktivaci plicními cytosoly potkana premedikovaného 40 mg/kg 3-NBA a na obr. (B) aduktů tvořených po aktivaci 3-ABA plicními mikrosomy potkana (premedikovaného 40 mg/kg 3-NBA). Na obr. C je uvedena autoradiografie aduktů DNA generovaných 3-NBA po aktivaci plicním cytosolem (Premedikace 40 mg/kg 3-ABA), a aduktů generovaných 3-ABA plicními mikrosomy (40 mg/kg 3-ABA). Použita byla modifikace metody ³²P postlabelingu, (n-butanolová extrakce). Skvrny odpovídají jednotlivým aduktům. Skvrna označená 1 odpovídá aduktu (dA-N⁶-ABA), 2-(2'-deoxyadenosin-N⁶-yl)-3-aminobenzanthron; skvrna 3 odpovídá aduktu (dG-N²-ABA), N-(2'-deoxyguanosin-N²-yl)-3-aminobenzanthron a skvrny 4/5 aduktu (dG-C8-N-ABA), N-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthron.

V další části práce jsme sledovali vliv premedikace potkanů 3-NBA a 3-ABA na vlastní metabolickou aktivaci obou sloučenin (3-NBA a 3-ABA). Pro tyto experimenty byly použity mikrosomální a cytosolární systémy kontrolních zvířat a zvířat premedikovaných 3-NBA a 3-ABA.

Tvorba aduktů s DNA byla stanovena metodou ³²P-postlabeling školitelkou, Prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc. na spolupracujícím pracovišti Německého centra pro výzkum rakoviny v Heidelbergu.

4.5.1 Studium vlivu intraperitoneální aplikace 3-nitrobenzanthronu potkanům na jeho aktivaci cytosolárními a mikrosomálními frakcemi těchto zvířat

Výsledky získané v této části práce prokazují, že jak plicní, tak ledvinné cytosoly účinně redukovaly 3-NBA za tvorby aduktů s DNA (*Obr. 28 A, str. 87*). Ledvinný cytosol byl v aktivaci 3-NBA a v tvorbě množství aduktů efektivnější, asi 4-krát, než plicní cytosol. Dále jsme se zaměřili na objasnění, které plicní a ledvinné cytosolární reduktasy participují na tvorbě aktivovaného 3-NBA s DNA. K tomu bylo využito experimentů s kofaktory cytosolárních reduktas a inhibitorů těchto enzymů (dikumarol jako inhibitor NQO1 a alopurinol jako inhibitor xanthinoxidasy). V plicním cytosolu došlo k 6-ti násobně vyšší tvorbě 3-NBA aduktů s DNA než v reakční směsi bez kofaktoru NADPH (kofaktor NQO1). V případě xanthinoxidasy byl po přidavku jejího kofaktoru hypoxantinu zaznamenán 1,3 násobný nárůst tvorby aduktů s DNA oproti kontrole bez kofaktoru. Při použití ledvinného cytosolu došlo ke 2,7 násobnému nárůstu tvorby aduktů s DNA v přítomnosti kofaktoru NADPH/NADH. Zatímco přídavek hypoxantinu neměl vliv na tvorbu aduktů s DNA. Výsledky těchto experimentů ukazují (*Tabulka 17*), že majoritní roli v redukci 3-NBA zastává cytosolární NQO1. Získané výsledky jsou součástí publikace, které je uvedena v disertační práci jako *příloha 2*.

Tabulka 17 Vliv přídavku kofaktorů/inhibitorů na tvorbu duktů s DNA

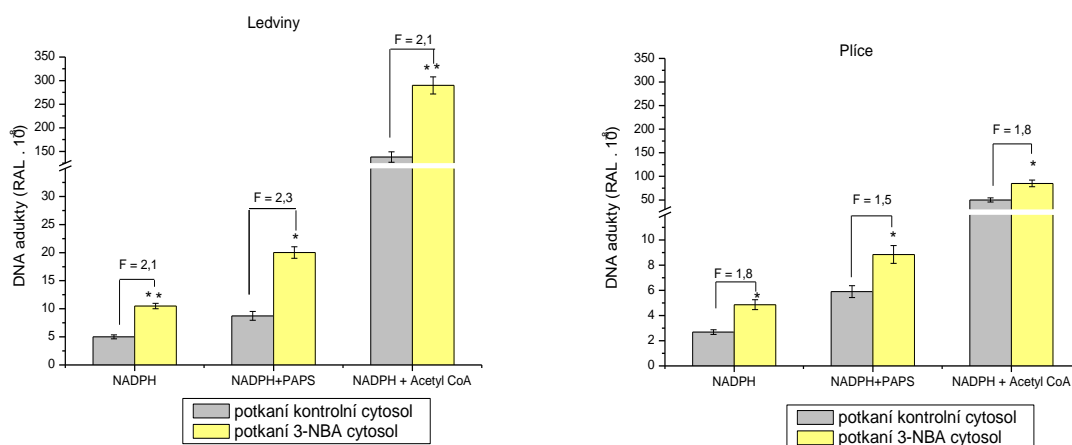
Kofaktor/přidaný inhibitor	Total RAL ^a 10 ⁸ nukleotidů	
	Plicní cytosol	Ledvinný cytosol
bez kofaktoru	0,44 ± 0,03	1,80 ± 0,15
NADPH	2,69 ± 0,19*	4,82 ± 0,36*
NADPH + dikumarol	0,29 ± 0,02*	0,33 ± 0,03*
hypoxantin	0,58 ± 0,05	1,78 ± 0,12
hypoxantin + alopurinol	0,59 ± 0,05	1,79 ± 0,20

^a RAL – podíl modifikovaných nukleotidů z celkového počtu nukleotidů („relative adduct labeling“), směrodatná odchylka (±SD) tří paralelních měření (kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných 40 mg 3-NBA/kg hmotnosti zvířete, **p*<0.001.

Vliv sulfotransferas a N-acetyltransferas, které se podílejí na aktivaci 3-NBA v cytosolu byl objasněn přídavkem jejich kofaktorů (PAPS pro sulfotransferasu a acetyl-SCoA pro N-acetyltransferasu) do jaterního a ledvinného cytosolu (*Obr. 29, str. 89*).

Aktivací 3-NBA ledvinným cytoelem docházelo k vyšší tvorbě aduktů 3-NBA s DNA než aktivací v plicním cytosolu. Inducí NQO1 působením 3-NBA došlo k nárůstu aktivity cytosolů ve tvorbě aduktů aktivovaného 3-NBA s DNA. A to jak za přídavku pouze kofaktoru NQO1, NADPH, tak i přidáním kofaktorů sulfottransferas a N-acetyltransferas (PAPS a acetyl~SCoA). Stimulace tvorby aduktů aktivovaného 3-NBA s DNA indukcí NQO1 byla vyšší v ledvinách než v plicích (**Obr. 29**).

V aktivaci 3-NBA nebyly, na rozdíl od cytosolů, účinné mikrosomy izolované z ledvin a plic potkanů. Tento výsledek naznačuje, že mikrosomální NADPH:CYP oxidoreduktasa a cytochromy P450 těchto orgánů pravděpodobně nejsou pro aktivaci 3-NBA v těchto orgánech dostatečně efektivní.



Obr. 29 Tvorba aduktů 3-NBA s DNA po aktivaci cytoelem kontrolních potkanů a cytoelem zvířat premedikovaných 40 mg/kg 3-NBA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření.

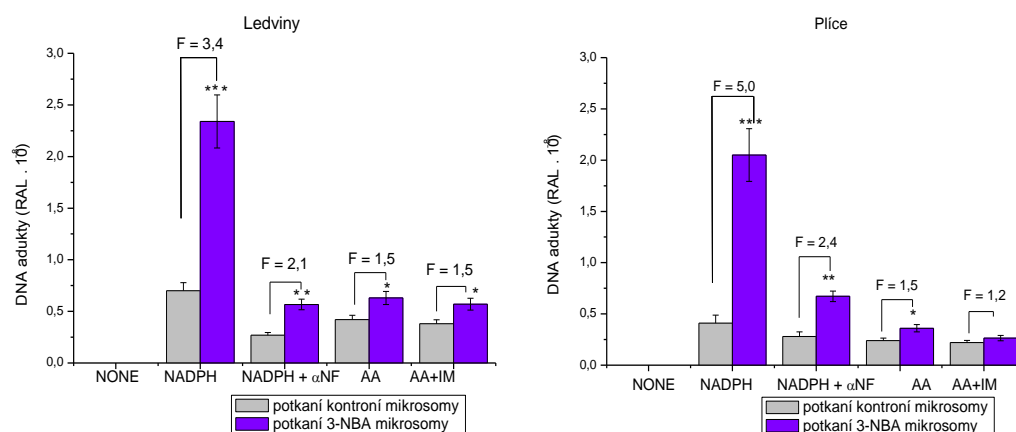
4.5.2 Studium vlivu intraperitoneální aplikace 3-nitrobenzanthronu potkanům na aktivaci 3-aminobenzanthronu mikrosomálními a cytosolárními frakcemi těchto zvířat

Na rozdíl od 3-NBA, 3-ABA byl aktivován ledvinnými a plicními mikrosomy za tvorby aduktů s DNA (**Obr. 28 B, str. 87**). Pro studium tvorby aduktů s DNA byly použity mikrosomy potkana premedikovaného dávkou 40 mg/kg 3-ABA a zvířat kontrolních (nepremedikovaných). Nejprve jsme opět sledovali vliv kofaktorů a selektivních inhibitorů mikrosomálních enzymů na tvorbu aduktů DNA s 3-ABA. V přítomnosti NADPH,

kofaktoru systémů s cytochromy P450 docházelo při použití plicních a ledvinných mikrosomů k tvorbě aduktů 3-aminobenzanthronu s DNA. Rovněž arachidonová kyselina, jako kofaktor cyklooxygenas ovlivňovala tvorbu aduktů s DNA, avšak v daleko menší míře než NADPH. Tyto výsledky signalizují vyšší úlohu cytochromů P450 než cyklooxygenas v obou tkáních. Za přítomnosti NADPH plicní a ledvinné mikrosomy potkanů premedikovaných 3-NBA vykazovaly 5 krát a 3,4 krát vyšší efektivitu aktivace 3-ABA než mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) zvířat (**Obr. 30**).

Přídavek α -naftoflavonu, jako selektivního inhibitoru CYP1A, do inkubačních směsí snižoval hladiny aduktů s DNA. Inhibiční efekt α -naftoflavonu byl v ledvinných a plicních mikrosomech premedikovaných potkanů daleko vyšší než v případě kontrolních mikrosomů. Tyto výsledky prokazují majoritní roli CYP1A při aktivaci 3-ABA za tvorby aduktů s DNA v plicích a ledvinách.

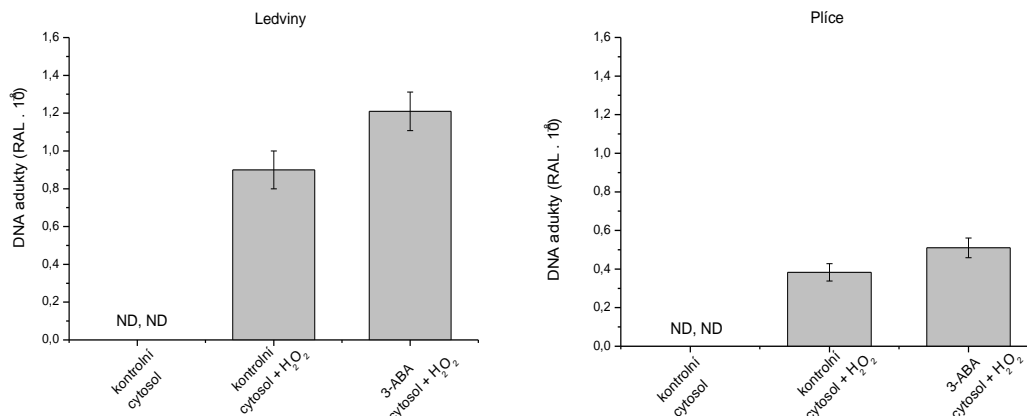
Vedle cytochromů P450 mohou hrát úlohu v aktivaci 3-ABA mikrosomy obou tkání také peroxidasy, cyklooxygenasy (COX). I když kofaktor COX (arachidonová kyselina) stimuloval tvorbu aduktů, a naopak inhibitor COX, indomethacin aktivaci 3-ABA snižoval (**Obr. 30**), úloha tohoto enzymu v aktivaci 3-ABA je jednoznačně nižší než role cytochromů P450.



Obr. 30 Tvorba aduktů 3-ABA s DNA po aktivaci mikrosomy kontrolních potkanů a mikrosomy potkanů premedikovaných 40 mg/kg 3-NBA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření.

Za přítomnosti peroxidu vodíku, kofaktoru cytosolárních peroxidas, docházelo rovněž k aktivaci 3-ABA za vzniku aduktů s DNA (**Obr. 31, str. 91**). Při použití plicního cytosolu došlo ke vzniku všech pěti aduktů 3-ABA s DNA (**Obr. 28 B, str. 87**), zatímco

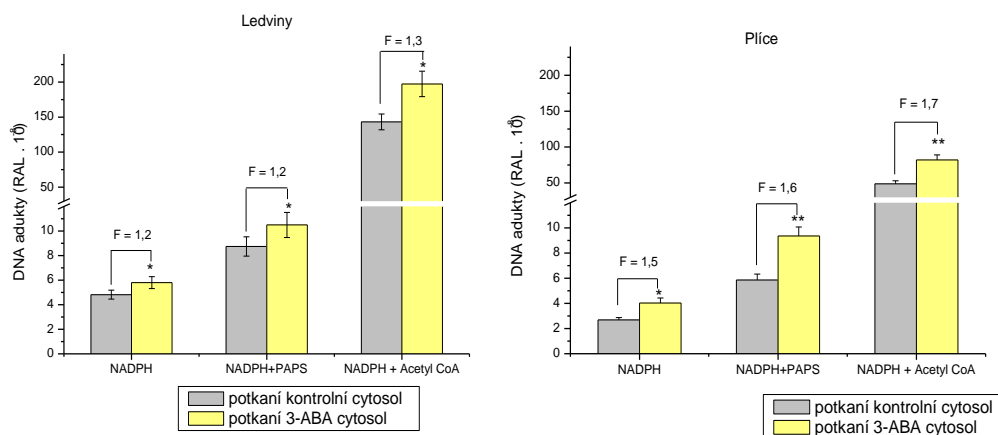
v ledvinném cytosolu docházelo ke vzniku pouze čtyř aduktů. (Data jsou uvedena v publikaci, která je přílohou č. 2 disertační práce).



Obr. 31 Tvorba aduktů 3-ABA s DNA po aktivaci cytosolem kontrolních potkanů a cytosolem potkanů premedikovaných 40 mg/kg 3-NBA. Hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření.

4.5.3 Studium vlivu intraperitoneální aplikace 3-aminobenzanthronu potkanům na aktivaci 3-nitrobenzanthronu cytosolárními a mikrosomálními frakcemi těchto zvířat

Obdobně s výsledky získanými v předchozí kapitole, jak plicní tak ledvinné cytosoly účinně redukovaly 3-NBA za tvorby aduktů s DNA (*Obr. 28 C, str. 87*). Plicní cytosol potkanů premedikovaných dávkou 40 mg/kg 3-ABA byl daleko efektivnější v tvorbě aduktů aktivovaného 3-nitrobenzanthronu s DNA za přítomnosti NADPH, kofaktoru NQO1 než při použití kontrolního cytosolu (*Obr. 32, str. 92*). Byl zde pozorován 1,5 násobný nárůst tvorby aduktů s DNA z 3-nitrobenzanthronu oproti kontrolnímu cytosolu. Při aktivaci 3-NBA ledvinným cytosolem (indukovaným 40 mg/kg 3-ABA) byl při přidavku NADPH pozorován 1,2 násobný nárůst tvorby aduktů 3-NBA s DNA oproti aktivaci cytosolem izolovaným z nepremedikovaných zvířat (*Obr. 32, str. 92*). Dále byl, podobně jako v předechozí kapitole, studován přidavek PAPS a acetyl-SCoA, jako kofaktorů sulfotransferas a N-acetyltransferas. Tyto enzymy se podílejí na zvýšení aktivace 3-NBA.



Obr. 32 Tvorba aduktů 3-NBA s DNA po aktivaci cytoelem kontrolních potkanů a cytoelem potkanů premedikovaným 40 mg/kg 3-ABA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření.

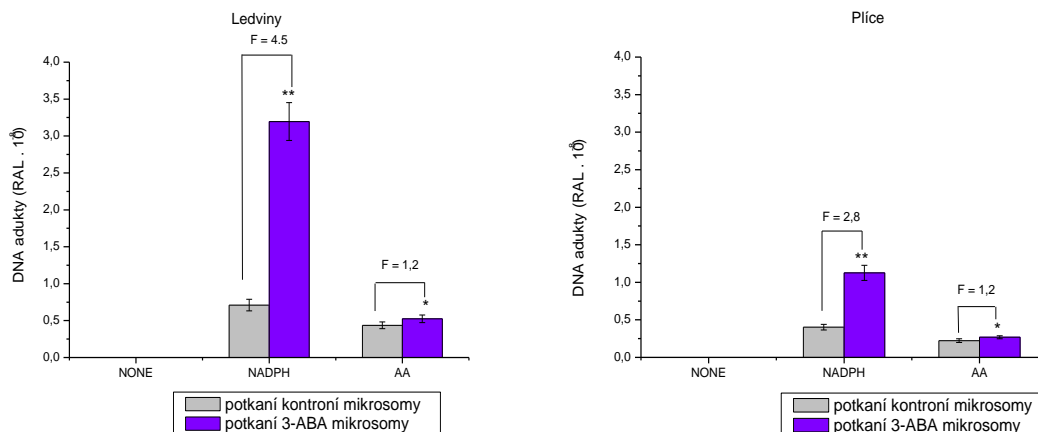
Při použití mikrosomálních frakcí izolovaných z orgánů zvířat indukovaných 3-ABA nebyla pozorována tvorba aduktů 3-nitrobenzanthronu s DNA.

4.5.4 Studium vlivu intraperitoneální aplikace 3-aminobenzanthronu potkanům na jeho aktivaci cytosolárními a mikrosomálními frakcemi těchto zvířat

Všechny použité plicní a ledvinné mikrosomální frakce aktivovaly 3-ABA za vzniku pěti aduktů s DNA, shodných s adukty tvořenými aktivovaným 3-NBA (**Obr. 28 D, str. 87**).

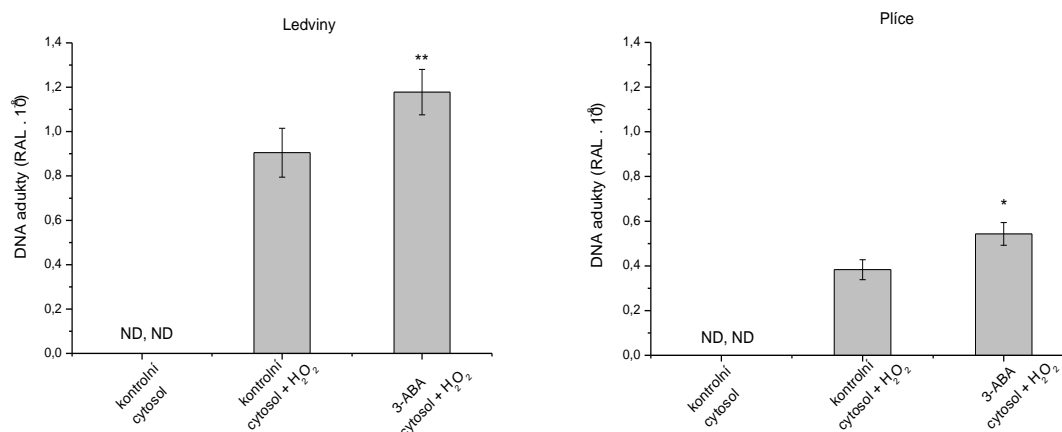
Pro studium tvorby aduktů s DNA byly použity mikrosomy potkana premedikovaného dávkou 40 mg/kg 3-ABA a mikrosomy zvířat kontrolních. Opět byl i zde studován vliv kofaktorů na vznik tvorby těchto aduktů. Pokud byl k plicním a ledviným mikrosomům indukovaným 3-ABA přidán jako kofaktor NADPH, došlo k nárůstu tvorby aduktů 3-ABA s DNA. V ledvinách byl pozorován 4,5 násobný nárůst tvorby aduktů 3-ABA s DNA oproti množství aduktů vzniklých aktivací mikrosomy kontrolních potkanů. V indukovaných plicních mikrosomech byl po přidání NADPH do reakční směsi rovněž pozorován nárůst tvorby aduktů 3-ABA s DNA, ale menší než v případě aktivace ledvinnými mikrosomy (2,8 násobný nárůst oproti mikrosomům kontrolním, **Obr. 33, str. 93**). Dalším studovaným kofaktorem, přidávaným jak k indukovaným, tak i ke kontrolním plicním a ledviným mikrosomům, byla arachidonová

kyselina, kofaktor cyklooxygenasy. I v tomto reakčním uspořádání byla zaznamenána tvorba aduktů 3-ABA s DNA, avšak v daleko menší míře než při použití NADPH (*Obr. 33*), potvrzující výsledky uvedené v předchozí kapitole.



Obr. 33 Tvorba aduktů 3-ABA s DNA po aktivaci mikrosomy kontrolních potkanů a mikrosomy potkanů premedikovaným 40 mg/kg 3-ABA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření.

Potkaní plicní a ledvinný cytosol aktivoval 3-ABA za vzniku aduktů s DNA pouze v přítomnosti peroxidu vodíku, substrátu cytosolárních peroxidas (*Obr. 34*). Při použití plicního cytosolu došlo ke vzniku všech pěti aduktů 3-ABA s DNA (*Obr. 28 D, str. 87*), zatímco při použití ledvinného cytosolu vznikaly pouze čtyři adukty 3-ABA s DNA. Výsledky jsou uvedeny v publikaci, která je přílohou číslo 4 této práce.



Obr. 34 Tvorba DNA aduktů s 3-ABA po aktivaci kontrolním cytosolem a cytosolem premedikovaným 40 mg/kg 3-ABA, * $p < 0.05$. Hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření.

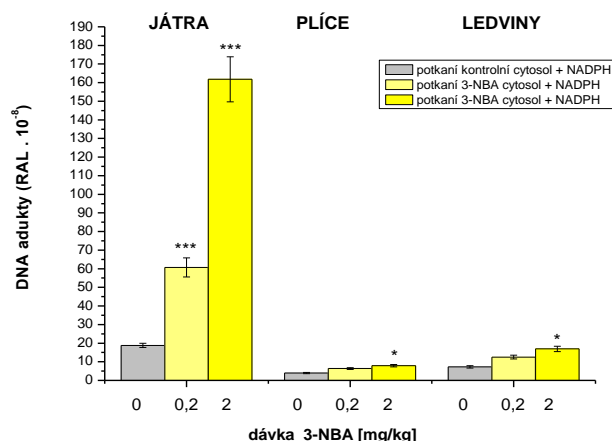
Detailní výsledky studií uvedených v kapitole 4.5 jsou součástí publikací, které jsou v disertační práci uvedeny jako *přílohy 2 a 4*.

4.5.5 Studium vlivu intratracheální instilace 3-nitrobenzanthronu potkanům na jeho aktivaci cytosolárními a mikrosomálními frakcemi těchto experimentálních zvířat

Pro studium tvorby aduktů s DNA byly použity mikrosomy izolované z potkanů kmene Sprague-Dawley instilovaných dávkou 0,2 mg 3-NBA/kg 2 mg 3-NBA/kg a taktéž mikrosomy zvířat kontrolních. Bylo zjištěno, že jaterní, ledvinné a plicní cytosolární frakce potkanů, redukčně aktivovaly 3-NBA za vzniku aduktů 3-NBA s DNA.

Z kontrolních cytosolů, nepremedikovaných potkanů, byl v tvorbě aduktů 3-NBA s DNA nejefektivnější jaterní cytosol (*Obr. 35, str. 95*). Cytosolární frakce všech studovaných orgánů zvířat premedikovaných 3-NBA byly v tvorbě aduktů s DNA efektivnější, než cytosoly izolované z kontrolních potkanů. Nejúčinnějším v tvorbě aduktů 3-NBA s DNA byl jaterní cytosol izolovaný z potkanů premedikovaných 2 mg 3-NBA/kg, došlo zde až k 9-ti násobnému nárůstu tvorby aduktů oproti kontrolnímu cytosolu.

V této části práce jsme porovnávali také účinnosti mikrosomálních frakcí potkana izolovaných z jater, plic a ledvin, a to jak potkanů kontrolních, tak premedikovaných 3-NBA (0,2 a 2 mg/kg), aktivovat 3-NBA. Zjistili jsme, že jaterní mikrosomy potkana kontrolního a taktéž mikrosomy potkana premedikovaného 3-NBA aktivují 3-NBA za tvorby aduktů s DNA. Při použití mikrosomů premedikovaných 3-NBA byl zaznamenán téměř dvojnásobný nárůstu tvorby aduktů s DNA oproti kontrolním mikrosomům. Jak bylo zjištěno v předešlých studiích⁽¹³⁾ cytochromy P450 1A1/2 jsou v aktivaci 3-NBA účinné. Nárůst tvorby aduktů s DNA je tedy zřejmě způsoben indukci (navýšením hladin) těchto enzymů. Oproti aktivaci 3-NBA jaterními mikrosomy, plicní a ledvinné mikrosomy byly v tvorbě aduktů neúčinné (data nejsou uvedena). Uvedené výsledky naznačují, že hladina mikrosomální NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktasy a/nebo cytochromů P450 není v extrahepatálních orgánech zastoupena v dostatečném množství, aby byly tyto enzymy do aktivace 3-NBA zapojeny.

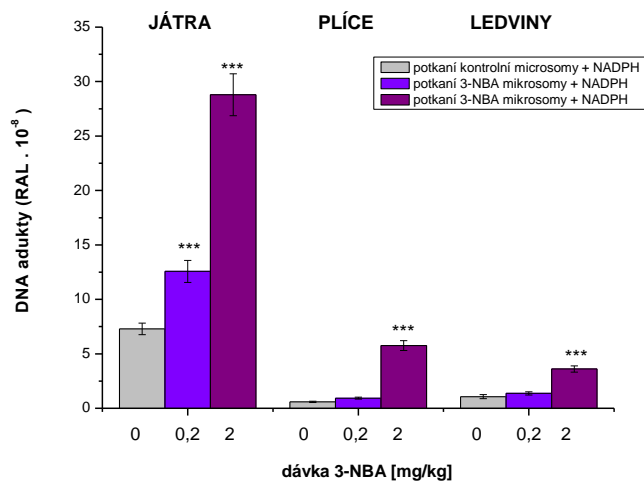


Obr. 35 Tvorba aduktů 3-NBA s DNA po aktivaci cytosoly kontrolních potkanů a cytosoly potkanů instilovaných dávkou 0,2 a 2 mg/kg 3-NBA, * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$. Hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření.

4.5.6 Studium vlivu intratracheální instilace 3-nitrobenzanthronu potkanům na aktivaci 3-aminobenzanthronu mikrosomálními frakcemi těchto experimentálních zvířat

Mikrosomy izolované ze všech studovaných tkání premedikovaných laboratorních zvířat aktivují 3-ABA za vzniku aduktů s DNA. V přítomnosti kofaktoru cytochromů P450, NADPH byl zaznamenán nárůst tvorby aduktů s DNA oproti mikrosomům izolovaným z kontrolních, nepremedikovaných potkanů (*Obr. 36, str. 96*). Jaterní mikrosomy kontrolních potkanů vykazovaly 6-ti násobný nárůst tvorby aduktů oproti aduktům tvořených z ledvinných mikrosomů, a dokonce 12-ti násobný nárůst tvorby aduktů 3-ABA s DNA oproti aduktům tvořených z plicních mikrosomů (*Obr. 36, str. 96*)

U jaterních mikrosomů izolovaných z potkanů premedikovaných 2 mg 3-NBA/kg byl zaznamenán čtyřnásobný nárůst tvorby aduktů 3-ABA s DNA oproti kontrolním mikrosomům. Plicní mikrosomy premedikovaného potkana vykazovaly více jak trojnásobně vyšší účinnost v tvorbě aduktů 3-ABA s DNA. Největší nárůst v tvorbě aduktů oproti kontrole byl pozorován u ledvinných mikrosomů potkana premedikovaných 2 mg 3-NBA/kg (*Obr. 36, str. 96*).



Obr. 36 Tvorba aduktů 3-ABA s DNA po aktivaci microsomy kontrolních potkanů a microsomy potkanů instilovaných dávkou 0,2 a 2 mg/kg 3-NBA, *** $p < 0.001$. Hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření.

5 SOUHRN A ZÁVĚR

Předkládaná disertační práce přispívá k rozšíření znalostí v oblasti studia oxidace metabolitu karcinogenní sloučeniny 3-nitrobenzanthronu, 3-aminobenzanthronu. Přispívá též k poznání funkce cytochromů P450 participujících na oxidaci výše uvedené sloučeniny. V neposlední řadě rozšiřuje znalosti v oblasti studia 3-nitrobenzanthronu a jeho potenciálu indukovat biotransformační enzymy, které participují na jeho vlastní přeměně a přeměně jeho metabolitu, 3-aminobenzanthronu. Rozvíjí tak široké spektrum biochemických poznatků. Nejdůležitější výsledky zjištěné v disertační práci lze shrnout následovně:

3-Aminobenzanthron je oxidován jaterními mikrosomálními systémy potkana

Metabolismus 3-aminobenzanthronu byl studován jaterními mikrosomálními systémy potkana premedikovaného vybranými induktory cytochromů P450 v podmínkách *in vitro*. 3-Aminobenzanthron je přeměňován na tři metabolity, N-hydroxy-3-aminobenzanthron (N-OH-ABA), 3-NBA a metabolit s dosud neurčenou strukturou, označovaný jako metabolit M18. Nejúčinnější v oxidaci 3-aminobenzanthronu je mikrosomální systém potkana premedikovaného fenobarbitalem (induktor CYP2B), přičemž u tohoto systému předpokládáme detoxikační metabolickou cestu. Dalším vysoce efektivním systémem v oxidaci 3-ABA byl mikrosomální systém potkana premedikovaného pregnenolon-16 α -karbonitrilem (induktor CYP3A1/2), následovaný mikrosomálním systémem potkana premedikovaného β -naftoflavonem (induktor CYP1A1/2). Získané výsledky prokazují participaci CYP1A, 2B a 3A na metabolismu 3-ABA. Pro potvrzení těchto výsledků byly provedeny inhibiční studie se selektivními inhibitory cytochromů P450. I výsledky z těchto studií potvrzují, že v oxidaci 3-ABA jaterními mikrosomy hrají nejdůležitější roli cytochromy P450 1A, 2B a 3A.

Potkaní a lidské rekombinantní cytochromy P450 oxidují 3-aminobenzanthron

V případě potkaních rekombinantních cytochromů P450 dominovala v oxidaci 3-ABA podrodina cytochromů P450 3A, následovaná podrodinou 1A. Lidské rekombinační cytochromy P450 také oxidují 3-ABA, přičemž nejefektivnější byly orthologní cytochromy P450, jmenovitě P450 3A a 1A. Cytochrom b₅ stimuloval oxidaci 3-ABA těmito enzymy. 3-Aminobenzanthron je rovněž oxidován potkaním CYP2C11 a lidským CYP2D6.

3-Aminobenzanthron je oxidován peroxidasami

Nejefektivnější v oxidaci 3-ABA je křenová peroxidasa, následovaná živočišnými peroxidasami myeloperoxidasou a laktoperoxidasou.

3-Nitrobenzanthron indukuje expresi biotransformačních enzymů v ledvinách a plicích po intraperitoneální premedikaci

Vystavení organismu laboratorního potkana 3-nitrobenzanthronu (i.p.) vede k signifikantnímu zvýšení exprese i enzymových aktivit CYP1A1 a NQO1 v ledvině a plicní tkáni potkana. 3-NBA tedy působí jako účinný induktor těchto enzymů. Vlivem indukce dochází k navýšení redukce 3-NBA a oxidace 3-ABA, a tím následně ke zvýšené tvorbě aduktů 3-NBA a 3-ABA s DNA.

3-Aminobenzanthron indukuje biotransformační enzymy v ledvinách a plicích po intraperitoneální premedikaci

Intraperitoneální aplikace 3-aminobenzanthronu laboratorním potkanům rovněž vedla k signifikantnímu zvýšení exprese i aktivit CYP1A1 a NQO1 v plicní tkáni tohoto experimentálního modelu. V případě ledviné tkáně byl zaznamenán nárůst hladiny exprese pouze u CYP1A. 3-ABA je tedy též induktorem těchto enzymů, avšak méně účinným než je 3-nitrobenzanthron. Vlivem indukce biotransformačních enzymů pak dochází k navýšení redukce 3-NBA a oxidace 3-ABA, a tím následně ke zvýšené tvorbě aduktů 3-NBA a 3-ABA s DNA.

3-Nitrobenzanthron indukuje biotransformační enzymy v játrech, ledvinách a plicích po intratracheální instilaci

3-Nitrobenzanthron zvyšuje expresi i enzymové aktivity CYP1A1 a NQO1 v jaterní, ledvině i plicní tkáni potkana i po intratracheální instilaci touto karcinogenní látkou (0,2 a 2 mg 3-NBA/kg). Zvolená intratracheální instilace simuluje přirozenou expozici lidské populace 3-NBA, kdy běžně dochází k jeho expozici prostřednictvím dýchacích cest (inhalačně). 3-Nitrobenzanthron zvyšoval i hladinu CYP1A2, a to především v jaterní tkáni potkana. Působí tedy i touto formou expozice jako účinný induktor studovaných biotransformačních enzymů. Vlivem uvedené indukce dochází rovněž k významnému zvýšení redukce 3-NBA a oxidace 3-ABA, a tím následně ke zvýšené tvorbě aduktů 3-NBA a 3-ABA s DNA.

Jak je z výše uvedeného souhrnu patrné, předkládaná disertační práce přináší originální vědecké poznatky na poli studia metabolismu karcinogenních látek a indukce biotransformačních enzymů. Část těchto poznatků již byla také publikována formou časopiseckých publikací ve vědeckých periodikách. Takto bylo publikováno 5 prací, které tvoří součást disertační práce jako přílohy 1-5. Jedna práce je pak k publikaci připravována (viz rukopis publikace v přípravě uvedený jako příloha 6).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Adachi, S., Kawanura, K., Takemoto, K., Suzuki, H., Hisamatsu Y.: *Relationship between respiratory disease and exposure to air pollution* (Heinrich, U., Dungworth, D. L., Brain, J. D., Droscoll, K. E., Grafstorm, R. C., Harris, C. C., Mohr, U., Eds), ILSI Press, Washington, D.C (2000)
2. Aitken, A. E., Richardson, T. A., Morgan, E. T.: *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 46, 123-149 (2006)
3. Anari, M. R., Khan, S., Jatoe, S. D., O'Brien, P. J.: *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 22, 305-310 (1997)
4. Andersson, L. A., Bylka, S. A., Wilson, A. E.: *J Biol Chem*, 271, 3406-3412 (1996)
5. Anzenbacher, P., Dawson, J. H., Kitagawa, T.: *J Mol Struct*, 214, 149-158 (1989)
6. Arlt, V. M., Bieler, C. A., Mier, W., Weissler, M., Schmeiser, H. H.: *Int J Cancer*, 93, 450-454 (2001)
7. Arlt, V. M., Colin, J. H., Wolf, R. C., Schmeiser, H. H., Phillips, D. H., Stiborova, M.: *Cancer Lett*, 234, 220-231 (2006)
8. Arlt, V. M., Glatt, H. R., Muckel, E., Pabel, U., Sorg, B. L., Seidel, A., Frank, H., Schmeiser, H. H., Phillips, D. H.: *Int J Cancer*, 105, 583-592 (2003)
9. Arlt, V. M., Glatt, H., Muckel, E., Pabel, U., Sorg, B. L., Schmeiser, H. H., Phillips, D. H.: *Carcinogenesis*, 23, 1937-1945 (2002)
10. Arlt, V. M., Hewer, A., Sorg, B. L., Schmeiser, H. H., Phillips, D. H., Stiborova, M.: *Chem Res Toxicol*, 17, 1092-1101 (2004)
11. Arlt, V. M., Sorg, B. L., Osborne, M., Hewer, A., Seidel, A., Schmeiser, H. H., Phillips, D. H.: *Biochem Biophys Res Commun*, 300, 107-114 (2003)
12. Arlt, V. M., Stiborova, M., Henderson, C. J., Osborne, M. R., Bieler, C. A., Frei, E., Martinek, V., Sopko, B., Wolf, C. R., Schmeiser, H. H., Phillips, D. H.: *Cancer Res*, 65, 2644-2652 (2005)
13. Arlt, V. M., Stiborova, M., Hewer, A., Schmeiser, H. H., Phillips, D. H.: *Cancer Res*, 63, 2752-2761 (2003)
14. Arlt, V. M., Zhan, L., Schmeiser, H. H., Honma, M., Hayashi, M., Phillips, D. H., Suzuki, T.: *Envir Mol Mutagen*, 43, 186-195 (2004)
15. Arlt, V. M.: *Mutagenesis*, 20, 399-410 (2005)

16. Banci, L.: *J. Biotechnol*, 53, 253-263 (1997)
17. Belinsky, M., Jaiswal, A. K.: *Cancer Metastasis Rev*, 12, 103-117 (1993)
18. Bend, J. R., Foureman, C. L.: *Mar Environ Res*, 14, 405-406 (1984)
19. Benigni, R., Andreoli, C., Giuliani, A.: *Environ Mol Mutagen*, 24, 208-219 (1994)
20. Benson, A. M., Hunkeler, M. J., Talalay, P.: *Proc Natl Acad Sci USA*, 77, 5216-5220 (1980)
21. Bieler, C. A., Arlt V. M., Wiessler, M., Schmeiser, H. H.: *Cancer Lett*, 200, 9-18 (2003)
22. Bieler, C. A., Wiessler, M., Erdinger, L., Suzuki, H., Enya, T., Schmeiser, H. H.: *Mutat Res*, 439, 307-311 (1999)
23. Borchert, R., Decedue, C. J.: *Plant Physiol*, 62, 794-797 (1978)
24. Borlak, J., Hansen, T., Yuan, Z., Sikka, H. C., Kumar, S., Schmidbauer, S., Franh, H., Jacob, J., Seidel, A.: *Polycyclic Arom Compounds*, 21, 73-80 (2000)
25. Burke, M. D., Thompson, S., Elcombe, C. R., Halpert, J., Haaparanta, T., Mayer, R.T.: *Biochem Pharmacol*, 34, 3337-3345 (1985)
26. Burke, M. D., Thompson, S., Weaver, R. J., Wolf, C. R., Mayer, R. T.: *Biochem Pharmacol*, 45, 923-936 (1994)
27. Clarke, J., Shannon, L. M.: *Biochim Biophys Acta*, 427, 428-442 (1976)
28. Coon, M. J., Persson, A. V.: *Enzymatic basis of detoxification I*, Academic Press. New York (1980)
29. Coon, M. J.: *Nutr Rev*, 36, 319-328 (1978)
30. Cotreau, M. M., von Moltke, L. L., Greenblatt, D. J.: *Clin Pharmacokinet*, 44, 33-60 (2005)
31. Dahl, A. R., Hadley, W. M.: *Toxicol Appl Pharm*, 67, 200-205 (1983)
32. Danaei, G., Vander, H. S., Lopez, A. D., Murray, C. J., Ezzati, M.: *Lancet*, 366, 1784-1793 (2005)
33. De Long, M. J., Santamaria, A. B., Talay, P.: *Carcinogenesis*, 8, 1549-1553 (1987)
34. De Long, M. J., Prochaska, H. J., Talay, P.: *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 787-791 (1986)
35. Debies-Rychter, M., Land, S. J., King, C. M.: *Cancer Res*, 56, 1517-1525 (1996)
36. Debnath, A. K., Debnath, G., Shusterman, A. J., Hansch, C.: *Environ Mol Mutagen*, 19, 37-52 (1992)
37. Dickins, M.: *Curr Top Med Chem*, 4, 1745-1766 (2004)

38. Djuric, Z., Fifer, E., K., Yamazoe, Y., Beland, F., A.: *Carcinogenesis* 9, 357 (1988)
39. Dunford, H. B., Heme Peroxidases, Wiley-VCH, New York (1999)
40. Edwards R. J., Murray B. P., Singleton A. M., Boobis A. R.: *Biochemistry*, 30, 71-76 (1991)
41. Enya, T., Suzuki T., Watanabe, T., Hirayama, T., Hisamatsu, Y.: *Environ Sci Technol*, 31, 2772-2776 (1997)
42. Ernster, L.: *Methods Enzymol*, 10, 309-317 (1967)
43. Ernster, L., Liunggren, M., Danielson, L.: *Biochem Biophys Res Commun*, 2, 88-92. (1960)
44. Ernster, L., Navazio, F.: *Acta Chem Scand*, 12, 595-602 (1958)
45. Felsted, R. L., En-Yuen Chu, A., Chaykin, S.: *J Biol Chem*, 7, 2580-2587 (1973)
46. Ferlay, J., Parkin, D. M., Steliarova-Foucher, E.: *Eur J Cancer*. 46, 765-781 (2010)
47. Fuhr, U.: *Clin Pharmacokinet*, 38, 493-504 (2000)
48. Fujiyama, K., Takemura, H., Shinmyo, A., Ohada, H., Takano, M.: *Gene* 89, 163-169 (1990)
49. Garfinkel, D.: *Arch Biochem Biophys*, 77, 493-509 (1958)
50. Guengerich, F. P.: *Cytochrome P450* (Ortiz de Montenallos, P. D., ed.) Plenum Press, New York, (1995)
51. Guengerich, F. P.: *Drug Metab Rev*, 34, 607-623 (2002)
52. Guengerich, F. P.: *Chem Res Toxicol*, 21, 70-83 (2008)
53. Gut I., Souček P., Hodek P.: *Pracovní lékařství* 1, 15 (1992)
54. Hajos, K. D., Winston, G. W.: *Carcinogenesis*, 12, 697-702 (1991)
55. Halliwell, B.: *Febs Lett*, 96, 238-42 (1978)
56. Hein, D. W., Ruston, T. D., Ferguson, R. J., Dole, M. A., Gray, K.: *Arch Toxicol*, 68, 129-133 (1994)
57. Heinemann, F. S., Ozols, J.: *J. Biol Chem*, 258, 4195-4201 (1983)
58. Hodgson, E., *A Textbook of modern Toxicology*, Willey and Son Int., New Jersey (2004)
59. Hoffmann, D., Hoffmann, I., El-Bayoumy, K.: *Chem Res Toxicol*, 14, 767-790 (2001)

60. Howard, P., C., Beland, F., A.: *Biochem Biophys Res Commun*, 104, 727-732 (1982)
61. Hoyle, M. C.: *Plant Physiol*, 60, 787-793 (1977)
62. <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>
63. <http://eu-cancer.iarc.fr/country-203-czech-republic.html,en>, staženo dne 15.7.2010
64. <http://monographs.IARC.fr/>, staženo dne 17.7.2010
65. http://www.mcw.edu/biochemistry/Jung_Ja_Kim.html, staženo dne 22.7.2010
66. <http://www.metallo.scrips.edu/PROMISE/>, staženo dne 5.7.2010
67. <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>, staženo dne 6.7.2010
68. <http://www.rcsb.org.pdb/explore.do?structureID=1ATM> staženo dne 22.7.2010
69. http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_enzymology.htm, staženo dne 5.7.2010
70. Huang, M. T., Miwa, G. T., Cronheim, N., Lu, A. Y. H.: *J Biol Chem*, 254, 11223-11227 (1979)
71. Hudeček, J., Baumruk, V., Anzenbacher, P., Munro, A.: *Biochem Biophys Res Commun*, 243, 811-815 (1998)
72. Hukkanen, J., Pelkonen, O, Hakkola, J., Raunio, H.: *Crit Rev Toxicol*, 32, 391-411 (2002)
73. Chae, Y., Thomas, T., Guengerich, F. P., Fu, P. P., El-Bayoumy, K.: *Cancer Res*, 59, 1473 (1999)
74. Chen, H., Luni, A., Seifried, A., Wilkens, L. R., Le Marchand, L.: *Cancer Res*, 59, 3045-3048 (1999)
75. Chen, S., Wu, K., Knox, R.: *Free Radic Biol Med*, 29, 276-284 (2000)
76. Chirulli, V., Longo, V., Marini, S., Mazzaccaro, A., Fiorio, R., Gervasi, P. G.: *Life Sci*, 76, 2535-2546 (2005)
77. Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M.: *Chem Listy*, 95, 212-222 (2001)
78. Isin, E. M., Guengerich, F. P.: *Biochim Biophys Acta*, 1770, 314-329 (2007)
79. Jaiswal, A. K.: *Free Radic Biol Med*, 29, 254-262 (2000)
80. Joseph, P., Xie, T., Xu, Y., Jaiswal, A. K.: *Oncol Res*, 6, 525-532 (1994)
81. Kadlubar, F. F., Fu P. P., Jung, H., Shaikh, A. U., Beland, F. A.: *Envir Health Perspect*, 87, 233-236 (1990)

82. Kasper, C. B., Henton, D. C., Foureman, G. L., Curtis, J. F., Hughes, H. F.: *Enzymatic basis of detoxification II*, Academic Press. New York (1980)
83. Kasper, C. B.: *J Biol Chem*, 246, 577-581 (1971)
84. Kawajiri, K., Fujii-Kuriyama, Y.: *Arch Biochem Biophys*, 464, 207-212 (2007)
85. Kawanishi, M., Enya, T., Suzuki, H., Takebe, H., Matsui, S., Yagi, T.: *Mutat Res*, 470, 133-139 (2000)
86. Kettle, A. J. Heme-Peroxidase Biochemistry: *Pulling Surprises From Their Pockets*. In Oxygen 2001, Sunrise Free radical School (2001)
87. Klebanoff, S. J.: *J Bacteriol*, 95, 2131-2138 (1968)
88. Klingenberg, M.: *Arch Biochem Biophys*, 75, 376-386 (1958)
89. Kohle, Ch., Bock, K. W.: *Biochem Pharm*, 77, 689-699 (2009)
90. Křížková, J.: *Diplomová práce*, Praha, Katedra biochemie (2006)
91. Kumaki, K., Jensen, N. M., Shire, J. G. M, Nebert, D. W.: *J Biol Chem*, 252 157–165 (1977)
92. Kumar, G. S., Lipman, R., Cummings, J., Tomasz, M.: *Biochemistry*, 36, 14128-14236 (1997)
93. Laemli, U. K.: *Nature*, 227, 680-685 (1970)
94. Landvik, N. E., Arlt, V. M., Nagy, E., Solhaug, A., Tekpli, X., Schmeiser, H. H., Refsnes, M., Phillips, D. H., Lagadic-Gossmann, D., Holme, J. A.: *Mutat Res*, 684, 11-23 (2010)
95. Levi, F., Schibler, U.: *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 593-628 (2007)
96. Lewis, D. F. V.: *Cytochromes P450*, Taylor&Francis, London (1996)
97. Li, R., Bianchet, M. A., Talalay, P., Amzel, L. M.: *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 8846-8850 (1995)
98. Li, Y., Jaiswal, A. K., *Eur J Biochem*, 226, 31-39 (1994)
99. Lind, C., Cadenas, E., Hochstein, P., Ernster, L.: *Methods Enzymol*, 186, 287-301 (1990)
100. Lindl, C., Vadi, H., Ernster, L.: *Arch Biochem Biophys*, 190, 97-108 (1978)
101. Makovec, T., Breskvar, K.: *Arch Biochem Biophys*, 357, 310-316 (1998)
102. Marques, M. M., Mourato, L. L. G., Amorim, M. T., Santos, M. A., Melichior, W. B., Beland, F. A.: *Chem Res Toxicol*, 10, 1266-1274 (1997)
103. Martínéz, M. E., Jacobs, E. T., Ashbeck, E. L., Sinha, R., Lance, P., Alberts, S. D., and Thompson, P. A.: *Carcinogenesis*, 28, 2019–2027 (2007)

104. Menn, J. J.: *Environ Health Perspect*, 27, 113-124 (1978)
105. Metodiewa, D., Rezska, K., Dunford, H. B.: *Biochem Biophys Res Commun*, 160, 1183-1188 (1989)
106. Meunier, B.: *Biochimie*, 69, 3-9 (1987)
107. Miller, E., C., Miller, J., A.: *Cancer*, 47, 2327-2345 (1981)
108. Montano, M. M., Katzenellenbogen, B. S.: *Proc Natl Acad Sci USA*, 6, 2581-2586 (1997)
109. Moreau, A., Vilarem, M. J., Maurel, P., Pascussi, J. M., *Mol Pharm*, 5, 35-41 (2007)
110. Murahashi, T., Iwanaga, E., Watanabe, T., Hirayama, T.: *J Health Sci*, 49, 386-390 (2003)
111. Murahashi, T., Watanabe, T., Otake, S., Hatioti, Y., Takamura, T., Wakabayshi, K., Hirayama, T.: *J Chromatogr A*, 992, 101-107 (2003)
112. Nadler, S. G., Strobel, H. W.: *Arch Biochem Biophys*, 261, 418-429 (1988)
113. Nagra, R. M., Becher, B., Tourtellotte, W. W., Antel, J. P., Gold, D., Paladino, T., Smith, R. A., Nelson, J. R., Reynolds, W. F.: *J Neuroimmunol*, 78, 97-107 (1997)
114. Nagy, E., Zeisig, M., Kawamura, K., Hisamatsu, Y., Sugeta, A., Adachi, S., Moller, L.: *Carcinogenesis*, 26, 1821-1828 (2005)
115. Nebert, D. W., Nelson, D. R., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, 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, 1-13 (1989)
116. Nedelcheva, V., Gut, I.: *Xenobiotica*, 24, 1151-75 (1994)
117. Neidelman, S. L., Giegert, J.: *Biohalogenation*, Ellins Horwood Limited, London (1986)
118. Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, F. P., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Gonzales, F. J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C., Gotoh, O., Okuda, K., Nebert, D. W.: *DNA Cell Biol*, 12, 1-51 (1993)
119. Němečková, A.: *Lékařská chemie a biochemie*, Avicenum, Praha (1991)
120. Neumann, H. G.: *Arch Toxicol*, 32, 27-38 (1974)
121. O'Brien, P. J.: *Chem Biol Interact*, 129, 113-139 (2000)
122. Omura, T., Sato, R.: *J Biol Chem*, 239, 2379-2385 (1964)
123. Oprian, D. D., Coon, M. J.: *J Biol Chem*, 257, 8935-8944 (1982)
124. Ovrevik, J., Arlt, V. M., Oya, E., Nagy, E., Mollerup, S., Phillips, D. H., Låg, M., Holme, J. A.: *Toxicol Appl Pharmacol*, 242, 270-280 (2010)

125. Patterson, A. V., Saunders, M. P., Chinje, E. C., Patterson, L. H., Stratford, I. J.: *Anticancer Drug Des*, 13, 541-573 (1998)
126. Paul, K. G., Stigband, T.: *Acta Chem Scand*, 24, 3607-3617 (1970)
127. Prestera, T., Holtyclaw, W. D., Zhang, Y., Talalay, P.: *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 2965-2969 (1993)
128. Pritsos, C., A.: *Chem Biol Interact*, 129, 195-208 (2000)
129. Purohit, V., Basu, A. K.: *Chem Res Toxicol*, 13, 673-692 (2000)
130. Reddy, V. M., Randerath, K.: *Environ Healt Perspect*, 76, 41-47 (1987)
131. Reid T. M., Morton K. C., Wang C. Y., King C. M.: *Environ Mutagen*, 6, 705-717 (1984)
132. Rendic, S., Di Carlo, F. J.: *Drug Metab Rev*, 29, 413-580 (1997)
133. Riley, R. J., Workman, P.: *Biochem Pharmacol*, 43, 1657-1669 (1992)
134. Roberts, B. J., Shoaf S. E., Jeong K. S., Song, B. J.: *Biochem Biophys Res Commun*, 205, 1064-1071 (1994)
135. Robertson, J. A., Chen, H.-C., Nebert, D. W.: *J Biol Chem*, 261, 15794-15799 (1986)
136. Rodrigues, M. R., Rodriguez, D., Russo, M., Campa, A.: *Biochem Biophys Res Commun*, 292, 869-873 (2002)
137. Rodriguez-Antona, C., Ingelman-Sundberg, M.: *Oncogene*, 25, 1679-1691 (2006)
138. Ross, D., Beall, H. D., Siegel, D., Traver, R. D., Gustafson, D. L.: *British J Cancer*, 74, 51-58 (1996)
139. Ross, D., Kepa, J. K., Winski, S. L., Beall, H. D., Anwar, A., Siegel, D.: *Chem Biol Interact*, 129, 77-97 (2000)
140. Rosvold, E. A., McGlynn, K. A., Lustbader, E. D., Buetow, K. H.: *Pharmacogenetics*, 5, 199-206 (1995)
141. Rosypal, S.: *Úvod do molekulární biologie*, kap. 14, Brno (2002)
142. Ruddon, R., W., *Cancer Biology*, Oxford University Press, Inc (2007)
143. Sabbioni, G., Jones, C.R.: *Biomarkers*, 7, 347-421 (2002)
144. Segura-Aguilar, J., Kaiser, R., Lind, C.: *Biochim Biophys Acta*, 1120, 33-42 (1992)
145. Seidel, A., Dahman, D., Krekeler, H., Jacob, J.: *Int J Hyg Environ Health*, 204, 333-338 (2002)
146. Shannon, L. M., Kay, E., Lew, J. Y.: *J Biol Chem*, 241, 2166-2172 (1966)

147. Shen, A. L., Kasper, C. B.: *Handbook of Experimental Pharmacology*, 35 (1993)
148. Shimamoto, Y., Kitamura, H., Hoshi, H., Kazusaka, A., Funae, Y., Imaoka, S., Saito, M., Fujita, S.: *Arch Toxicol*, 72, 492-498 (1998)
149. Schacter, B. A., Nelson, E. B., Marver, H. S., Masters, B. S. S.: *J Biol Chem*, 247, 3601-3607 (1972)
150. Schlager, J. K., Powis, G.: *Int J Cancer*, 45, 403-409 (1990)
151. Schulz, W. A., Krummeck, A., Rosinger, I., Eickelmann, P., Neuhaus, Ch., Ebert, T., Schmitz-Drager, B. J., Sies, H.: *Pharmacogenetics*, 7, 235-239 (1997)
152. Smulevich, G., English, A. M., Martini, A. R., Marzocchi, M. P.: *Biochemistry*, 30, 772-774 (1991)
153. Smulevich, G.: *Biochemistry*, 33, 7398-7407 (1994)
154. Spatzenegger, M., Jaeger, W.: *Drug Metab Rev*, 27, 397-417 (1995)
155. Stiborová, M., Dračinská, H., Hájková, J., Kadeřábková, P., Frei, E., Schmeiser, H. H., Souček, P., Phillips, D. H., Arlt, V. M.: *Drug Metab Dispos*, 34, 1398-1405 (2006)
156. Stiborová, M., Frei E., Bieler C. A., Schmeiser H. H.: *Chem Listy*, 92, 661-668 (1998)
157. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: *Chem Listy*, 93, 229-237 (1999)
158. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J. Jr., Martínek, V., Páca, J.: *Chem Listy*, 98, 876-890 (2004)
159. Stiborová, M., Asfaw, B., Anzenbacher, P.: *FEBS Lett*, 232, 378-390 (1988)
160. Stiborová, M., Asfaw, B., Frei, E., Schmeiser, H. H., Wiessler, M.: *Chem Res Toxicol*, 8, 489-98 (1995)
161. Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser, H. H., Wiessler, M., Hradec, J.: *Carcinogenesis*, 11, 1843-1848 (1990)
162. Stiborová, M., Frei, E., Sopko, B., Sopková K., Marková, L., Lanková, M., Kumstýrová T., Wiessler M., Schmeiser, H. H.: *Carcinogenesis*, 24, 1695-1703 (2003)
163. Stiborová, M., Frei, E., Sopko, B., Wiessler, M., Schmeiser, H., H.: *Carcinogenesis*, 23, 617-625 (2002)
164. Stiborová, M., Frei, E., Hodek, P., Wiessler, M., Schmeiser, H. H.: *Int J Cancer*, 113, 189-197 (2005)

165. Stiborová, M., Hájek, M., Frei, E., Schmeiser, H., H.: *Gen Physiol Biophys*, 20, 375- 292 (2001)
166. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Schmeiser, H. H., Frei, E.: *Cancer Res*, 62, 5678-5684 (2002)
167. Stiborová, M., Mikšanová, M.: *Živa*, 4, 146-148 (1999)
168. Stiborová, M., Mikšanová, M., Havlíček, V., Schmeiser, H. H., Frei, E.: *Mutat Res*, 500, 49-66 (2002)
169. Stiborová, M., Rupertová, M., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H. H.: *Collect Czech Chem Commun*, 69, 476-498 (2004)
170. Stiborová, M., Schmeiser, H., H., Frei, E.: *Collect Czech Chem Commun*, 63, 857-869 (1998)
171. Tamburini, P. P., Schenkman, J. B.: *Mol Pharmacol*, 30, 178-185 (1986)
172. Taniguchi, H., Imai, Y., Sato, R.: *Arch Biochem Biophys*, 232, 585-596 (1984)
173. Thackery, E.: *The Gale Encyclopedia of Cancer*, Gale group USA (2002)
174. Thomas, E. L., Bozeman, P. M. & Learn, D. B: *Peroxidases in Chemistry and Biology*. Boca Raton, USA: CRC Press (1991)
175. Tomatis, L., Aitio, A., Wilbourn, J., Shuker, L.: *Jpn J Cancer Res*, 80, 795-807 (1989)
176. Turek, B., Hrubý, S., Černá, M.: *Nutriční toxikologie*, Brno (1994)
177. Ueng, T. H., Hwang, W. P., Chen, R. M., Wang, H. W., Kuo, M. L., Park, S. S., Guengerich, F. P.: *J Toxicol Environ Health A*, 54, 509-527 (1998)
178. Večerková, J.: *Biotransformace léčiv a její význam pro toxikologickou praxi*, skriptum 1. LF UK, Karolinum, Praha (1997)
179. Vermilion, J. L., Ballou, D. P., Massey, V., Coon, M. J.: *J Biol Chem*, 256, 266-277 (1981)
180. Vineis, P.: *Envir Health Perspect*, 102, Suppl. 6, 7-10 (1994)
181. Wang, M., Roberts, L. D., Paschke, R., Shea, M. T., Masters, B. S. S., Kim, P. J.: *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 8411 (1997)
182. Watanabe, T., Husli T., Takahashi, Y., Hirayama, T., Wakabayashi, K.: *Mutat Res*, 538, 121-131(2003)
183. Waxman, D. J.: *Arch Biochem Biophys*, 369, 11-23 (1999)
184. Welinder, K. G.: *Curr Opin Struct Biol*, 2, 388 (1992)
185. Welinder, K. G.: *Eur J Biochem*, 151, 497-504 (1985)

-
186. Welinder, K. G.: *Eur J Biochem*, 96, 483-502 (1979)
187. White, R. D., Shea, D., Collow, A. R., Stegeman, J. J.: *Biochem Pharmacol*, 53, 1029-1040 (1997)
188. Whitlock, J. P., Jr.: *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39, 103-125 (1999)
189. Wiechelman, K. J., Braun, R. D., Fitzpatrick, J. D.: *Anal Biochem*, 175, 231-237, (1988)
190. World Health Organization: *Global action against cancer*, WHO, Ženeva (2005)
191. www.chmi.cz/uoco/isko/groc/gr08cz/obsah.html, staženo dne 15.7.2010
192. Yamazoe, Y., Nagata, K., Ozawa, S., Gong, D. W., Kato, R.: *Princess Takamatsu Symp*, 23, 154-162 (1995)
193. Zhang, J., Falany, J. L., Xie, X., Falany, C. N.: *Chem Biol Interact*, 124, 133-147 (2000)
194. Ziegler, D., M., Pettit, F., H.: *Biochem Biophys Res Commun*, 15, 188-193 (1964)

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1

Jana Mizerovská, Helena Dračínská, Markéta Martínková, Jiří Hudeček, Petr Hodek, Heinz H. Schmeiser, Volker M. Arlt, Eva Frei, Marie Stiborová: Kinetics of 3-aminobenzanthrone oxidation by rat hepatic microsomes: Chem Listy, 101, 227-229 (2007)

IF₂₀₀₇ = 0,683

Příloha 2

Marie Stiborová, Helena Dračínská, **Jana Mizerovská**, Eva Frei, Heinz H. Schmeiser, Jiří Hudeček, Petr Hodek, David H. Phillips, Volker M. Arlt: The environmental pollutant and carcinogen 3-nitrobenzanthrone induces cytochrome P450 1A1 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in rat lung and kidney, thereby enhancing its own genotoxicity: Toxicology 247, 11-22 (2008)

IF₂₀₀₈ = 2,836

Příloha 3

Jana Mizerovská, Helena Dračínská, Volker M. Arlt, Jiří Hudeček, Petr Hodek, Heinz H. Schmeiser, Eva Frei, Marie Stiborová: Rat cytochromes P450 oxidize 3-aminobenzanthrone a human metabolite of the carcinogenic environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone: Interdisc Toxicol, 1, 150-154 (2008). Dosud bez IF.

Příloha 4

Marie Stiborová, Helena Dračínská, Markéta Martínková, **Jana Mizerovská**, Jiří Hudeček, Petr Hodek, Jiří Liberda, Eva Frei, Heinz H. Schmeiser, David H. Phillips, Volker M. Arlt: 3-Aminobenzanthrone, a human metabolite of the carcinogenic environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone, induces biotransformation enzymes in rat kidney and lung: Mutat Res, 676, 93-101 (2009)

IF₂₀₀₉ = 2,552

Příloha 5

Jana Mizerovská, Helena Dračínská, Volker M. Arlt, Heinz H. Schmeiser, Eva Frei, Marie Stiborová: Oxidation of 3-aminobenzanthrone, a human metabolite of carcinogenic environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone by cytochromes P450 – similarity between human and rat enzymes: *Neuro Endocrinol Lett*, 30, 52-59 (2009)

IF₂₀₀₉= 1,047

Příloha 6

Jana Mizerovská, Helena Dračínská, Eva Frei, Heinz H. Schmeiser, Volker M. Arlt, David H. Phillips, Marie Stiborová: Induction of biotransformation enzymes by the carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone in liver, kidney and lung after intratracheal instillation in rats (rukopis v přípravě)