

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Michaela Bebová

Doplňky stravy jako modulátory aktivace potravních karcinogenů, II. fáze biotransformace

**Food Supplements as Activation Modulators of Food Carcinogens,
Phase II Metabolism**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením mého školitele prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis.....

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli panu prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnoval při vypracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za cenné rady a psychickou podporu.

Abstrakt

Heterocyklické aromatické aminy (HAA) jsou zástupci karcinogenních a mutagenních látek, které vznikají při tepelné úpravě masa včetně ryb, zejména při smažení a grilování. V organismu může docházet po vstupu těchto cizorodých látek k jejich metabolické aktivaci na látky s vyšší toxicitou či karcinogenním potenciálem. Vedle enzymů první fáze biotransformace se tohoto procesu účastní i enzymy druhé fáze biotransformace, zejména sulfotransferasy (SULT) a N-acetyltransferasy (NAT). Protože mohou být tyto enzymy inducibilní, může prostřednictvím jiných látek obsažených v potravě docházet k jejich indukci. Významnými induktory jsou někteří zástupci flavonoidních látek - genistein, biochanin A a β -naftoflavon. U těchto látek byla prokázána schopnost indukovat tvorbu sulfotransferas v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. Zvýšené množství enzymů může vést k podpoře metabolické aktivace prokarcinogenů za vzniku většího množství aduktů s DNA, což má za následek rozvoj karcinogeneze. Pro výzkum indukce potkaních enzymů rSULT a rNAT byly navrženy peptidy, které poslouží k produkci protilátek vhodných pro jejich imunodetekci.

Klíčová slova: potravní karcinogeny, sulfotransferasy, N-acetyltransferasy

Abstract

Heterocyclic aromatic amines (HAA) are representatives of carcinogenic and mutagenic compounds formed when muscle meat, including fish, is cooked, especially by frying and grilling. When these xenobiotic compounds enter the organism, they may be activated by metabolism into compounds with higher toxicity or carcinogenic potential. Besides the enzymes of the phase I metabolism also the enzymes of the phase II metabolism mainly sulfotransferases (SULT) and N-acetyltransferases (NAT) may participate. Because these enzymes may be inducible their induction may be caused by other compounds present in food. Important inducers are some representatives of flavonoids - genistein, biochanin A and β -naphthoflavone. These compounds have been proven to be able to induce formation of sulfotransferases *in vivo* and *in vitro* conditions. An increased amount of enzymes may lead to the support of metabolic activation of procarcinogens, resulting in an increased formation of DNA adducts, causing development of carcinogenesis. For the research of induction of rat enzymes, rSULT and rNAT peptides were proposed that will be used for the production of antibodies suitable for their immunodetection.

Key words: food carcinogens, sulfotransferases, N-acetyltransferases

(in Czech)

OBSAH

CÍL PRÁCE	7
SEZNAM ZKRATEK	8
1. ÚVOD	11
2. KARCINOGENEZE A CHEMICKÉ KARCINOGENY	13
3. BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK.....	16
3.1 I. fáze biotransformace.....	17
3.1.1 <i>Cytochromy P450</i>	17
3.1.2 <i>Peroxidasy</i>	18
3.1.3 <i>Flavinové monooxygenasy</i>	19
3.2 II. fáze biotransformace	20
3.2.1 <i>Glukuronidace</i>	20
3.2.1.1 Klasifikace a výskyt.....	21
3.2.2 <i>Konjugace s glutathionem</i>	21
3.2.2.1 Klasifikace a výskyt.....	22
3.2.3 <i>Methylace</i>	22
3.2.4 <i>Konjugace s aminokyselinami</i>	22
3.2.5 <i>Sulfátová konjugace</i>	23
3.2.5.1 Nomenklatura sulfotransferas	24
3.2.5.2 Charakteristika sulfotransferas	26
3.2.6 <i>Konjugace s acetátem</i>	35
3.2.6.1 Nomenklatura N-acetyltransferas	36
3.2.6.2 Charakteristika N-acetyltransferas.....	36
4. MODULACE ENZYMOVÉ AKTIVITY ENZYMŮ II. FÁZE BIOTRANSFORMACE..	38
4.1 Flavonoidy	38
4.2 Inhibice sulfotransferas.....	40
4.3 Indukce sulfotransferas	41
4.4 Inhibice N-acetyltransferas	43
4.5 Indukce N-acetyltransferas	43
5. NAVRŽENÍ PEPTIDŮ PRO PRODUKCI PROTILÁTEK.....	44
5.1 Kritéria pro navrhování peptidických imunogenů	44
5.1.1 <i>Antigenicita</i>	45
5.1.2 <i>Expozice</i>	45
5.1.3 <i>Přístupné aminokyselinové zbytky</i>	46
5.1.4 <i>Hydrofilita</i>	47
5.1.5 <i>Absence uspořádané sekundární struktury</i>	47
5.1.6 <i>Jedinečnost sekvence</i>	48
5.1.7 <i>Délka peptidového imunogenu</i>	49
5.2 Strategie výběru nosného proteinu a hostitele	49
5.3 Vybrané peptidy rSULT a rNAT	50
5. ZÁVĚR	52
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53
PŘÍLOHA 1 - GRAFY PARAMETRŮ A PREDIKCE SEKUNDÁRNÍ STRUKTURY VYBRANÝCH rSULT a rNAT	

CÍL PRÁCE

Velkou skupinu karcinogenních sloučenin tvoří potravní karcinogeny a prokarcinogeny, které jsou v gastrointestinálním traktu metabolizovány a aktivovány enzymy první a druhé fáze biotransformace. Cílem této bakalářské práce je soustředit literární data a na základě nich charakterizovat dvě hlavní skupiny enzymů druhé fáze biotransformace, které se zúčastňují metabolické aktivace prokarcinogenů, sulfotransferasy (SULT) a N-acetyltransferasy (NAT). Práce se zaměřuje na ty formy enzymů, které metabolizují xenobiotika (potravní karcinogeny), jsou inducibilní a nacházejí se v gastrointestinálním traktu. Pro výzkum jejich inducibility jsou na základě jejich proteinových sekvencí navrženy peptidy, které poslouží k produkci protilátek vhodných pro jejich imunodetekci.

SEZNAM ZKRATEK

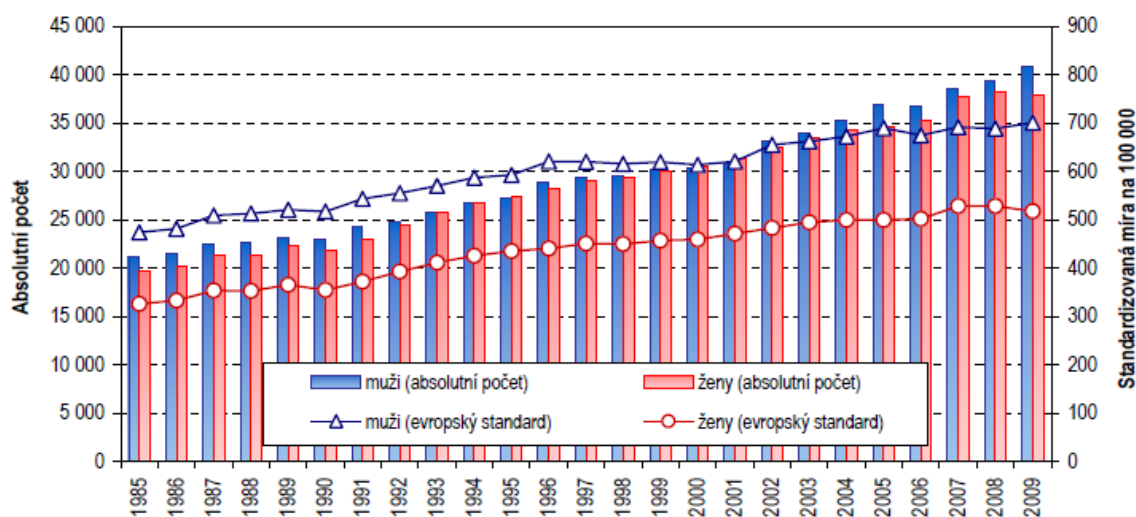
4-ABP	4-aminobifenyl
4-OH-PL	4-hydroxypropanolol
A α C	2-amino-9H-pyridol[2,3- <i>b</i>]indol
AAF	acetylaminofluoren
AF	aminofluoren
AIA	aminoimidazoareny
AMK	aminokyselina
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
Caco-2	buněčná kultura lidských, intestinálních rakovinných buněk („intestinal carcinoma cells“)
CHST	sacharidová sulfotferasa („carbohydrate sulfotferase“)
CYP	cytochrom P450
DDS	diallyl disulfid
DEX	dexamethason
DHEA	dehydroepiandrosteron
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DS	diallyl sulfid
E1	estron
E2	17 β -estradiol
EPO	eozinofilní peroxidasy
FAD	flavinadenindinukleotid
FMO	flavinové monooxygenasy
GIT	gastrointestinální trakt
Glu-P-2	2-aminodipyrido[1,2- <i>a</i> :3,2- <i>d</i>]imidazol
GST	glutathion-S-transferasy
HAA	heterocyklické aromatické aminy
Hep G2	buněčná kultura lidských, jaterních rakovinných buněk („cultured human hepatic carcinoma cells“)
HOX	oxokyseliny halogenů
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie

	(„high-performance liquid chromatography“)
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny („Internacional Agency for Research on Cancer“)
IQ	2-amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i>]chinolin
KLH	hemocyanin děrnatky obrovské
KMBC	buněčná kultura lidských rakovinných buněk žlučového
LPO	laktoperoxidasy
MeAαC	2-amino-3-methyl-9H-pyridol[2,3- <i>b</i>]indol
MeIQ	2-amino-3,4-dimethylimidazol[4,5- <i>f</i>]chinolin
MeIQx	2-amino-3,4-dimethylimidazol[4,5- <i>f</i>]chinoxalin
MFO	systém monooxygenas se smíšenou funkcí („mixed function oxidase“)
MPO	myeloperoxidasy
M-PST	sulfotransferasa sulfatující katecholaminy
mRNA	mediátorová RNA („messenger RNA“)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NAT	N-acetyltransferasy
NATP	pseudogen N-acetyltransferasy
N-OH-AAF	N-hydroxy-2-acetylaminofluoren
N-OH-PhIP	N-hydroxy-2-amino-1-methyl-6-fenylimidazol[4,5- <i>b</i>]pyridin
NOR	Národní onkologický registr
OVA	ovalbumin
PABA	kyselina <i>p</i> -aminobenzoová
PAPS	3-fosfoadenosyl-5-fosfosulfát
PCN	pregnenolon-16α-karbonitril
PhIP	2-amino-1-methyl-6-fenylimidazol[4,5- <i>b</i>]pyridin
PHS	prostaglandin-H synthasy
PST	cytosolické sulfotransferasy („phenol sulfotransferase“)
RSA	králičí sérový albumin
ST	sulfotransferasa
SULT	sulfotransferasa
T ₃	3,3,5-trijodthyronin
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TL	termolabilní sulfotransferasa

TPO	thyroidní peroxidasy
TPST	tyrosylproteinová sulfotransferasa
TS	termostabilní sulfotransferasa
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa

1. ÚVOD

Jedna z prvních informací o vlivu chemických látek na zdraví člověka pochází z roku 1567 a týkala se horníků v rakouských dolech. Paracelsus předpokládal, že příčinou jejich špatného zdravotního stavu, který popsal jako „chřadnutí“, by mohl být arzen, obsažený v rudách. I když předpoklad nebyl úplně správný, protože pravou příčinou byla radioaktivita radonu, byl první, kdo považoval chemickou látku za příčinu nemoci dnes známé jako rakovina [1]. Od té doby se s diagnózou rakoviny potýká stále více lidí. Epidemiologické studie prokazují, že výskyt rakoviny ve světě stále narůstá. Pěti až desetinásobně vzrostl výskyt rakoviny prsu, žaludku a tlustého střeva. Životní styl, kouření, stravování a znečištění životního prostředí mají pravděpodobně mnohem zásadnější vliv na výskyt onemocnění než genetické faktory [2]. Podle Ústavu zdravotnických informací a statistik ČR bylo v roce 2009 do Národního onkologického registru ČR (NOR) nově nahlášeno přes sedmdesát tisíc případů zhoubných novotvarů a novotvarů *in situ*, z toho kolem čtyřiceti tisíc případů u mužů. Celkem bylo v ČR za období existence registru, tedy mezi roky 1976 až 2009 evidováno 1 783 009 novotvarů u celkem jeden a půl milionu osob [3] (viz obr. 1).



Obr. 1: Vývoj incidence zhoubných novotvarů u mužů a žen (1985-2009) (převzato a upraveno z [3])

V poslední době se zvýšila obliba konzumace grilovaného a smaženého masa. Při tomto způsobu přípravy dochází ke vzniku chemických karcinogenů včetně heterocyklických aromatických aminů, které byly poprvé identifikovány v 70. letech profesorem Sugimurou v Japonsku [4]. Epidemiologické studie spojují pravidelnou konzumaci takto upraveného masa se zvyšujícím se výskytem rakoviny tlustého střeva a konečníku [5]. Světové organizace se snaží upozorňovat na problematiku rostoucí incidence rakoviny ve světě, a tak Americká společnost pro rakovinu (*American Cancer Society*) vydala směrnice v rámci prevence rakoviny, doporučující dostatečnou fyzickou aktivitu a zdravou stravu. Mezi hlavní body týkající se kvalitního nutričního příjmu patří konzumace dostatečného množství zeleniny a ovoce a důraz na převahu rostlinných produktů v rámci denního příjmu [6].

Jelikož je karcinogeneze mnohastupňový proces, je důležitou součástí prevence vzniku rakoviny blokáce karcinogenních procesů v různých fázích jejího vývoje a to právě již zmíněnou stravou, látkami obsaženými v potravních doplňcích, nebo látkami syntetickými. Takovéto prospěšné sloučeniny, které zasahují do karcinogenních procesů, se nazývají chemopreventivní a mohou mít účinky na různých úrovních: antioxidační účinky proti volným radikálům, zabraňování nežádoucích účinků zánětlivých procesů, blokáce aktivace karcinogenů nebo zvýšení jejich detoxikace [7].

Nejpoužívanějšími látkami v chemoprevenci jsou v poslední době fytochemikálie. Fytochemikálie jsou bioaktivní sloučeniny rostlinného původu bez nutriční hodnoty, které obsahují ochranné látky a jsou schopné ovlivňovat aktivitu enzymů v rámci biotransformace. Jsou obsaženy v zelenině, ovoci a další rostlinné potravě [8]. Jelikož se jedná o látky přijímané výhradně orální cestou, je důležité studovat, jakými reakcemi tyto látky procházejí v procesu trávení a porozumět celkovému metabolismu a biotransformaci spolu s jejich interakcemi s enzymy a s ostatními látkami, přijímanými v potravě, jako jsou např. výše zmíněné heterocyklické aromatické aminy. Důležitým místem této interakce je gastrointestinální trakt, kde dochází složitými mechanismy k regulaci dostupnosti živin, které odtud přestupují do krve. Reakce, které probíhají mezi přijímanými látkami, metabolity a enzymy mohou působit na rovnováhu mezi detoxikačními a toxikačními procesy v rámci metabolismu. Pak se i původně chemopreventivní látka může stát nevhodně působící či dokonce látkou toxickou.

2. KARCINOGENEZE A CHEMICKÉ KARCINOGENY

Chemické karcinogeny jsou většinou organické nebo anorganické chemické sloučeniny, které jsou schopné vytvářet adukty s DNA, případně jejich metabolismem vznikají volné kyslíkové radikály reagující s DNA [9]. Vznik těchto aduktů má za následek vznik toxických účinků, které mohou být teratogenní, mutagenní a karcinogenní. Karcinogeny lze rozdělit do dvou skupin, podle toho, zda působí nebo nepůsobí genotoxicky:

- Genotoxické karcinogeny mohou měnit genetické informace (mutace genů, chromozomů nebo genomu). Nejzávažnější jsou poruchy genů pro proteiny, které se podílejí na přenosu signálů, kontrole exprese genů, regulaci buněčného cyklu a apoptózy.
- Epigenetické karcinogeny nereagují přímo s DNA. Uplatňují se zde tzv. kokarcinogeny, které potencují vliv karcinogenů, např. některé hormony (estrogen) [10].

Karcinogenní účinky jsou obecně charakteristické tím, že vyvolávají nadměrné bujení buněk a tkání vedoucí k tvorbě nádorů. Čím více je člověk exponován karcinogenním činitelům, tím dříve a více poruch vzniká. Pokud je již nějaký gen zatížen genetickou dispozicí, může být karcinogeneze značně urychlena [11].

Teratogeny jsou látky, které způsobují morfologické a funkční odchylky v embryonálním vývoji jedince. Čistý teratogen účinkuje bez změny genotypu a mění se jen fenotyp. Mezi teratogenní látky patří např. některá léčiva (tetracyklin, cytostatika) a další chemické látky jako ethanol, toluen aj.[10].

Podle oficiální databáze, která je vedena Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (*Internacional Agency for Research on Cancer, IARC*), jsou karcinogeny a potenciální karcinogeny děleny do 4 skupin [12]:

Skupina 1	Látka je prokázaný karcinogen pro člověka (např. benzo[<i>a</i>]pyren)
Skupina 2A	Látka je pravděpodobný karcinogen pro člověka (např. 2-amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i>]chinolin (IQ))
Skupina 2B	Látka je možný karcinogen pro člověka (např. naftalen, styren)
Skupina 3	Látku nelze klasifikovat jako karcinogen pro člověka (např. kofein)
Skupina 4	Látka pravděpodobně není karcinogenem pro člověka (např. kaprolaktam)

Při výzkumu rakoviny na zvířecích modelech jsou často používány jednotlivé potenciální karcinogeny ve vyšších dávkách, než je reálná expozice, avšak kombinace vnějších a vnitřních faktorů působících na člověka je dlouhodobý proces, trvající několik desítek let. Dosud bylo identifikováno přes 3000 karcinogenních sloučenin a jejich počet bude pravděpodobně narůstat [9]. V rámci národního toxikologického programu (*National Toxicology Program*) je v USA vydáván seznam prokázaných chemických karcinogenů a látek, které jsou podezřelé z karcinogenních účinků (*Report on Carcinogens*). V současné době je k dispozici již dvanáctá aktualizace. Seznam obsahuje základní popis a charakteristiku látek, informace o výzkumu, apod. [13].

2.1 Karcinogeny v potravě

Některé látky v potravě např. aflatoxiny, polycyklické aromatické uhlovodíky nebo heterocyklické aromatické aminy mohou přispět ke karcinogenním procesům a proto důležitým faktorem pro zdraví je vyloučení těchto látek z potravy. Karcinogenita u organických sloučenin v potravě je často způsobena určitou strukturou a funkčními skupinami sloučeniny. Karcinogeny se v potravě mohou vyskytovat přirozeně, vznikat při tepelném nebo technologickém zpracování potravy anebo mohou být potraviny kontaminovány z okolí. Sloučeniny se většinou vyskytují ve velmi malém množství a jako individuální látky nepředstavují významnější riziko pro vznik nádorů. Účinky všech přijímaných karcinogenů se ale sčítají a poruchy DNA se hromadí, takže důsledky působení karcinogenních látek se dostávají až po delší době [9].

2.2 Heterocyklické aromatické aminy

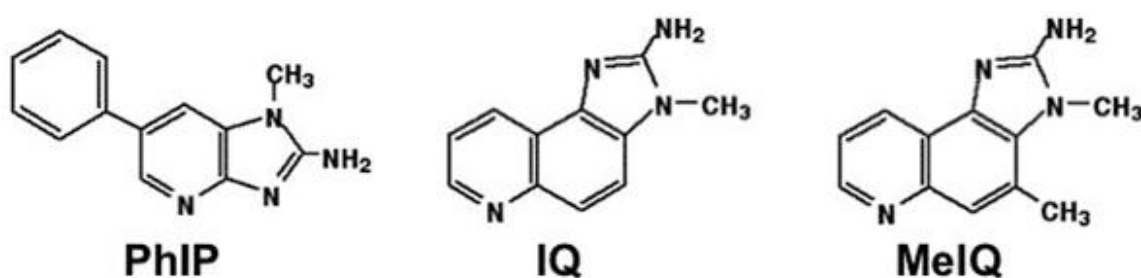
Heterocyklické aromatické aminy (HAA) jsou skupinou karcinogenních a také mutagenních látek, které vznikají při tepelné úpravě masa včetně ryb, zejména při smažení a grilování [14]. Navíc se také nacházejí v dýmu vznikajícím při grilování [15] a v tabákovém kouři [16].

Bylo identifikováno více jak 20 různých heterocyklických aminů, které lze rozdělit na dvě třídy. První třída HAA vniká procesem pyrolýzy jednotlivých aminokyselin jako tryptofan, glutamová kyselina nebo fenylalanin při teplotě nad 250 °C. Vysoká teplota při pyrolýze způsobuje tvorbu deaminovaných a dekarboxylovaných aminokyselin, které

spolu s reaktivními fragmenty volných radikálů tvoří heterocyklickou strukturu [17]. Pyrolytické HAA zahrnují pět strukturně odlišných skupin: pyridoindoly, pyridoimidazoly, fenyropyridiny, tetraazofluranteny a benzimidazoly, z nichž nejvýznamnějšími zástupci jsou: 2-amino-9H-pyridol[2,3-*b*]indol (A α C), 2-amino-3-methyl-9H-pyridol[2,3-*b*]indol (MeA α C) a 2-aminodipyrido[1,2-*a*:3,2-*d*]imidazol (Glu-P-2). Při vysokých teplotách doprovázejících kouření cigaret také dochází k tvorbě pyrolytických HAA, nejvíce A α C a MeA α C [18].

Druhá třída HAA, aminoimidazoareny (AIA), se vytváří při přípravě masa při teplotách v rozmezí 150-250 °C, tedy častěji při běžné přípravě v domácnosti. Prekurzory těchto heterocyklických aminů jsou aminokyseliny, sacharidy a kreatin [19]. Množství vytvořených polycyklických aromatických aminů závisí na typu připravovaného masa, na způsobu přípravy a době zpracování. Při smažení a grilování vzniká nejvíce HAA, zatímco při opékání a vaření vzniká těchto sloučenin méně. Mezi nejhojnější aminoimidazoareny patří 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazol[4,5-*b*]pyridin (PhIP), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]chinolin (IQ) a 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*]chinolin (MeIQ), jejichž struktury jsou znázorněny na obr. 2.

Jak už bylo uvedeno v úvodu této kapitoly, Mezinárodní společnost pro výzkum rakoviny (IARC) klasifikuje karcinogeny a potenciální karcinogeny do 5 skupin. Devět zástupců HAA je klasifikováno jako „pravděpodobné karcinogeny“ skupiny 2B a 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]chinolin (IQ) jako „pravděpodobný karcinogen“ skupiny 2A [20].



Obr. 2: Struktura PhIP, IQ a MeIQ (převzato a upraveno z webových stránek *National Cancer Center Research Institute, USA*)

3. BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK

Organismy jsou neustále vystavovány vnějším fyzikálním, biologickým a chemickým vlivům, které mohou ovlivňovat přirozené fyziologické pochody živých organismů. Právě cizorodé chemické látky, které se přirozeně nevyskytují v organismu, se nazývají xenobiotika a patří mezi ně hlavně léčiva, potravní aditiva a polutanty životního prostředí. Xenobiotika se do krve organismů mohou dostat třemi způsoby: trávicím ústrojím (žaludek, střeva) dýchacím ústrojím (nosní sliznice, průdušky, plíce) nebo pokožkou. Následný transport do tkání a k cílovým buňkám je zprostředkován hlavně volnou a pasivní difúzí, dále aktivním transportem nebo endocytózou [21].

Některá xenobiotika jsou látky lipofilní povahy, které je třeba v procesu metabolismu biotransformovat na hydrofilní sloučeniny. Biotransformace je tedy souhrnem biochemických reakcí, kterými jsou xenobiotika ale i endogenní látky přeměňovány za katalýzy enzymů na metabolity, které jsou připravené k exkreci. Hlavními orgány biotransformace jsou játra, ledviny a gastrointestinální trakt [22].

Jsou tři možné způsoby interakce organismu s těmito látkami. První možností je detoxikace chemickými reakcemi na metabolity, které jsou na konci tohoto procesu exkretovány z těla močí, stolicí, potem nebo vydechaným vzduchem. Některé látky se vlivem metabolické přeměny mohou stát metabolity s toxičtějším účinkem než jejich prekurzor a podléhají místo detoxikace tzv. aktivaci [10]. Aktivační a detoxikační procesy nelze od sebe vzájemně oddělit, protože tentýž enzym se může podílet na detoxikaci jedné chemické látky a zároveň způsobit aktivaci jiné látky [23]. Druhou možností je akumulace xenobiotika v organismu přičemž následky se mohou projevit až po dlouhé době. Třetí možností je, že organismus chemicky neinteraguje s xenobiotikem, a to je následně vyloučeno v původní formě, tedy v metabolicky nezměněné podobě [10].

U eukaryotických organismů jsou rozlišovány dvě hlavní fáze biotransformace. V první fázi zpravidla vznikají nebo se odkrývají chemicky reaktivní skupiny. Prostřednictvím těchto skupin pak dochází ke konjugaci s endogenními látkami ve druhé fázi (např. s kys. glukuronovou, glutathionem, cysteinem atd.). Vzniklé konjugáty jsou již více rozpustné ve vodě a snáze vylučitelné než původní látky [22].

3.1 I. fáze biotransformace

1. fáze biotransformace chemických látek, často označovaná také jako fáze derivatizační, zahrnuje zejména reakce oxidační, hydroxylační, dealkylační, redukční a hydrolytické, které probíhají hlavně v endoplasmatickém retikulu buněk. Během této fáze dochází k odkrytí nebo zavedení polárních skupin (např. -OH, -COOH, -NH₂ atd.) a dochází tak ke zvýšení hydrofility vstupující látky. Reakce I. fáze katalyzuje řada enzymů, z nichž nejdůležitější jsou cytochromy P450, dále peroxidasy, flavinové monooxygenasy, monoaminoxidasy, alkoholdehydrogenasy a další.

3.1.1 Cytochromy P450

Mezi nejdůležitější reakce patří oxidace prostřednictvím tzv. systému oxidas se smíšenou funkcí (MFO z angl. *Mixed Function Oxidase*), což je soubor enzymů katalyzujících oxidační, oxygenační, popř. redukční reakce a u eukaryot se nachází v membráně hladkého endoplasmatického retikula buněk [23]. Klíčovými enzymy této fáze a současně MFO jsou cytochromy P450 (CYP). Termín CYP označuje skupinu membránových hemoproteinů, které mají ve své molekule vázán nekovalentní vazkou protoporfyrin IX. Ten je částečně vázán hydrofóbními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu, přítomné v aktivním centru enzymu, který tvoří pátý ligand železa protoporfyrinu [24].

CYP se vyskytují v různých isoformách, které se řadí podle genetické homologie do rodin (> 40% homologie) a podrodin (> 60% homologie) [25]. Rodina se označuje arabskou číslicí např. CYP1, podrodina velkým tiskacím písmenem např. CYP1A. Jednotlivé isoformy jsou pak opět očíslovány např. CYP1A2. V současné době je známo více jak 11 000 sekvencí, z toho 620 rodin (40 připadá na *Homo sapiens*) [26].

Výskyt cytochromů P450 v jednotlivých tkáních není stejný a to jak v rámci jednoho organismu, tak obecně v lidských tkáních. Cytochromy P450 jsou nejvíce obsaženy v játrech, dále pak v ledvinách, plicích, tlustém střevě, kůži, mozku a nadledvinkách [24]. Obsah v lidských tkáních závisí také na faktorech jako věk, životní styl (např. konzumace alkoholu a kouření) nebo genetický polymorfismus (výskyt více jak dvou alel v genu pro daný znak v rámci populace, který není náhodný, ale postihuje více jak 1% jedinců).

Cytochromy P450 metabolizují endogenní molekuly (např. steroidní látky a prostaglandiny) a také se širokou škálou xenobiotik, včetně léčiv. Negativní vlastností je jejich schopnost oxidovat prokarcinogeny v rámci metabolické aktivace na jejich vysoce reaktivní elektrofilní formy, které mohou kovalentně modifikovat DNA [27]. Za tyto reakce je zodpovědná hlavně podrodina CYP1A, která má dva členy CYP1A1 a CYP1A2 [28]. Např. aromatické aminy jsou metabolicky aktivovány CYP1A2, zatímco polycyklické aromatické uhlovodíky jsou aktivovány CYP1A1. Dále se zúčastňuje aktivace enzymy CYP1B1 [29], CYP2E1 [30], CYP3A4 [31], 2A6 a 2B6 [32].

3.1.2 Peroxidas

Peroxidas jsou stejně jako cytochromy P450 hemové enzymy, mají však atom železa v oxidačním stavu +III (tvoří tzv. hemin, ferriprotopofyrin IX). Tyto enzymy oxidují pomocí peroxidu vodíku endogenní látky např. thyroïdní hormony a také některá xenobiotika jako např. aromatické aminy a azobarviva. Typickou vlastností peroxidasy je schopnost katalyzovat nejrůznější typy reakcí: halogenace, oxidační kondenzace aromatických aminů, dekarboxylační reakce, hydroxylace aj. [33]. Nacházejí se v rostlinách, nižších houbách (např. kvasinky) a vzácněji v živočišných tkáních.

Mezi peroxidasy vyskytující se v lidském organismu patří několik členů, lišící se lokalizací a substrátovou specifitou, která je obecně značně široká. Myeloperoxidas (MPO) se nacházejí v neutrofilních leukocytech a katalyzují oxidaci halogenidů za vzniku oxokyselin halogenů (HOX). Podílí se také na katalýze procesů vedoucích k chemické karcinogenezi. V rámci výzkumu provedeném na buňkách HL-60 (buněčná linie z kostní dřeně zasažené leukémií) došlo po jejich inkubaci s fenolem a peroxidem vodíku k reakci s buněčným glutathionem za vzniku reaktivního thiolového radikálu $RS\bullet$ [34]. Vystavení buněk HL-60 různým metabolitům obsahujícím -OH skupiny jako výše uvedený fenol tedy po oxidaci vede k tvorbě radikálu, který může vytvářet adukty s DNA.

Druhou skupinou jsou eozinofilní peroxidasy (EPO), nacházející se v eozinofilních leukocytech a katalyzující stejně jako MPO oxidaci halogenidů, zejména s bromidovým aniontem. Uplatňují se převážně v reakcích na ochranu organismu proti parazitům, kterým vytváří cytotoxické prostředí [35].

Další skupinou jsou laktoperoxidas (LPO), které mají antibakteriální účinky a nacházejí se ve slinách, slzách a v mléce, které je produkováno prsními žlázami.

V metabolismu xenobiotik se LPO mohou zúčastnit aktivace N-hydroxymetabolitů aromatických aminů, např. N-2-fluorenaminu [36] nebo např. biotransformace polycyklických aromatických uhlovodíků. Gorlewska-Roberts a kol. zkoumali aktivaci prokarcinogenů z řad HAA a aromatických aminů v podmínkách *in vitro*, katalyzovanou LPO v hovězím a lidském mléce. Pomocí HPLC byl detekován vznik aduktů na DNA (v pořadí od největší koncentrace): benzidin > 4-aminobifenyl > IQ > MeIQx < PhIP [37]. Lze usuzovat, že LPO se může podílet na procesu karcinogeneze v prsní tkáni prostřednictvím aktivace některých xenobiotik.

Posledními skupinami peroxidas jsou thyroideální peroxidasy (TPO) nacházející se ve folikulárních buňkách štítné žlázy a prostaglandin-H synthasy (PHS). PHS jsou klíčovými enzymy v syntéze prostaglandinů, látek zúčastňujících se zánětlivých a imunitních procesů, a pravděpodobně se i podílejí na aktivaci prokarcinogenů z řad HAA. Byla zkoumána aktivace IQ, zprostředkovaná prostaglandin-H synthasami *in vitro* za spoluúčasti MFO systému. Byly detekovány podobné DNA adukty v obou případech a těchto reakcí se zúčastnili jak PHS1 tak PHS2 formy. PHS1 je enzym konstitutivní, nacházející se v různých tkáních, na rozdíl od PHS2, který je indukibilní a je exprimován v závislosti na podnětech v podobě růstových faktorů, hormonů a cytokinů [38]. Je tedy i možné, že HAA mohou být modulátory exprese PHS2, neboť už byla pozorována indukce PHS2 benzo[*a*]pyrenem [39] nebo 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinem (TCDD) [40].

3.1.3 Flavinové monooxygenasy

Flavinové monooxygenasy (FMO) tvoří skupinu enzymů, které katalyzují NADPH-dependentní oxygenační reakce endogenních a xenobiotických látek. Tyto substráty jsou většinou nukleofilní sloučeniny s heteroatomy jako dusík, síra nebo fosfor a řadí se mezi ně široká škála rostlinných látek a léčiv [41]. Prostetickou skupinu těchto enzymů tvoří flavinadenin nukleotid (FAD), který dává těmto monooxygenasám název. Podle kódujících genů se FMO rozdělují do rodin, z nichž nejrozšířenější jsou FMO1, FMO2 a FMO3, jejichž substráty mohou být endogenní látky (např. kyselina lipová, methionin, trimethylamin) i xenobiotika (např. primární, sekundární a terciální aminy, thioly, thioestery, sulfidy apod.).

FMO mají mnoho společného s cytochromy P450, ale jejich funkce nebyly zatím prozkoumány do takové míry jako funkce cytochromů. Oba systémy monooxygenas

využívají NADPH k redukci kyslíkového atomu z biatomické molekuly kyslíku a vzniku molekuly vody za současné inkorporace druhého kyslíkového atomu do substrátu. FMO i CYP jsou lokalizovány v endoplasmatickém retikulu buněk, hlavně v jaterní tkáni, GITu a ledvinách. Na rozdíl od CYP kóduje ale flavinové monooxygenasy relativně málo genů (přibližně 11, z nichž 6 je pseudogenů) a nebyl zatím prokázán indukční efekt na jejich expresi [42].

3.2 II. fáze biotransformace

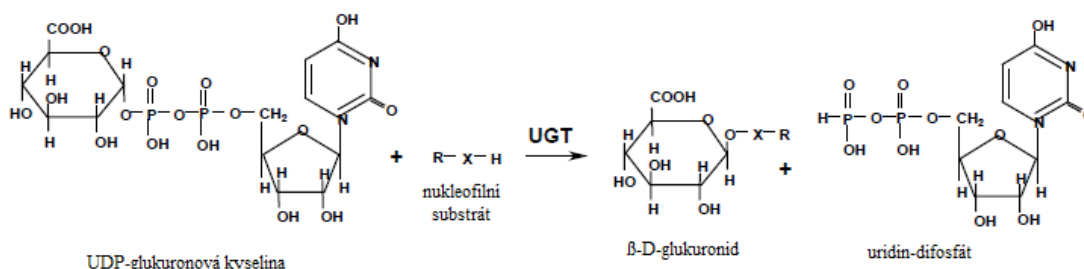
Následující významnou součástí metabolismu xenobiotik je druhá fáze biotransformace zahrnující konjugační reakce. Pro tyto reakce je nezbytná přítomnost vhodné funkční skupiny na substrátu, která umožní vazbu na endogenní sloučeniny (přirozené metabolity buňky) a bývá zpravidla zavedena nebo odkryta ve fázi první. Pokud již taková skupina existuje, přechází chemická látka přímo do druhé fáze. Původně méně hydrofilní sloučeniny jsou konjugačními reakcemi převedeny na snadněji exkretovatelné formy, které jsou odváděny z těla pryč.

Mezi konjugační reakce patří sulfatace, acetylace, methylace, glukuronidace konjugace s glutathionem a konjugace s aminokyselinami. Jednotlivé reakce jsou katalyzovány enzymy, které patří nejčastěji do skupiny transferas. Mezi tyto enzymy patří UDP-glukuronosyltransferasy (UGT), sulfotransferasy (SULT), N-acetyltransferasy (NAT), glutathion S-transferasy (GST) a nejrůznější methyltransferasy [43]. Jednotlivé skupiny enzymů jsou diskutovány níže a dopodrobna jsou dále popsány sulfotransferasy a acetyltransferasy, které jsou klíčové pro metabolickou aktivaci HAA a jiných xenobiotik.

3.2.1 Glukuronidace

UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) jsou klíčovými enzymy glukuronidace. Formování glukuronových konjugátů je nejdůležitější detoxikační dráha druhé fáze biotransformace u všech obratlovců [43] a tyto konjugáty vznikají jak reakcemi s xenobiotiky, tak endogenními strukturami jako jsou hormony, vitaminy rozpustné v tucích a žlučová barviva.

UGT jsou membránové enzymy, které katalyzují tvorbu chemické vazby mezi nukleofilním atomem kyslíku, dusíku, síry nebo uhlíku a kyselinou UDP-glukuronovou, jak je znázorněno na obr. 3. Touto reakcí vznikají β -D-glukuronidy, které se eliminují z těla močí [43].



Obr. 3: Konjugace nukleofilního substrátu s kyselinou UDP-glukuronovou (převzato a upraveno z [43])

3.2.1.1 Klasifikace a výskyt

UGT se vyskytují v membránách endoplasmatického retikula. Dosud bylo rozpoznáno asi 117 enzymů „super rodiny“ UGT. Stejně jako sulfotransferasy se UGT dále dělí podle sekvenční homologie do rodin a podrodin. V lidském těle se nachází 4 rodiny - UGT1, UGT2, UGT3 a UGT8. Mezi nejdůležitější isoformy nacházející se v játrech patří UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B7 a 2B15 [43]. V tenkém střevě se metabolismu potravy a léčiv účastní isoformy UGT1A7, 1A8 a 1A10 [44, 45].

3.2.2 Konjugace s glutathionem

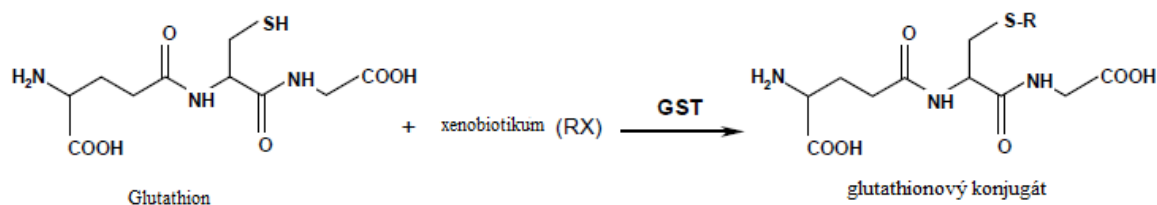
Glutathion-S-transferasy (GST) katalyzují reakce, při kterých se konjuguje glutathion s endogenními a exogenní elektrofilními sloučeninami. Glutathion je tripeptid, složený z aminokyselin kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu (γ -Glu-Cys-Gly). GST se významně podílí na:

- detoxikaci a na ochraně proti volným radikálům,
- konjugaci prostaglandinů, testosteronu a progesteronu,
- modulaci protein kinázové aktivity v jádře buňky a buněčné proliferaci [46].

Reakcí xenobiotika s glutathionem vzniká primární glutathionový konjugát, jak je znázorněno na obr. 4 (str. 22).

3.2.2.1 Klasifikace a výskyt

Lidské GST se nacházejí ve třech formách: cytosolické, mitochondriální a mikrosomální [47]. Cytosolické a mitochondriální GST tvoří pouze dimery, zatímco mikrosomální formy mohou tvořit i trimery a jiné agregáty [48]. Cytosolické a mitochondriální GST se nadále rozdělují na třídy alpha, kappa, mu, pi, sigma, theta, zeta a omega. Lidské GST patří do třídy alfa (A1-A4), mu (M1-M5), pi (P1), kappa (K1) a theta (T1, T2). Číslo u třídy pak značí typ isoenzymu. Isoenzymy v jednotlivých třídách vykazují asi 60% homologii, zatímco třídy mezi sebou jsou si homologicky podobné asi jen z 30% [43].



Obr. 4: Vznik glutathionového konjugátu (převzato a upraveno z [43])

3.2.3 Methylace

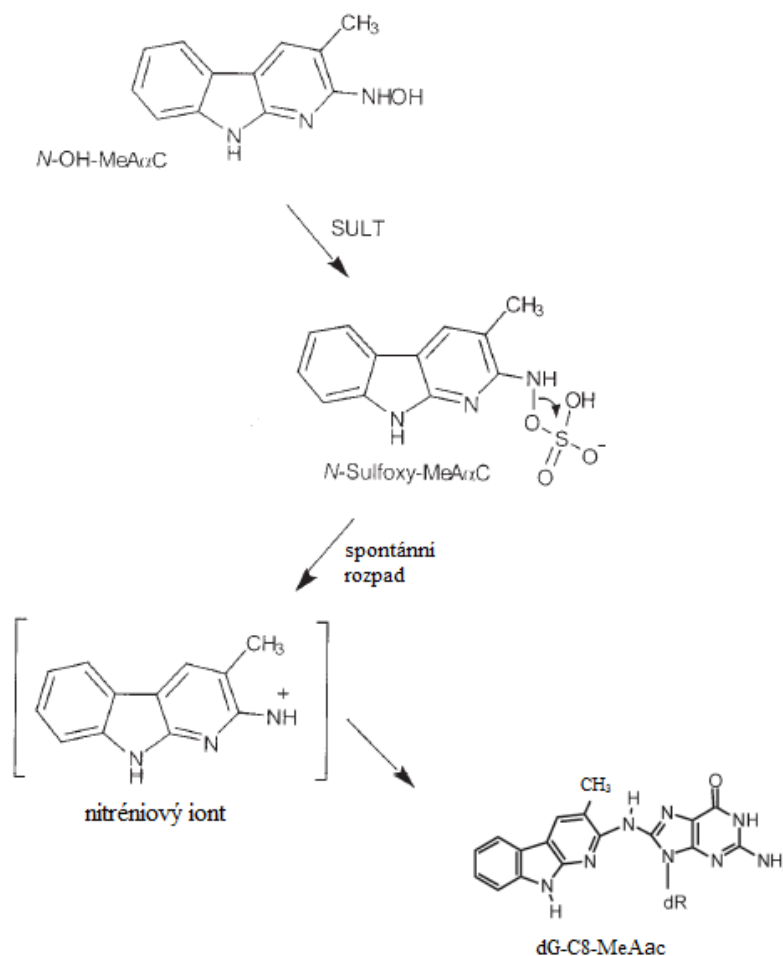
Methylací dochází k zavedení methylové skupiny $-CH_3$ na reaktivní hydroxylovou nebo aminovou skupinu. Jako konjugační činidlo zde slouží S-adenosylmethionin, který je přenášen N-methyltransferasami nebo O-methyltransferasami na vhodný substrát. Methylace se uplatňuje spíše při metabolismu endogenních substrátů, než při biotransformaci xenobiotik a probíhá v cytosolu jaterních a nervových buněk [21].

3.2.4 Konjugace s aminokyselinami

Některé karboxylové kyseliny jako např. kyselina benzoová nejsou odbourávány β -oxidací ale konjugací s glycinem, taurinem nebo alaninem. Pro savce je nejčastější konjugace s glycinem za vzniku hippurových kyselin, která probíhá v matrix mitochondrie, kde jsou aromatické kyseliny aktivované na Acyl-CoA [21].

3.2.5 Sulfátová konjugace

Sulfotransferasy (SULT) jsou enzymy katalyzující konjugaci sulfo-skupiny (SO_3^-) z aktivovaného sulfátu v podobě 3-fosfoadenosyl-5-fosfosulfátu (PAPS) s O-,N- nebo S-akceptorovou skupinou metabolizované látky za vzniku rozpustných esterů [43]. PAPS je syntetizován ve dvou krokové reakci za spotřeby ATP a anorganického sulfátu. Správně by se tedy měl používat pro tento typ konjugační reakce termín sulfonace, avšak termín sulfatace je v literatuře taktéž rozšířený a je možné používat oba termíny.



Obr. 5: Spontánní rozpad N-sulfoxy-2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indolu za vzniku aduktu s bází DNA. (převzato a upraveno z [50, 51])

Pro některá xenobiotika a malé endogenní molekuly např. dopamin je sulfatace detoxikačním procesem, vedoucím k více rozpustným metabolitům, které jsou v závěru exkretovány žlučí do trávicího traktu nebo močí z těla ven. Pro xenobiotika jako N-hydroxyarylaminy, heterocyklické aminy nebo polycyklické aromatické uhlovodíky znamená však sulfatace proces metabolické aktivace vedoucí ke vzniku vysoce aktivních

elektrofilních sloučenin, které jsou mutagenní a karcinogenní [49]. Sulfatace N-hydroxy-HAA je naznačena na obr. 5 (str. 23), kde je také znázorněn důležitý krok spontánního rozpadu sulfatované sloučeniny za vzniku elektrofilního dusíku na HAA a jeho následná reakce s bází za vzniku DNA aduktu.

3.2.5.1 Nomenklatura sulfotransferas

V organismu savců se nacházejí dvě třídy sulfotransferas. Zástupci první třídy metabolizují makromolekulární endogenní struktury (např. proteiny, lipidy atd.) a jsou to převážně formy vázané na membrány lokalizované v Golgiho aparátu. Tyto sulfotransferasy se nezúčastňují metabolismu xenobiotik. Naopak druhá třída obsahující cytosolické enzymy se specializuje na metabolismus malých endogenních sloučenin, jako jsou např. hormony, žlučové kyseliny a neurotransmitery a zúčastňuje se metabolismu xenobiotik [52].

Sulfotransferasy vázané v membránách se označují zkratkou ST (z angl. sulfotransferase). Příkladem jsou např. enzymy tyrosylproteinové sulfotransferasy TPST, které tvoří genovou rodinu, a jednotlivé formy se označují čísly např. TPST-1, TPST 2 apod. Dalším příkladem je genová rodina sacharidových sulfotransferas (CHST z angl. carbohydrate sulfotransferase) např. CHST 3, CHST 6 apod.

Rozdělení cytosolických sulfotransferas a jejich nomenklatura nebyla vždy v literatuře jednotná. Dříve (přibližně do roku 1996) se cytosolické sulfotransferasy označovaly zkratkou PST (z angl. phenol sulfotransferase) nebo ST (z angl. sulfotransferase) a rozdělovaly se na termostabilní (TS) a termolabilní (TL) vždy s příslušnými čísly v pořadí např. TS PST 1. Na třetí mezinárodní konferenci o sulfataci ve Skotsku v roce 1996 (*3rd International Sulfation Workshop*) bylo dohodnuto, že se sulfotransferasy budou označovat zkratkou „SULT“. Všechny cytosolické sulfotransferasy jsou od té doby součástí tzv. „super rodiny“ SULT [53, 54] a podle sekvenční homologie se nadále dělí do rodin (nejméně 45% shoda) a podrodin (nejméně 60% shoda). Klasifikace do rodin se rozlišuje číslem, které následuje po označení „super rodiny“, např. SULT1. Následuje klasifikace do podrodin, uvedená velkým tiskacím písmenem, např. SULT1A. Individuální enzymy se liší další číslicí, např. SULT1A1. Pokud jeden gen kóduje dva proteiny, rozliší se malým tiskacím písmenem např. SULT2B1a a SULT2B1b. Posledním znakem je hvězdička s číslem, která udává aleovou variantu genu např.

SULT1A1*1 [55]. Zda-li se jedná o lidské, myší nebo potkaní enzymy se rozlišuje písmeny *r* (= rat), *h* (= human) nebo *m* (= mouse), které se píše před název SULT, např. rSULT1A1 nebo hSULT1A1.

Struktura, substrátová specifita a lokalizace jednotlivých enzymů nejsou u všech živočišných druhů shodné. Z hlediska výzkumu metabolismu prokarcinogenů a karcinogenů jsou důležité enzymy ve tkáních člověka a také enzymy ve tkáních potkanů, se kterými se experimenty *in vivo* probíhají. Proto je následující text zaměřen na cytosolické sulfotransferasy.

Zatím je známo 12 lidských genů kódujících hSULT. Enzymy se dělí do 4 rodin hSULT1, hSULT2, hSULT4 a hSULT6 následovně:

- Rodina hSULT1 tvoří nejpočetnější skupinu, zahrnuje 4 podrodiny s 8 zástupci: *1A1*, *1A2*, *1A3* (gen je duplicitní a tvoří 2 formy *1A3* a *1A4*, obě kódují stejný enzym 1A3/4), *1B1*, *1C2*, *1C3*, *1C4*, a *1E1*; zúčastňují se primárně metabolismu xenobiotik a steroidních látek a někdy se také nazývají fenolsulfotransferasy.
- Rodina hSULT2 zahrnuje 2 podrodiny A a B se dvěma zástupci: *2A1*, *2B1* (sestříhem tohoto genu mohou vznikat dva isoenzymy hSULT2B1a a hSULT2B1b).
- Rodina hSULT4 zahrnuje pouze jednu podrodu s kódujícím genem *4A1*.
- Rodina hSULT6 zahrnuje také pouze jednu podrodu s jedním členem kódovaným genem *6B1* [56].

Rozdělení rSULT je podobné jako rozdělení hSULT. Dělí se na 3 rodiny rSULT1, rSULT2, rSULT4:

- Rodina rSULT1 tzv. fenolsulfotransferasy: *1A1*, *1B1*, *1C1*, *1C2*, *1C2A*, *1D1*, *1E1*;
- Rodina rSULT2 tzv. hydroxysteroidové sulfotransferasy: *2A1*, *2A2*, *2A3*, *2B1a* a *2B1b*;
- Rodina rSULT4 má stejně jako v lidské tkáni zatím jednoho zástupce, tzv. „sult-like protein“: *4A1*

3.2.5.2 Charakteristika sulfotransferas

V následujícím textu jsou stručně charakterizovány jednotlivé lidské a potkaní formy sulfotransferas, jejich substrátová specifita, tkáňová distribuce a význam v biotransformaci endogenních látek a xenobiotik.

hSULT1A1 a hSULT1A2

hSULT1A1 katalyzuje konjugaci steroidních látek (např. thyroidní hormony, β -estradiol), catecholaminů (dopamin) a xenobiotik např. *p*-nitrofenol a *p*-kresol [57], 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazol[4,5-*b*]pyridin (PhIP) [58], včetně léčiv např. hydroxytamoxifen, Minoxidil (léčivo proti vypadávání vlasů) atd.[59]. Enzym hSULT1A1 byl detekován v mnoha tkáních, nejvíce v játrech, dále v mozku, kůži, plicích, gastrointestinálním traktu a v ledvinách [60] a má 7 identifikovaných alelických variant, z nichž nejběžnější isoformy jsou hSULT1A1*1 a hSULT1A1*2. Forma hSULT1A1*1 vykazuje větší aktivitu, je více termostabilní a více se podílí na sulfonaci prokarcinogenů [61].

hSULT1A2 katalyzuje konjugaci podobných xenobiotických substrátů jako forma 1A1 např. *p*-nitrofenol, α -naftol, Minoxidil, 1-hydroxymethylpyren a N-hydroxy-2-acetylaminofluoren (N-OH-AAF). N-hydroxy derivát acetylaminofluorenu je aromatický amin, který do biotransformace vstupuje ve formě prokarcinogenu a jako ultimální metabolit vyvolává tvorbu hepatomů. Se hSULT1A1 a hSULT1A3 sdílí hSULT1A2 více jak 90% sekvenční homologii [60], proto je detekce a rozlišení tohoto enzymu ve tkáních obtížná, lze však předpokládat, že tkáňová distribuce je podobná jako v případě hSULT1A1. Nachází se tedy hlavně v játrech a gastrointestinálním traktu [62]. Na rozdíl od hSULT1A1 a hSULT1A3 však nepřeměňuje dopamin.

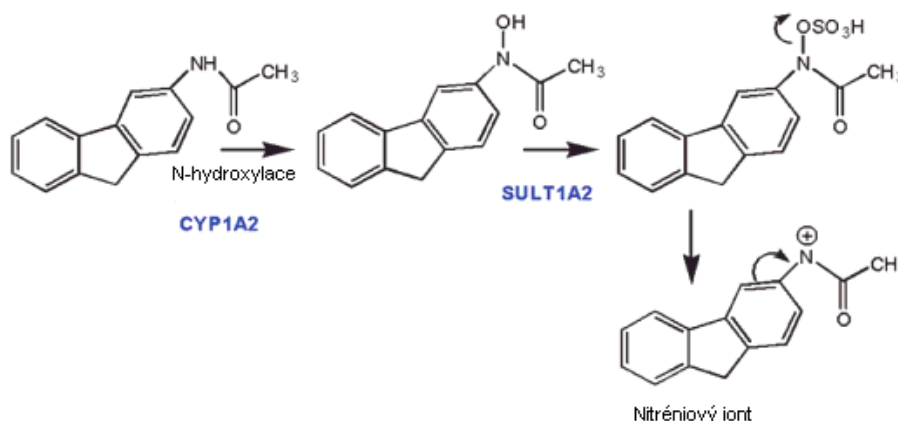
Mezi nejběžnější xenobiotika podléhající metabolické aktivaci patří zejména polycyklické aromatické uhlovodíky, N-hydroxy deriváty arylaminů, allylové alkoholy a heterocyklické aromatické aminy [61], jejichž konkrétní zástupci jsou uvedeni v tab. 1 (str. 27).

Tab. 1: Metabolická aktivace prokarcinogenů enzymy hSULT1A1 a hSULT1A2

Enzym	Xenobiotikum podléhající metabolické aktivaci
hSULT1A1	2-aminofluoren (AF)
	2-acetylaminofluoren (AAF)
hSULT1A2	4-aminobifenyl (4-ABP)
	2-amino-1-methyl-6-fenylimidazol[4,5-b]pyridin (PhIP)
	2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indol (A α C)
	2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b] indol (MeA α C)

([58, 63-68])

Jako názorný příklad metabolické aktivace xenobiotika v organismu lze uvést aktivaci 2-acetylaminofluorenu, který podléhá v první fázi biotransformace N-hydroxylaci za katalýzy enzymu CYP1A2. Vzniklý N-hydroxyderivát může být konjugován ve druhé fázi enzymem SULT1A2 za vzniku sulfatovaného metabolitu. Po odštěpení sulfátu z atomu dusíku vzniká nitréniový iont, který vytváří adukty s DNA (viz obr. 6).



Obr. 6: Metabolická aktivace 2-acetylaminofluorenu: N-hydroxylace CYP1A2 a aktivace enzymem SULT1A2 za vzniku nitréniového iontu (převzato a upraveno z [32])

rSULT1A1

Nejrozšířenější sulfotransferasa u potkanů, rSULT1A1 isoforma, se stejně jako jeho orthologní forma hSULT1A1 nejvíce vyskytuje v játrech, dále v ledvinách, srdci a tlustém střevě. Substrátová specifita je také velmi podobná, katalyzuje konjugaci s *p*-nitrofenolem, 1-naftolem, N-hydroxy-2-acetylaminofluorenem (N-OH-AAF) a např. s Minoxidilem [69]. Na rozdíl od hSULT1A1 a hSULT1A2, rSULT1A1 konjuguje

heterocyklické aromatické aminy 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]chinolin (IQ) a 2-amino-3,4-dimethylimidazol[4,5-*f*]chinoxalin (MeIQx) [70, 71] za vzniku karcinogenních metabolitů.

hSULT1A3/4

Enzym hSULT1A3/4, který je také označován jako fenolsulfotransferasa sulfatující katecholaminy (M-PST) nebo také termolabilní fenolsulfotransferasa katalyzuje konjugaci katecholaminů (např. dopamin, noradrenalin), jednoduchých fenolů (např. *p*-nitrofenol), léčiv (např. paracetamol) a karcinogenů (např. hydroxymethylpyren) [61,62]. V roce 2007 byl také jako substrát hSULT1A3/4 identifikován nitrotyrosin, indikátor poškození buňky a vzniku zánětu [72]. Tento enzym se vyskytuje zejména v tenkém střevě, konkrétně v lačnicku (*jejunum*) a ve sliznici tlustého střeva [73, 74], malé množství bylo detekováno v játrech [75].

Hildebrant a kol. ve své studii v roce 2004 pomocí PCR testů prokázali, že gen *SULT1A3* je duplicitní a rozlišili jej na dva geny *SULT1A3* a *SULT1A4*, přičemž oba kódují identické enzymy hSULT1A3/4 [76]. Ačkoli se tento inducibilní enzym zúčastní konjugace léčiv a xenobiotik, a to hlavně ve tkáních gastrointestinálního traktu, nemá orthologní zastoupení u potkanů, na kterých by se potenciální výzkum *in vivo* interakcí xenobiotik a jiných částí stravy mohl praktikovat (stejně tak se nevyskytuje ani u myši).

hSULT1B1 a rSULT1B1

hSULT1B1 byl poprvé izolován a charakterizován Fujitou a kol. v roce 1998 [77]. Hlavními endogenními substráty jsou jodothyroniny (3,3-dijodothyronin, 3,3,5-trijodothyronin, 3,3,5-reverzní trijodothyronin a thyroxin) [78]. Forma hSULT1B1 však katalyzuje i konjugaci s xenobiotiky: 1-naftolem [78], *p*-nitrofenolem [79], 6-hydroxymethylbenzo[*a*]pyrenem [55]. Největší aktivita tohoto enzymu byla zaznamenána v tlustém střevě [80], dále v tenkém střevě, játrech a leukocytech [78]. Sekvence mRNA tohoto enzymu byla detekována ve tkáních mozku, vaječnicích a ledvinách [81].

Stejně jako lidská forma tak i rSULT1B1 katalyzuje reakce s thyroidními endogenními substráty. Nejvíce se nachází hlavně v játrech, dále v ledvinách a tenkém střevě [82]. Hormonální regulace tohoto enzymu je odlišná od ostatních enzymů SULT1 rodiny, protože se neuplatňuje vliv růstových hormonů. Studie prokázaly vliv

dexamethasonu (DEX) a pregnenolon-16 α -karbonitrilu (PCN) na rSULT1B1. V játrech došlo k výrazné indukci exprese enzymu oběma již zmíněnými látkami (v případě PCN pouze u samce) [83].

rSULT1B1 se zúčastňuje metabolické aktivace xenobiotik za vzniku mutagenů a to konkrétně u 6-hydroxymethylbenzo[*a*]pyrenu, stejně jako bylo prokázáno u lidské formy tohoto enzymu, a 4H-cyklopenta[*def*]chrysen-4-olu (na základě Amesova testu na *S. typhimurium*) [84].

Na základě studie provedené Shinem a kol., kteří porovnávali expresní profily enzymů metabolizující xenobiotika v tenkém střevě pomocí metody genových čipů tzv. „GeneChip array“, vykazoval rSULT1B1 nejvyšší hodnoty ze všech rSULT (dále byl ještě exprimován rSULT1A1 a ne příliš známá rN-deacetylase/N-sulfotransferase). Pro srovnání, z lidských hSULT byly nejvíce exprimovány hSULT1A2 a hSULT1A3, a to téměř čtyřikrát více než potkaní formy [85].

rSULT1C1

rSULT1C1 se nachází hlavně v játrech, ledvinách a tenkém střevě [119]. Nagata a kol. ve svém výzkumu prokázali, že rSULT1C1 je dominantním enzymem v aktivaci N-hydroxyarylamínů, konkrétně byla detekována výrazná aktivita s N-hydroxy-2-acetylaminofluorenem (N-OH-AAF) v játrech samce potkana [86]. Studie *in vitro* s buněčnými liniemi pro expresi potkaních rCYP1A2 a rSULT1C1 (V79-rCYP1A2-rSULT1C1) se zabývala vlivem nápojů, ovoce, zeleniny a jednotlivých flavonoidů na toxicitu způsobenou PhIP a již zmíněného acetylaminofluorenu (AAF). Metabolickou aktivaci PhIP a AAF značně inhibovaly zejména extrakty ze zeleného čaje a červeného vína. Z flavonoidů měly značný inhibiční efekt flavon, kamferol a kvercetin [87].

hSULT1C2 , rSULT1C2 a rSULT1C2A

hSULT1C2 se pravděpodobně zúčastňuje metabolismu endogenních hormonů štítné žlázy, neboť byla pozorována vysoká afinita pro 3,3,5-trijodthyronin (T₃) [88]. Aktivita v rámci metabolismu xenobiotik byla pozorována zatím u dvou substrátů: *p*-nitrofenolu a N-hydroxy-2-acetylaminofluorenu (N-OH-AAF) [89]. Afinita hSULT1C2 k OH-AAF ale není jednoznačná, neboť hSULT1C2 vykazuje nízkou aktivitu k tomuto substrátu a je koncentračně závislý. Technikou „Northern blot“ byla mRNA tohoto

enzymu detekována v ledvinách, žaludku, v jaterní a ledvinné tkáni plodu [81], ve štítné žláze, vaječnicích a v některých částech mozku [90].

Zde je dobré podotknout, že Freimuth a kol. zavedli nomenklaturu, ve které *IC1* a *IC2* geny kódují příslušné isoformy 1C1 a 1C2 [91]. Blanchard a kol. však navrhli nazývat formu 1C1 formou 1C2 a formu 1C2 formou 1C4, kvůli odlišnosti původního hSULT1C1 a rSULT1C1 (nejedná se o orthologní geny) [92]. V odborném textu tedy může nastat záměna a je třeba brát tuto okolnost v úvahu (novou nomenklaturu používá i internetová databáze proteinů UniProt KB).

rSULT1C2 a rSULT1C2A jsou vysoce homologní (z 92%) ale přesto odlišné enzymy, které byly detekovány v největším množství v ledvinách, dále v žaludku a v játrech. Z testovaných sloučenin byl sulfatován pouze *p*-nitrofenol (např. dopamin, acetaminofen, α -naftol s enzymem nereagovaly). Sekvence rSULT1C2A je z 84% identická s lidskou formou tohoto enzymu a jsou kódovány orthologními geny [93].

hSULT1C3

Tento enzym byl zatím připraven jen synteticky na základě domnělého genu *IC3*. Nebyla detekována žádná aktivita s typickými substráty pro hSULT1 podrodinu - *p*-nitrofenolem a 1-naftolem, ani s xenobiotiky např. paracetamolem a ethanolem. Technikou imunoblotu však byla detekována aktivita s deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků - konkrétně 1-hydroxymethylpyrenem, 1-(*a*-hydroxy) ethylpyrenem a 6-hydroxymethylbenzo[*a*]pyrenem, při které došlo k metabolické aktivaci za vzniku mutagenů. Nepředpokládá se, že by tyto sloučeniny však byly typickými substráty a tato problematika musí být ještě zkoumána [94].

hSULT1C4

Tento enzym byl detekován v rámci genomové analýzy, avšak jeho funkce a distribuce nebyla zatím uspokojivě vyřešena. Byla prokázána aktivita se substráty jako *p*-nitrofenol [95], N-hydroxy-2-acetylaminofluoren (N-OH-AAF) [89], bisfenol A, 4-nonylfenol [96] a 1-hydroxymethylpyren [61], ale zatím se neprokázala žádná reaktivita s endogenními substráty. Aktivita enzymů nebyla detekována v žádné tkáni, ale mRNA byla nalezena v plicní a ledvinné tkáni plodu, ledvinách dospělého jedince, v menším množství v srdeční tkáni plodu a vaječnicích dospělého jedince [97].

rSULT1D1

Dle databáze UniProt KB se tato tzv. dopaminová sulfotransferasa zúčastňuje metabolismu katecholaminů jako např. dopamin a prostaglandiny. O tomto enzymu nejsou v literatuře podrobné informace. Pravděpodobně velmi podobný je mSULT1D1, který se nachází v játrech a ledvinách a zúčastňuje taktéž metabolismu katecholaminů, kde byla prokázána regulace glukokortikoidy (dexamethasonem) [98].

hSULT1E1

Tento enzym se také nazývá estrogenová sulfotransferasa, protože vykazuje vysokou afinitu k estrogenům v porovnání s jinými enzymy, které tyto substráty konjugují. hSULT1E1 katalyzuje reakce se steroidními hormony, estronem (E1) a 17 β -estradiolem (E2) [99], s thyroïdními hormony [100], s 1-naftolem, naringeninem [49] a s xenobiotickými metabolity např. *p*-nitrofenolem a 4-hydroxyonazolakem [101]. Účastní se také stereoselektivní aktivace promutagenu (-)-1- α -hydroxyethylpyrenu na mutagenní derivát [102]. Enzym hSULT1E1 byl identifikován ve tkáních jater [103], lačnicku tenkého střeva [104], epitelálních buňkách prsní tkáně a v endometriu [105, 106].

Jak již bylo zmíněno, hSULT1E1 katalyzuje konjugaci s estrogeny, ženskými pohlavními hormony. Estrogeny jsou zapojeny do komplexní regulace buněčné proliferace a apoptózy nádorů, citlivých na hladinu hormonů. Metabolismus těchto hormonů tedy úzce souvisí se vznikem nádorového bujení v prsní tkáni a endometriu. Bylo zjištěno, že hSULT1E1 katalyzuje vazbu N-OH-PhIP na DNA v buněčných kulturách lidské prsní tkáně v rámci procesu metabolické aktivace a tvorby nádoru [107]. Dále bylo zjištěno, že potenciálními inhibitory tohoto enzymu jsou polychlorované bifenyly, polutanty životního prostředí, které tak mohou narušovat hormonální cyklus u žen [108].

rSULT1E1

rSULT1E1 sdílí s hSULT1E1 73% sekvenční homologii. Na rozdíl od hSULT1E1, potkaní forma se nezúčastňuje aktivace ani jedné enantiomerní formy promutagenu 1-hydroxyethylpyrenu [109]. Byl zkoumán indukční efekt metamfetaminu, látky patřící mezi psychostimulancia, v potkaních tkáních jater a mozku. rSULT1E1 byl spolu s rSULT1A1 a rSULT2A1 výrazně indukován v obou orgánech [110]. Enzym rSULT1E1 je tedy také prokazatelně inducibilní. Studií *in vivo* zabývajících se rSULT1E1 v jaterní a intestinální tkáni však mnoho není a problematika nebyla zatím uspokojivě vyřešena.

hSULT2A1 a rSULT2A1

hSULT2A1 katalyzuje hlavně sulfonace steroidních sloučenin: dehydroepiandrosteronu (DHEA), pregnenolonu, testosteronu, kortizolu a 17 β -estradiolu [111], cholesterolu [112], žlučových kyselin [113]. Mezi xenobiotika, která jsou přeměňována tímto enzymem, patří např. hydroxymethylpyren, benzylové alkoholy [55], *p*-nitrofenol nebo N-hydroxy-2-acetylaminofluoren, hSULT2A1 forma se tedy zúčastňuje aktivace prokarcinogenů [114, 115]. Tento enzym se vyskytuje hlavně ve tkáni jater, lačnicku tenkého střeva a kůře nadledvin. V ostatních tkáních buď nebyl detekován, nebo ve velmi malém množství [104, 111].

Bylo prokázáno, že rSULT2A1 je inducibilní enzym a pravděpodobně může být ovlivňována jeho schopnost aktivovat prokarcinogeny v trávicím traktu (více viz kap. 4.3 Indukce sulfotransferas, str. 41)

rSULT2A2

rSULT2A2 byl zatím detekován jen v potkaní a myší tkáni a nemá orthologní zastoupení u lidí. V odborné literatuře je o tomto enzymu velmi málo informací. Zatím byl detekován jen na úrovni mRNA v jaterní tkáni a z hlediska své podobnosti se rSULT2B1b se předpokládá, že je jeho exprese ovlivněna steroidními látkami [116].

rSULT2A3 a hSULT2A3

Enzym rSULT2A3 je exprimován v jaterní tkáni potkanů a někdy je též nazýván žlučová sulfotransferasa. Bylo zkoumáno, jak se tento enzym podílí v játrech na aktivaci léčiva Tamoxifenu (*pozn.* Tamoxifen je léčivo používané při léčbě rakoviny prsu u žen). Z výsledku vyplývá, že rSULT2A3 aktivuje metabolit α -hydroxytamoxifen na ultimální genotoxický derivát, avšak jiné lidské ani potkaní enzymy ze SULT2 rodiny se na aktivaci nepodílí. Je tedy předpokládáno, že ke vzniku aduktů dochází v potkaních játrech, ale v lidských játrech toto léčivo karcinogenní ani mutagenní účinky nemá. [117, 118].

hSULT2A3 nebyl záměrně uveden v základním přehledu lidských sulfotransferas, neboť jsou informace o tomto enzymu dosti omezené. V roce 2000 byla sice vyřešena krystalová struktura lidské formy hSULT2A3 [119], avšak v odborné literatuře tento enzym není ani charakterizován z hlediska tkáňové a substrátové specifity ani nevystupuje v experimentech. Nimmagadda a kol. ve svém souhrnném článku o cytosolických

sulfotransferasach uvádí jako místo výskytu kortex a játra [120], tato informace však není v textu podložena žádnou citací.

hSULT2B1a a hSULT2B1b, rSULT2B1a a rSULT2B1b

Na rozdíl od hSULT2A1, který má širokou substrátovou specifitu, obě formy rSULT2B1 jsou vysoce specifické - hSULT2B1a isoforma katalyzuje konjugaci pregnenolonu (enzym bývá nazýván pregnenolonová sulfotransferasa) a hSULT2B1b isoforma konjugaci cholesterolu (cholesterolová sulfotransferasa) [121]. Žádná xenobiotika zatím nebyla prokázána jako substráty pro tento enzym. Expres na úrovni mRNA hSULT2B1 byla identifikována v placentě, prostatě a průdušnici a dále v menším množství v tkáni tenkého střeva a plic [122]. Dále se hSULT2B1b vyskytuje hlavně v kůži [123].

Enzym rSULT2B1a je primárně exprimován v mozkové tkáni a ve varlatech, zatímco rSULT2B1b se vyskytuje hlavně v kůži a tenkém střevě, ve velmi malém množství v játrech a placentě. Substrátová specifita je stejná jako u lidských forem, rSULT2B1a s velkou účinností katalyzuje konjugaci pregnenolonu a rSULT2B1b cholesterolu [123].

hSULT4A1 a rSULT4A1

V roce 2000 byly tyto enzymy identifikovány v mozkové tkáni a jsou z 99% sekvenčně podobné [124]. Jejich tvorba probíhá právě jen ve specifických částech mozku (např. v mozkové kůře, mozečku a kmeni mozkovém [125]), kde pravděpodobně ovlivňují některé nervové funkce v rámci centrálního nervového systému. Afinita lidské formy hSULT4A1 k substrátům není vysoká, ale byla detekována u trijodthyroninu, thyroxinu, estronu, *p*-nitrofenolu, 2-naftylaminu a 2-naftolu [126]. Vzhledem k velmi vysoké sekvenční homologii bude rSULT4A1 pravděpodobně vykazovat aktivitu ke stejným substrátům. Tyto enzymy se primárně neuplatňují v metabolismu léčiv a xenobiotik a jejich fyziologická funkce bude pravděpodobně na úrovni mozkové tkáně [124]. Několik studií spojuje enzym hSULT4A1 např. s incidencí schizofrenie a výskytu nitrolebních ependymomů u dětí (*pozn.* ependymom je neuroepiteliální nádor mozku) [127, 128].

hSULT6B1

Gen *6B1* byl poprvé identifikován a popsán v roce 2004 Freimuthem a kol. [129] a samotný enzym byl lokalizován poprvé pomocí RT-PCR ve varlatech a ledvinách [130]. Dodnes nebyl prokazatelně potvrzen žádný specifický substrát tohoto enzymu.

V tab. 2 a tab. 3 (str. 35) jsou shrnuty zástupci lidských hSULT a potkaních rSULT. Dále jsou zde uvedeny tkáně, ve kterých byly detekovány, substráty těchto enzymů a inducibilita.

Tab. 2: Přehled lidských hSULT

Enzym	Endogenní substráty a xenobiotika	Místo detekce v organismu	Inducibilita
hSULT1A1	steroidní sloučeniny, katecholaminy, xenobiotika (HAA, aromatické aminy, PAH), léčiva	játra, mozek, kůže, GIT, ledviny (a)	ANO
hSULT1A2	steroidní sloučeniny, katecholaminy, xenobiotika (HAA, aromatické aminy, PAH)	játra, GIT (a)	ANO
hSULT1A3/4	katecholaminy, jednoduché fenoly, léčiva, xenobiotika	GIT, játra (c)	ANO
hSULT1B1	jodothyroniny, xenobiotika	tenké a tlusté střevo, játra, leukocyty (a)	ANO
hSULT1C2	thyroidní hormony, xenobiotika	ledviny, žaludek, játra, štítná žláza, vaječníky, mozek (b)	?
hSULT1C3	?	?	?
hSULT1C4	xenobiotika	plice a ledviny plodu, ledviny (b)	?
hSULT1E1	steroidní a thyroïdní sloučeniny, xenobiotika (HAA)	játra (c), tenké střevo (a), prsní tkáň (a), endometrium (a, b)	ANO
hSULT2A1	steroidní sloučeniny, xenobiotika (HAA, aromatické aminy)	játra, tenké střevo, kůra nadledvin (a)	ANO
hSULT2A3	?	?	?
hSULT2B1a hSULT2B1b	pregnenolon cholesterol	plice, tenké střevo (b) placenta, prostata, průdušnice (b)	?
hSULT4A1	steroidní a thyroïdní sloučeniny	mozek (b)	?
hSULT6B1	?	varlata, ledviny (d)	?

Vysvětlivky: ? - neurčeno, a - detekce metodou „Western blot“, b - detekce metodou „Northern blot“, c - detekce prostřednictvím enzymové aktivity, d - detekce prostřednictvím RT-PCR

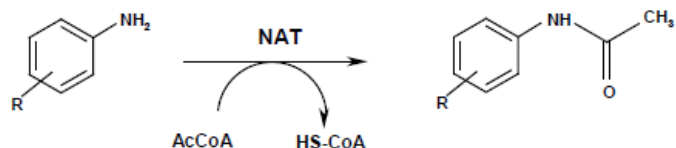
Tab. 3: Přehled potkaních rSULT

Enzym	Endogenní substráty a xenobiotika	Místo detekce v organismu	Inducibilita
rSULT1A1	steroidní sloučeniny, xenobiotika (HAA, aromatické aminy)	játra, ledviny, GIT, srdce (a)	ANO
rSULT1B1	jodothyroniny, xenobiotika	játra, ledviny, tlusté střevo (c)	ANO
rSULT1C1	xenobiotika (OH-AAF)	tenké střevo, játra, ledviny (c)	ANO
rSULT1C2 rSULT1C2A	<i>p</i> -nitrofenol	ledviny, žaludek, játra (a)	?
rSULT1D1	katecholaminy	?	?
rSULT1E1	steroidní a thyroïdní sloučeniny, xenobiotika (HAA)	játra, mozek (a)	ANO
rSULT2A1	steroidní sloučeniny, xenobiotika (HAA, aromatické aminy)	játra, tenké střevo (a)	ANO
rSULT2A2	?	játra (b)	?
rSULT2A3	steroidní sloučeniny	játra (c)	?
rSULT2B1a rSULT2B1b	pregnenolon cholesterol	mozek, varlata kůže, tenké střevo, játra (d)	
rSULT4A1	steroidní a thyroïdní sloučeniny	mozek (b)	?

Vysvětlivky: ? - neurčeno, a - detekce metodou „Western blot“, b - detekce metodou „Northern blot“, c - detekce prostřednictvím enzymové aktivity, d - detekce prostřednictvím RT-PCR

3.2.6 Konjugace s acetátem

Arylamín N-acetyltransferasy (NAT) katalyzují 2 typy reakcí: O-acetylaci a N-acetylaci. N-acetylace spočívá v přenosu acylového zbytku z acetyl-CoA na -NH₂ skupinu arylaminu za vzniku arylacetamidů (viz obr. 7, str. 36). Dochází tedy k produkci ve vodě rozpustných amidů z původně lipofilních, ve vodě málo rozpustných aminů. O-acetylace je formálně shodná s N-acetylací, přenos acylového zbytku však probíhá na -OH skupinu arylhydroxyaminů za vzniku acetoxyaminů. Předpokládá se, že N-acetylace sloučeniny převážně „inaktivuje“ na méně toxické sloučeniny a O-acetylace sloučeniny „aktivuje“ na toxickejší sloučeniny. Acetylace jsou důležitými reakcemi v biotransformaci xenobiotik zejména aromatických aminů, arylhydroxyaminů, aromatických heterocyklických aminů, a hydrazinů [43]. Role NAT v metabolismu endogenních substrátů však zatím není úplně známa.



Obr. 7: Schéma N-acetylace (převzato z [43])

3.2.6.1 Nomenklatura *N-acetyltransferas*

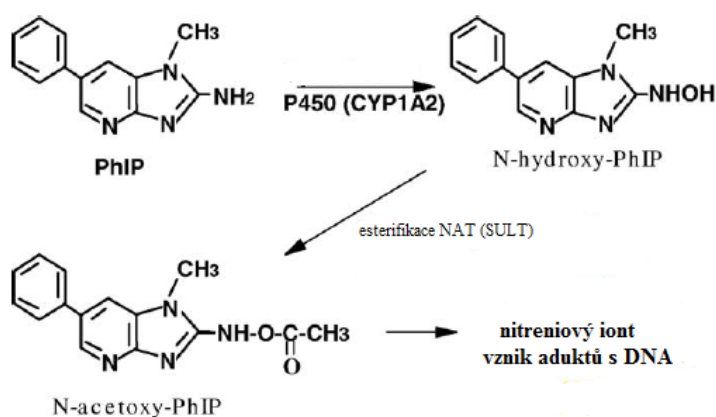
N-acetyltransferasy jsou cytosolární enzymy, které se nacházejí v mnoha tkáních nejrůznějších biologických druhů. U lidí rozeznáváme 2 isoformy: NAT1 a NAT2. Oba geny *loci*, kódující isoformy NAT1 a NAT2 jsou lokalizovány na osmém lidském chromozomu a jejich nukleotidové sekvence vykazují 85% homologii, enzymy se ale liší substrátovou specifitou. Pro úplnost je třeba uvést, že existuje ještě třetí gen *loci*, který kóduje pseudogen NATP, který ale není exprimován. Do roku 2011 bylo již identifikováno 28 lidských alelických variant NAT1 a 66 lidských alelických variant NAT2, jejichž seznam je pravidelně aktualizována na stránkách University v Louisville, v USA (poslední aktualizace 7/2011) [131]. Tento fakt poukazuje na značný genetický polymorfismus, který má vliv na individuální rozdíly v kapacitě metabolismu - rozlišují se tzv. rychlé a pomalé acetylační fenotypy.

3.2.6.2 Charakteristika *N-acetyltransferas*

Jak již bylo zmíněno výše, ačkoli obě isoformy katalyzují stejné reakce, mají rozdílnou substrátovou specifitu a také tkáňovou distribuci. Specifickým substrátem pro lidskou NAT1 je kyselina *p*-aminobenzoová (PABA), kyselina *p*-aminosalicylová, *p*-aminobenzylglutamát [132] a β -naftylamin. Forma NAT1 se vyskytuje především v extrahepatálních tkáních [133]. Naopak typickým substrátem pro NAT2 je sulfamethazin [46] a nachází se hlavně ve tkáni jater a tenkého střeva [134].

N-acetyltransferasy hrají důležitou roli v biotransformaci celé řady xenobiotik. N-acetylace za účasti obou isoform je důležitým mechanismem detoxikace aromatických aminů [135]. Oproti tomu O-acetylace arylhydroxylaminů, 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indolu (A α C) a dalších pyrolytických HAA probíhá za vzniku reaktivních N-acetoxyderivátů, které se mohou vázat na DNA [136, 137, 138]. Mezi HAA ze skupiny aminoimidazoarenů, které jsou biotransformovány za účasti NAT2 patří např. MeIQx a IQ [139, 140].

Jako typický příklad metabolické aktivace xenobiotika v organismu za katalýzy NAT lze uvést aktivaci 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridinu (PhIP), silného karcinogenu a mutagenu. CYP1A2 katalyzuje N-hydroxylaci na odpovídající 2-hydroxyamino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridin (N-hydroxy-PhIP), který je následně esterifikován N-acetyltransferasami (nebo sulfotransferasami) na vysoce reaktivní O-acetylový ester (nebo O-sulfonylový ester). Tyto estery pak podléhají heterocyklickému štěpení za vzniku nitreniového iontu, který stejně jako v předcházejícím případě vytváří adukty s DNA (obr. 8).



Obr. 8: Schéma metabolické aktivace PhIP za vzniku reaktivního nitreniového iontu (převzato a upraveno z [141])

V závislosti na acetylačním fenotypu se předpokládá, že jedinec s rychlejší acetylací bude vytvářet acetylací N-OH-metabolitů větší množství aduktů s DNA než jedinec s pomalejší acetylací. Na potkaních modelech s rozdílnými acetylačními fenotypy byl proveden experiment *in vivo*. Potkanům byly podávány sloučeniny heterocyklických aromatických aminů MeIQx a PhIP. PhIP-adukty byly detekovány v tlustém střevě, ale v zásadě se nelišili v závislosti na fenotypu. MeIQx-adukty byly detekovány hlavně v játrech a to ve výrazně větším množství u rychlého acetylačního typu [142]. Acetylační fenotyp je tedy určitě důležitý faktor z hlediska karcinogeneze a může ovlivňovat průběh biotransformace.

4. MODULACE ENZYMOVÉ AKTIVITY ENZYMŮ II. FÁZE BIOTRANSFORMACE

Z funkčního hlediska lze enzymy charakterizovat jako katalyzátory chemických reakcí probíhajících v organismech. Důležitou vlastností těchto katalyzátorů je jejich regulovatelnost, která může být v zásadě dvojitá - regulace množství enzymu na úrovni genové exprese a regulace enzymové aktivity. Enzymová aktivita může být regulována tzv. aktivátory nebo inhibitory, které se dohromady nazývají modulátory. Tyto látky se váží na enzym kovalentní vazbou (ireverzibilní inhibice) nebo slabými vazebnými interakcemi (reverzibilní inhibice) a ovlivňují tak kinetiku enzymových reakcí [143].

Z pohledu regulace na úrovni genové exprese existují dva typy enzymů. Prvním typem jsou konstitutivní enzymy, které jsou vytvářeny organismem bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost specifického stimulu. Pokud však lze ovlivnit exogenní stimulací genovou exprese enzymu tak, že dochází ke zvýšení jeho množství v organismu, nazývají se tyto enzymy inducibilní a látky, které to způsobí induktory. Stejně jako u regulace enzymové aktivity nazýváme sloučeniny zasahující do těchto dějů modulátory. Mezi modulátory patří hlavně léčiva, přirozené složky potravin, potravní doplňky a přídatné látky (aditiva). Významnou skupinu látek obsažených v potravě tvoří flavonoidy, a proto jsou podrobněji charakterizovány v následující kapitole.

4.1 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří významnou skupinu fenolických sloučenin. Fenolické sloučeniny jsou přírodní organické látky, pro něž je charakteristický výskyt různých násobků fenolových strukturních jednotek. Mezi přirozené funkce těchto sloučenin v rostlinách patří např. chemická obrana proti parazitům a patogenům nebo pigmentace [144].

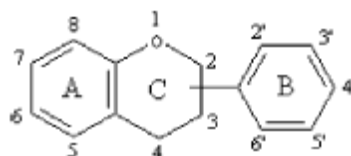
V současné době je známo více jak 8000 flavonoidů [145], které se zpravidla dělí podle své struktury do 7 skupin: flavony, isoflavony, flavonoly, flavanony, flavanoly, anthokyaniny a chalkony (viz tab. 4, str. 39). Jak vyplývá z tabulky, mezi hlavní zdroje flavonoidů patří zelenina, ovoce, čajové listy, sója a byliny [146].

Tab. 4: Základní třídy flavonoidů, příklady zástupců a jejich výskyt v potravě

Třída	Zástupci	Zdroj v potravě
flavonoly	kvercetin, rutin, myricetin, robinin, fisetin, galangin, kamferol	bobule, listy libečku, brokolice, černý rybíz, brusinky
flavanony	hesperetin, naringin, pinocembrin	pomeranč, pomelo, mandarinka
flavony	apigenin, chrysin, diosmin, luteolin, baikalein	petržel, oregano, tymián, celer
flavanoly	katechin, epikatechin, epigallokatechin, epikatechin gallát, theaflavin	zelený čaj, černý čaj, červené víno
anthokyaniny	kyanidin, malvidin, peonidin, petunidin	bobule, grep, červené víno, čaj
isoflavony	genistein, daidzein, glycitein, biochanin A	sója, sójová mouka, tofu, jetel
chalkony	xantohumol	pivo, chmel

(převzato a upraveno z [146, 147])

Základní strukturu flavonoidů tvoří flavanový skelet, znázorněný na obr. 9. Jednotlivé skupiny flavonoidů se pak odlišují počty a pozicemi navázaných hydroxyskupin. V přirozené formě jsou to látky ve vodě nerozpustné, a aby byly absorbovány, musí být metabolizovány v tenkém střevě nebo rozloženy mikroflórou v tlustém střevě. Výjimku tvoří anthokyaniny, které se přímo vstřebávají v gastrointestinálním traktu [148].



Obr. 9: Základní flavanový skelet flavonoidů (převzato a upraveno z [146])

O flavonoidech se mluví převážně jako o chemopreventivních sloučeninách. Působí jako tzv. „scavengery“ neboli vychytávače volných radikálů [149], mohou indukovat nebo inhibovat enzymy podílející se na metabolismu karcinogenů a potlačují vývoj neoplastického růstu ve tkáních např. tím, že podporují antiproliferační a pro-apoptické změny v nádorových buňkách.

Konzumace vysokých dávek může být pro člověka ale škodlivá a to hned z několika hledisek:

- látky mohou být sami o sobě toxické,
- metabolickou přeměnou mohou vznikat cytotoxické a mutagenní sloučeniny,
- mohou interferovat s metabolismem endogenních sloučenin,
- mohou interagovat s jinými látkami z potravy,
- mohou ovlivňovat střevní mikroflóru,
- mohou indukovat enzymy, které aktivují potravní prokarcinogeny [150].

4.2 Inhibice sulfotransferas

Nishimuta a kol. zkoumali vliv různých ovocných nápojů (grapefruitový a pomerančový džus, zelený, černý a polozelený čaj) a jejich složek na rekombinantní hSULT1A1 a hSULT1A3 *in vitro*. Jako substráty byly použity typické substráty těchto enzymů *p*-nitrofenol (1A1) a dopamin (1A3). Aktivita hSULT1A1 byla inhibována grapefruitovým a pomerančovým džusem z 80-90%, a téměř kompletně všemi třemi typy čajů. Aktivita hSULT1A3 byla inhibována nejvíce extrakty čajů téměř z 95%. Inhibice džusy byla u grapefruitového asi z 50% a pomerančového asi z 20%. Z látek obsažených v džusech nejvíce inhibovaly hSULT1A1 kvercetin, tangeretin a nobiletin. Nejsilnější inhibitor hSULT1A3 byl kvercetin. Katechiny obsažené v čajích inhibovaly aktivitu hSULT1A1 i hSULT1A3, v druhém případě byla inhibice slabší [151].

Jako další potenciální inhibitory byly zkoumány equol, daidzein, flavon, genistein, (+)-katechin, a opět již zmíněný kvercetin. Stejně jako v předchozí studii nejvíce inhiboval aktivitu hSULT1A1 kvercetin, téměř z 70%, a nejmenší inhibiční potenciál vykazoval flavon. Aktivita hSULT1A3 byla flavonoidy inhibována velmi málo, v případě flavonu nedošlo k žádné inhibici [152]. V další *in vitro* studii byl opět potvrzen inhibiční efekt extraktu ze zeleného čaje a prokázán inhibiční efekt extraktu z banaby, rostliny používající se v alternativní medicíně např. při léčbě diabetu (obsahuje 9-12% fenolických látek). Aktivita hSULT1A3 byla inhibována oproti jiným testovaným látkám relativně hodně. Extrakty ze sojových bobů, listů moruše nebo ječmene neinhibovaly aktivitu hSULT1A3 téměř vůbec [153]. Největší inhibice aktivity hSULT1E1 ze 37 testovaných flavonoidních sloučenin byla zaznamenána v případě genisteinu a equolu (equol je nesteroidní sloučenina

s estrogenním účinkem, která se tvoří ze sójového isoflavonu daidzeinu působením bakterií ve střevech) [154].

4.3 Indukce sulfotransferas

Stejně jako inhibice tak i indukce sulfotransferas je možná prostřednictvím léčiv, polutantů a doplňků stravy. Indukci hSULT léčivem prokázali Bian a kol. v podmínkách *in vitro* s Hep G2 buňkami prostřednictvím glukokortikoidů, konkrétně vliv dexamethasonu, který zvýšil aktivitu hSULT1A3/4 vůči substrátu téměř dvojnásobně [155].

Interakce doplňků stravy a intestinálních sulfotransferas jsou však zatím neprozkoumanou oblastí. Uvádím zde dostupné výzkumy, ve kterých se indukce složkami potravy prokázala v podmínkách *in vivo* i *in vitro*. Maiti a kol. provedli výzkum vlivu retinové kyseliny (bioaktivní forma vitamínu A) na rSULT v potkaních játrech a tenkém střevě. Po dvoutýdenní premedikaci potkanů kyselinou retinovou a substráty, 2-naftolem a dehydroepiandrosteronem (DHEA) byla prokázána indukce exprese rSULT1A1 v tenkém střevě a v játrech. V podmínkách *in vitro* na lidských rakovinných buňkách Hep G2 a Caco-2 byla prokázána indukce isoform hSULT1A1, hSULT2A1 i hSULT1E1 [156].

Prokázaným doplňkem stravy, který indukoval lidské formy hSULT1A1 a hSULT2A1, je genistein, isoflavon ze skupiny flavonoidů. Studie na Hep G2 a Caco-2 buňkách ukazuje, že genistein indukoval obě isoformy sulfotransferas a to v závislosti na dávce a také na času [157].

Další výzkum provedl Yeh a kol., kteří zkoumali indukční vlastnosti kyseliny gallové, gentisové, *p*-hydroxybenzoové, ferulové a *p*-kumarové na Hep G2 buňkách. Jako nejúčinnější induktor hSULT1A1 se ukázala být kyselina gallová a gentisová, dále *p*-hydroxybenzoová a *p*-kumarová [158]. Jedna z dalších studií *in vitro* na Hep G2 buňkách prokázala také indukční efekt β -naftoflavonu vůči hSULT enzymům, při reakci s 4-hydroxypropanololem (4-OH-PL). Z pěti zkoumaných enzymů (hSULT1A1, hSULT1A3/4, hSULT1B1, hSULT1E1 a hSULT2A1) vykazoval největší inducibilitu SULT1A3/4. Naopak hSULT2A1 nevykazoval žádnou aktivitu za daných podmínek [159].

In vivo studie Chana a kol. se zabývala indukčním potenciálem biochaninu A (BCA), přírodní látky patřící mezi flavonoidy a nacházející se v mnoha bylinných doplňcích stravy, na rSULT1A1, rSULT2A1 a rSULT1E1 isoformy. Potkani byli premedikováni po dobu sedmi dní různým množstvím dané látky a následně byly

analyzovány jejich játra a tenké střevo. Imunodetekcí byla prokázána indukce všech isoform v potkaních játrech a to jak samice, tak samce až na rSULT1E1, který nebyl indukován v játrech samice. V tenkém střevu došlo také k výrazné indukci isoform rSULT1A1 a rSULT2A1, přičemž u samců byl tento efekt výraznější [160].

Jedny z nejnovějších poznatků v této problematice přinesla skupina kolem Zhoua, která zkoumala indukční vlastnosti kofeinu na rSULT1A1 a rSULT2A1 isoformy v potkaních játrech a v tenkém střevě. Indukce rSULT1A1 a rSULT2A1 byla prokázána v obou orgánech, u samic i samců. Ačkoli se rSULT1A1 isoforma indukovala v játrech samce velmi výrazně, u rSULT2A1 formy nebyla účinnost tak markantní. Obecně byla indukce v tenkém střevě výraznější než v jaterní tkáni [161].

Tab. 5: Přehledný souhrn látek přírodního původu, které indukovali některé formy sulfotransferas v podmínkách *in vivo* nebo *in vitro*.

Podmínky	Enzym	Přírodní látka	Systém	Citace
<i>in vitro</i>	hSULT1A1	kys. retinová	Caco-2	[156]
		genistein	Caco-2	[157]
		kys. gallová	Hep G2	[158]
		kys. gentisová	Hep G2	[158]
		kys. <i>p</i> -kumarová	Hep G2	[158]
		β -naftoflavon	Hep G2	[159]
	hSULT2A1	kys. retinová	Caco-2	[156]
		genistein	Caco-2	[157]
	hSULT1E1	kys. retinová	Caco-2	[156]
		β -naftoflavon	Hep G2	[159]
hSULT1A3/4	β -naftoflavon	Hep G2	[159]	
hSULT1B1	β -naftoflavon	Hep G2	[159]	
<i>in vivo</i>	rSULT1A1	kys. retinová	potkaní tkáň tenkého střeva a jater	[156]
		biochanin A	potkaní tkáň tenkého střeva a jater	[160]
		kofein	potkaní tkáň tenkého střeva a jater	[161]
	rSULT2A1	biochanin A	potkaní tkáň tenkého střeva a jater	[160]
		kofein	potkaní tkáň tenkého střeva a jater	[161]

Vysvětlivky:

Caco-2 - buněčná kultura lidských, intestinálních rakovinných buněk

Hep G2 - buněčná kultura lidských, jaterních rakovinných buněk

4.4 Inhibice N-acetyltransferas

Kukongviriyapan a kol. testovali inhibiční efekt derivátů kyseliny skořicové, flavonoidů a kumarinu na lidských jaterních a KMBC buňkách (rakovinné buňky žlučovodu). Značný inhibiční efekt na hNAT1 vykazoval kvercetin a kyselina kávová, dále kamferol a genistein. Žádná testovaná fenolická látka neinhibovala hNAT2 ve srovnatelné míře jako NAT1, avšak kurkumin je silnějším inhibátorem hNAT2 než hNAT1 [162].

Další inhibiční efekt potravních komponent na N-acetyltransferasy byl prokázán Chenem a kol., kteří testovali efekt látek obsažených v česneku - diallyl sulfidu (DS) a diallyl disulfidu (DDS) na lidských nádorových buňkách tlustého střeva. Obě dvě látky vykazovaly inhibiční efekt na hNAT1 a hNAT2, který byl koncentračně závislý [163].

4.5 Indukce N-acetyltransferas

O indukci hNAT doplňky stravy je známo velmi málo. Dosud nebyla prokázána žádná přírodní látka, která by indukovala exprese enzymů NAT1 nebo NAT2. Jsou však známa některá léčiva, u kterých byl indukční efekt prokázán. Mitchell a Warshawsky prokázali indukční efekt 4-aminosalicylové kyseliny (PAS, k léčbě tuberkulózy) a sulfametazinu na obě formy v jaterních buňkách hNAT1 a hNAT2, do kterých byly pomocí vektorů vloženy příslušné geny enzymů. V buňkách močového měchýře došlo také k indukci těmito xenobiotiky, ale pouze formy NAT1 [164].

5. NAVRŽENÍ PEPTIDŮ PRO PRODUKCI PROTILÁTEK

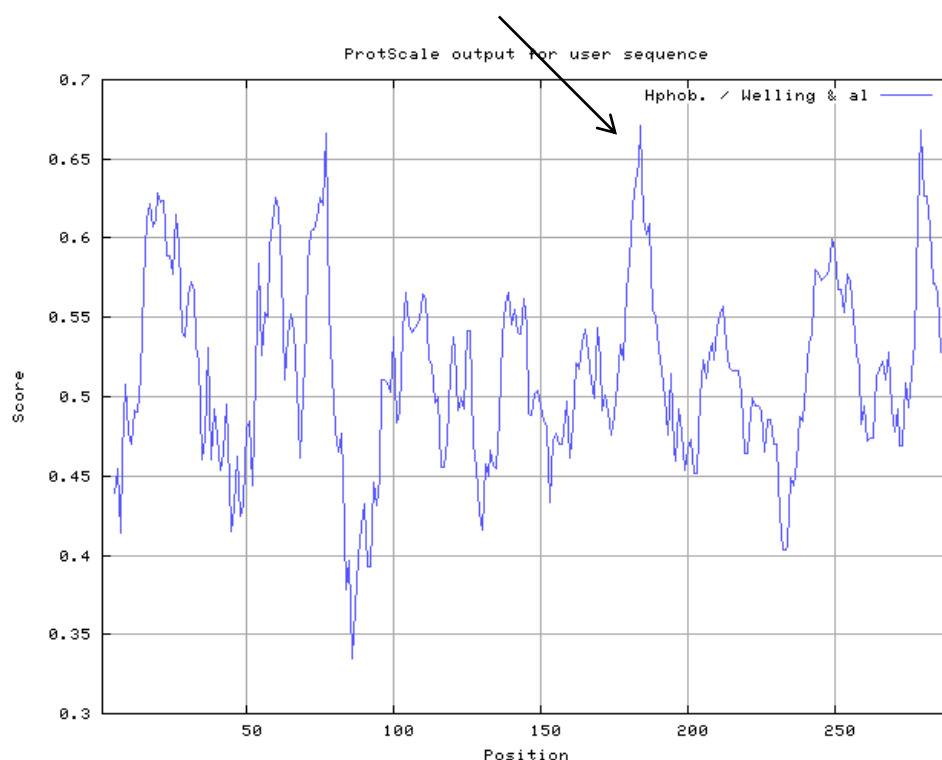
V kap. 3.2.5.2 a kap. 3.2.6.2. byly podrobně charakterizovány ty enzymy druhé fáze biotransformace, které se mimo jiné významně zúčastňují metabolické aktivace prokarcinogenů a promutagenů - sulfotransferasy a N-acetyltransferasy. Tyto dvě skupiny enzymů obsahují nemalý počet zástupců, z nichž velká část interaguje v gastrointestinálním traktu s metabolity vzniklými v první fázi biotransformace nebo přímo s látkami přijímanými v potravě. Inducibilní enzymy, které se metabolické aktivace zúčastňují, mohou být indukovány fytochemikáliemi (např. flavonoidy). Indukcí může být zvýšen potenciál metabolické aktivace, jejímž důsledkem bude zvýšený počet mutací DNA a tedy větší karcinogenní účinky na organismus. V rámci výzkumu této problematiky je tedy naší snahou zjistit, jaké vztahy mezi těmito ději jsou a jak flavonoidy indukují tyto enzymy. Jednou z výzkumných metod je využití protilátek, které mohou být použity k imunodetekci enzymů druhé fáze biotransformace v gastrointestinálním traktu. Protilátky vznikají jako odpověď imunitního systému na vybrané peptidy z proteinových sekvencí, neboť tyto peptidy působí ve fylogeneticky odlišném organismu jako antigeny.

5.1 Kritéria pro navrhování peptidických imunogenů

Při navrhování peptidů je důležité vybírat vhodné sekvence vybraných enzymů podle určitých vlastností, které jsou důležité pro konstrukci imunogenu. Vlastnosti lze vyhodnotit např. pomocí programů dostupných na internetových serverech. Jednotlivá kritéria a metody, které byly použity k navržení vhodných sekvencí, jsou popsány níže.

5.1.1 Antigenicita

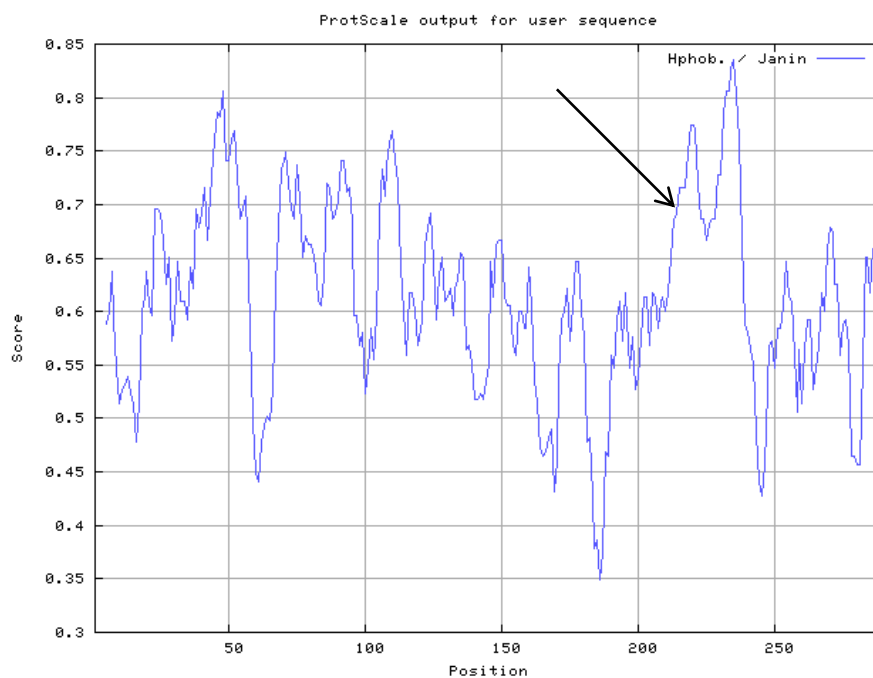
Peptid musí vykazovat antigenicitu, tedy schopnost chovat se v organismu jako antigen, vyvolávající tvorbu protilátek. Predikce této vlastnosti lze např. prostřednictvím programu (tzv. „scale“) „**Hphob. / Welling & al**“ [165], na portálu Expasy [166]. Na obr. 10 je grafické znázornění antigenicity, kde na horizontální ose jsou pozice jednotlivých aminokyselin (AMK) daného enzymu a na vertikální ose je míra antigenicity. Z obrázku je patrné, že vysokou antigenicitu vykazuje např. úsek 180-190 AMK.



Obr. 10: Predikce antigenicity v proteinové sekvenci enzymu rNAT1

5.1.2 Expozice

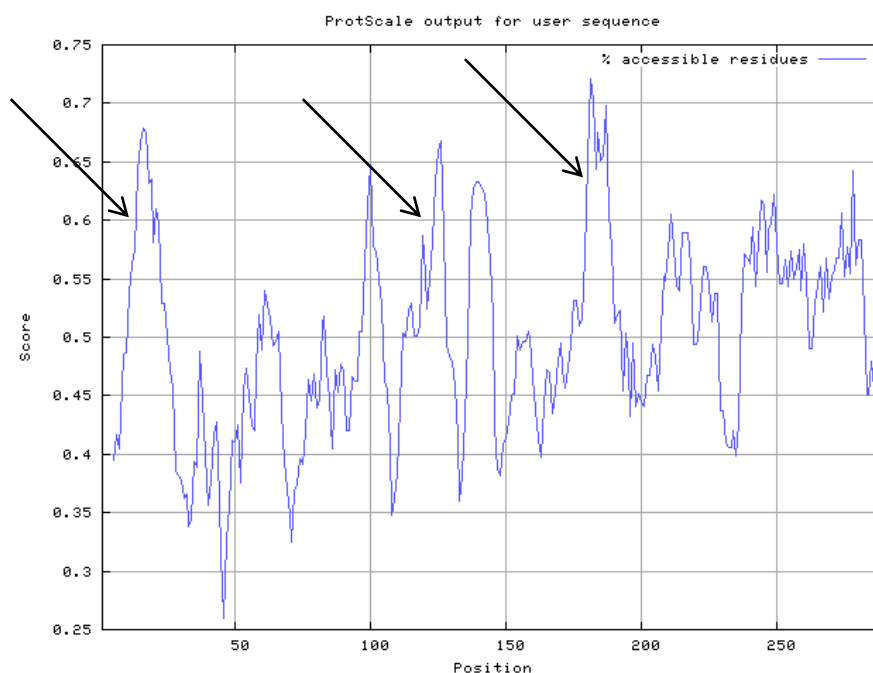
Další kritérium pro výběr sekvence peptidu je jeho dostupnost v rámci trojrozměrné struktury - peptid by měl být na povrchu proteinu. Predikovat tuto vlastnost lze pomocí programu „**Hphob. / Janin**“ [167], na portálu Expasy [166]. Stejně jako v předcházejícím případě lze z grafické presentace určit (obr. 11, str. 46), jaké úseky tuto vlastnost vykazují. Nejvyšší expozici zde vykazuje úsek okolo 220-235 AMK.



Obr. 11: Predikce expozice v proteinové sekvenci enzymu rNAT1

5.1.3 Přístupné aminokyselinové zbytky

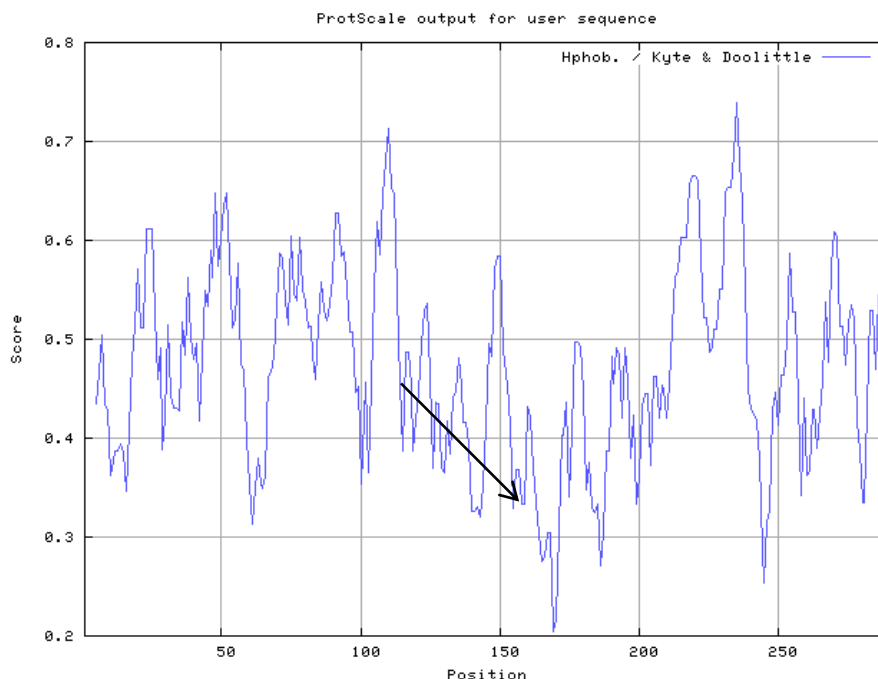
Důležitou vlastností peptidu je flexibilita a dostupnost zbytků aminokyselin. Predikce této vlastnosti lze pomocí programu „% accessible residues“ [167], na portálu Expasy [166]. Na obr. 12 je grafická presentace, ze které lze vyčíst hlavní úseky s přístupnými zbytky - 10-25 AMK, okolo 25 AMK a 170-190 AMK.



Obr. 12: Predikce přístupných zbytků v proteinové sekvenci enzymu rNAT1

5.1.4 Hydrofilita

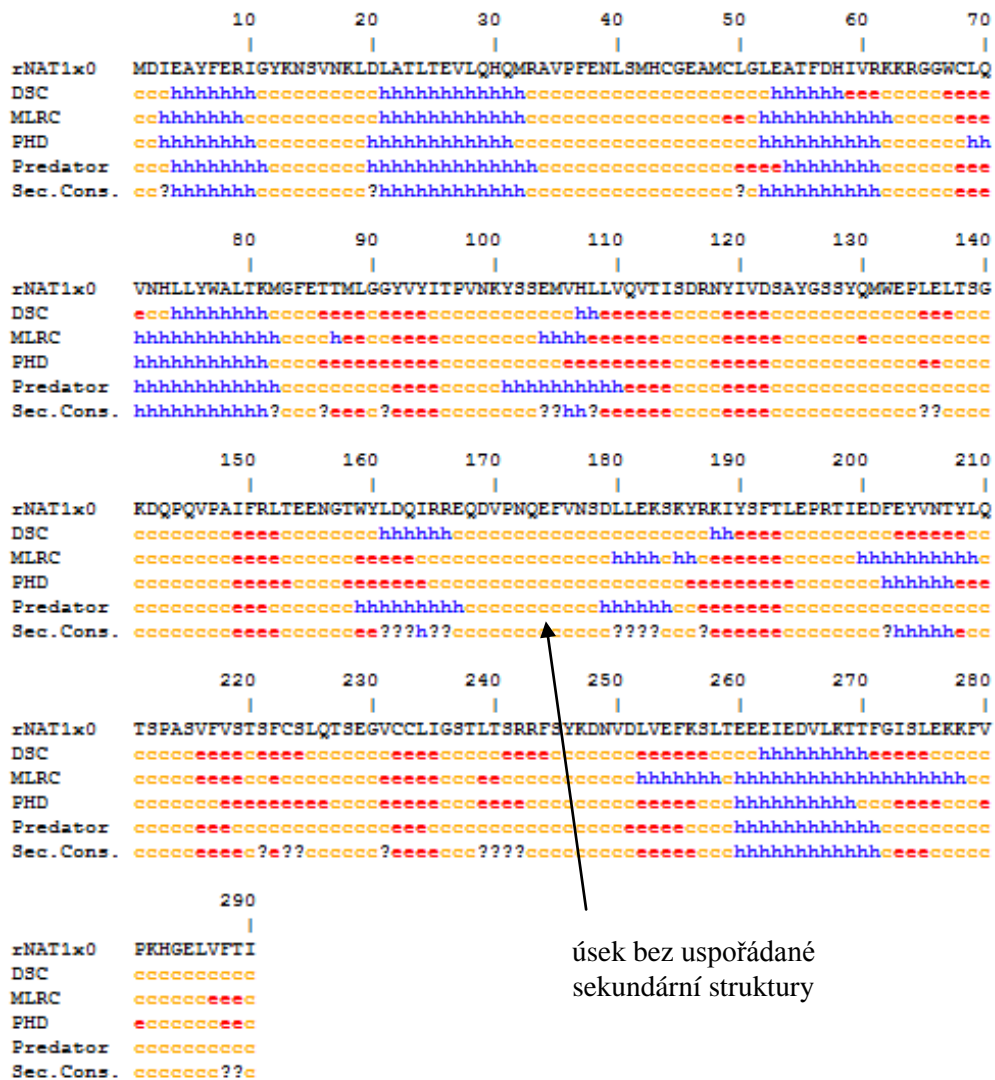
Dalším důležitým parametrem je hydrofilita. Predikci lze provést např. dle programu „**Hphob.** / **Kyte & Doolittle**“ [168], na portálu Expasy [166]. Stejně jako v předcházejících případech se jedná o grafické znázornění (obr. 13), kde je každé aminokyselině přiřazená určitá hodnota tohoto parametru a vytvořena spojitá křivka. Nízkou hydrofilitu zde vykazuje např. úsek okolo 160 AMK.



Obr. 13: Predikce hydrofility v proteinové sekvenci enzymu rNAT1

5.1.5 Absence uspořádané sekundární struktury

Navržený peptid by neměl vykazovat tendenci tvořit uspořádání sekundární struktury jako je dvoušroubovice (α -helix) a skládaný list (β -sheet). K predikci vhodných sekvencí může sloužit např. program **Network Protein Sequence Analysis** [169], který nabízí několik metod. Po zadání proteinové sekvence do příslušného pole se zobrazí kompletní predikce sekundární struktury, dle předem zadaných parametrů. Ve svém návrhu jsem použila metody **MLRC** [170], **DSC** [171], **PREDATOR** [172] a **PHD** [173]. Jednotlivé výsledky se seřadí pod proteinovou sekvencí enzymu, jak je zobrazeno na obr. 14, str. 48). Poslední řádek je průměrným vyhodnocením všech metod.



Obr. 14: Predikce sekundární struktury v proteinové sekvenci enzymu rNAT1 (h = α -helix, e = β -sheet, c = bez sekundární struktury, ? = nelze jednoznačně určit)

5.1.6 Jedinečnost sekvence

Jedním z nejdůležitějších parametrů je jedinečnost peptidu, neboť by aminokyselinová sekvence měla odpovídat pouze danému proteinu. Pro ověření jedinečnosti lze použít funkci **BLAST** na portálu UniProt [174]. Po vložení sekvence je generován grafický přehled všech enzymů, ve kterých se daný úsek nachází, popřípadě procentuální podobnost s jinými enzymy.

5.1.7 Délka peptidového imunogenu

Nejvhodnější délka peptidu bývá často sporná. Nejběžnější antigeny jsou 11-16 AMK dlouhé a jsou relativně snadno syntetizovatelné. Peptidy kratší než 9 AMK už pak nebývají jedinečné, naopak delší sekvence mohou obsahovat více epitopů. Komerčně prodávané anti-peptidové protilátky bývají připraveny proti peptidu v délce až 50 AMK. Takové peptidy již mohou vykazovat snahu vytvářet uspořádané sekundární struktury.

5.2 Strategie výběru nosného proteinu a hostitele

Navržení sekvence peptidu je první fází celého procesu. Důležitým krokem je zajistit, aby byl peptid vystaven imunitnímu systému v takové formě, aby vyvolal produkci protilátek schopných rozpoznat cílový protein. K tomuto účelu se používají tzv. nosné proteiny, které zajistí efektivní rozpoznání peptidu. Je tedy důležité vybrat vhodný protein a způsob připojení peptidického řetězce. Mezi nejčastější způsoby navázání peptidu na nosný protein patří metoda, která využívá volnou thiolovou skupinu aminokyselinového zbytku cysteinu. Nejvhodnější je, pokud daná sekvence na svém konci již cystein obsahuje. V případě, že cystein neobsahuje, je možné ho k sekvenci přidat na N- nebo C-konec sekvence.

Správný výběr nosného proteinu zajišťuje vyvolání co nejvýraznější imunitní odpovědi v těle hostitele. Mezi nejpoužívanější nosiče patří hemocyanin děrnatky obrovské (KLH), hovězí sérový albumin (BSA), ovalbumin (OVA) nebo králičí sérový albumin (RSA) [175].

Výběr odpovídajícího hostitele, který bude dostatečně a vhodně reagovat na antigen je finálním krokem. Zvířecí model by měl být geneticky vzdálený od zdrojového organismu, aby nedošlo k rozpoznání antigenu imunitním systémem. Pokud se navrhuje peptid ze sekvence lidského enzymu, je vhodné zvolit myši, králičí, nebo slepičí model hostitele než zvolit např. model primáta [175].

5.3 Vybrané peptidy rSULT a rNAT

K výzkumu vlivu chemických karcinogenů na organismus v podmínkách *in vivo* se používají nejčastěji potkaní modely a tyto modely budou použity i v této části. Na základě výše uvedených vlastností byly navrženy peptidy rSULT a rNAT, které splňují základní kritéria důležitá pro záměr výzkumu:

- enzym se zúčastňuje metabolismu xenobiotik,
- byl detekován nebo predikován v gastrointestinálním traktu,
- není prokazatelně konstitutivní (je potenciálně inducibilní)

V tab. 6 (str. 51) jsou přehledně charakterizovány jednotlivé navržené sekvence a uvedena kritéria, podle kterých byly vybrány (grafická zobrazení jednotlivých predikcí kritérií v rámci enzymu jsou přiloženy v příloze na konci této práce). V posledním sloupci je uvedeno hodnocení sekvence podle programu dostupného na internetu **Antigen Profiler** [176]. Program využívá sadu algoritmů k posouzení „kvality“ antigenů a porovnává je s daty z více jak třinácti tisíc peptidových protilátek. Po zadání sekvence do příslušného pole se zobrazí číslo ze škály od 0,0 do 5,0 (obr. 15). Za výborný antigen se považuje dosažení hodnot v rozmezí 2,7 - 5,0.



Obr. 15: Měřítko vhodnosti antigenu (převzato a upraveno z [176])

Tab. 6: Seznam navržených peptidových sekvencí rSULT a rNAT

Enzym	Sekvence peptidu	Pozice a velikost peptidu	Absence uspořádané sekundární struktury	Jedinečnost sekvence	Antigenicita	Expozice	Přístupné AMK zbytky	Hydrofilita	Antigen Profiler
rSULT1A1	CGRAPIYARVPF	66-77 (12 AMK)	ano	ano	++	+++	+	++	3,2
rSULT1B1	VLNDGNVEKC	61-70 (10 AMK)	ano	ano	++	++	++	+++	2,7
rSULT1C1	C-NYTTLPSSIMD	248-258 (11 AMK)	ano	ano	+	+++	+++	++	1,7
rSULT1C2	QPSGVDKANAM-C	90-100 (11 AMK)	ano	ano	++	++	+++	++	2,1
rSULT1E1	CPVKFRAEL	287-295 (9 AMK)	ano	ano	+++	+	+	+++	3,3
rSULT2A1	HLFSKSLFSSK-C	102-112 (11 AMK)	ano	ano	+++	++	+++	++	1,9
rNAT1	LELTSGKDQPQ-C	135-145 (11 AMK)	ano	#	++	++	+++	+++	3,2
	NSDLLEKSKY-C	177-186 (10 AMK)	ano	ano	+++	++	+++	+++	3,3
rNAT2	NTPANKYSSGM-C	95-105 (11 AMK)	ano	ano	++	++	+++	+++	1,8
	SGKDQPQVPA-C	139-148 (10 AMK)	ano	##	++	++	+++	+++	3,3

V tabulce jsou uvedeny jednotlivé vybrané peptidy příslušných enzymů, pořadí aminokyselin v proteinové sekvenci a délka peptidu. Dále jsou zde uvedena základní kritéria a hodnocení dle programu Antigen Profiler.

Vysvětlivky:

+ - projev dané vlastnosti (+ nízký, ++ průměrný, +++ velmi dobrý)

- sekvence je obsažena také v proteinu rNAT2

- sekvence je obsažena také v proteinu rNAT1

5. ZÁVĚR

V posledních dvou stoletích došlo k výraznému rozvoji průmyslu a to zejména farmaceutického, chemického a potravinářského odvětví. Produkty těchto průmyslových oborů jsou cizorodé chemické látky, které jsou pro organismus nepřírodní a mohou vyvolávat negativní změny. Určitou část tvoří i potravní karcinogeny a prokarcinogeny podléhající metabolické aktivaci, jejichž zástupci jsou např. heterocyklické aromatické aminy. Dlouhodobou expozicí těmto látkám se organismus vystavuje nebezpečí vzniku rakoviny. Jedním ze způsobů jak tyto jevy zmírňovat a potlačovat je pomocí chemopreventivních látek ve stravě. Významnými zástupci chemopreventivních sloučenin jsou flavonoidy a bylo prokázáno, že tyto látky na úrovni genové exprese inhibují tvorbu a aktivitu některých enzymů zúčastňujících se metabolické aktivace prokarcinogenů. V této práci jsou soustředěny studie, ve kterých se prokázaly inhibiční ale také indukční účinky některých rostlinných látek včetně flavonoidů na enzymy druhé fáze biotransformace - sulfotransferasy (SULT) a N-acetyltransferasy (NAT). Biochanin A, genistein, kyselina gentisová nebo kyselina gallová se projevily jako induktory rSULT1A1, rSULT2A1, hSULT1A1, hSULT2A1 a hSULT1B1. Indukce hNAT doplňky stravy zatím nebyla prokázána a tato oblast musí být ještě zkoumána.

Faktory, které ovlivňují vznik rakoviny, jsou především množství cizorodých látek, délka expozice, životní prostředí a interakce v organismu s ostatními přijímanými látkami. Právě detailní poznání přesných mechanismů, kterými jsou potravní karcinogeny metabolizovány, a mechanismů interakcí s jinými složkami stravy je důležité pro zdokonalování prevence rakoviny a její terapie.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Luch, A.: *Nat. Rev. Cancer* 5, 113-125 (2005), citováno dle: von Hohenheim, T.P.: *Von der Bergsucht oder Bergkrankheiten drey Bücher*, Sebaldum Mayer, Dilingen, Germany, (1567)
- [2] Harvey, R.G.: *Historical Overview of Chemical Carcinogenesis*, v knize *Chemical Carcinogenesis* (Penning, T.M.) Springer, USA (2011)
- [3] <http://www.uzis.cz/rychle-informace/zhoubne-nadory-roce-2009> (31.3.2012)
- [4] Sugimura, T. a kol.: *Mutagen-carcinogens in Food, with Special Reference to Highly Mutagenic Pyrolytic Products in Broiled Foods*, v knize *Originis of Human Cancer* (Hiatt, H.H, Watson, J.D, Winstein, J.A ed.) Cold Spring Harbor, NY, str. 1561 - 1577 (1977)
- [5] Willett, F.E., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Rosner, B.A., Speizer, F.E.: *N. Engl. J. Med.* 323, 1664 - 1672 (1990)
- [6] <http://www.cancer.org/Healthy/EatHealthyGetActive/ACSGuidelinesonNutritionPhysicalActivityforCancerPrevention/index> (25.3.2012)
- [7] Sporn, M.B., Liby, K.T.: *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2, 518–25 (2005)
- [8] Liu, R.H.: *J. Nutr.* 134, 3479S-3485S (2004)
- [9] Stratil, P., Kubáň, V.: *Chem. Listy* 98, 379–387 (2004)
- [10] Martínková, J. a kol.: *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*, GRADA Publishing, Havlíčkův Brod, (2007)
- [11] osobní stránky RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D <http://web.natur.cuni.cz/~nesmerak/>
- [12] <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php> (1.4.2012)
- [13] <http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=03C9F0A4-B1C2-31DE-ABA8508AE9949C57> (1.4.2012)
- [14] Sugimura, T., Sato, S.: *Cancer Res.* 43, 2415-2421 (1983)
- [15] Thiebaut, H.P., Knize, M.G., Kuzmicky, P.A., Hsieh, D.P., Felton, J.S.: *Food Chem. Toxicol.* 33, 821–828 (1995)
- [16] Matsumoto, T., Yoshida, D., Tomita, H.: *Cancer Lett.* 12, 105–110(1981)
- [17] Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H., Nagao, M.: *Cancer Sci.* 95, 290–299 (2004)
- [18] Zoshida, D., Matsumoto, T.: *Cancer Lett.* 10, 141-149 (1980)
- [19] Jagerstadt, M., Skog, K., Grivas, S.: *Mutat. Res.* 251, 219-233 (1991)

- [20] National Toxicology Program: Report on Carcinogenesis, Eleventh Edition. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Research Triangle Park, NC (2005) <http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=03C9B512-ACF8-C1F3ADBA53CAE848F635> (1.4. 2012)
- [21] Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T.: Chem. Listy 94, 913-918 (2000)
- [22] Ionescu, C., Mino, R.C.: Pathways of Biotransformation - Phase I Reactions, v knize Drug Metabolism: Current Concepts, Springer, Dordrecht, str. 41-129 (2005)
- [23] Stiborová, M.: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace, Sborník z multioborového semináře "Otevřená věda" z 22.- 29. 10. 2005, Praha
- [24] Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: Chem. Listy 93, 229-237 (1999)
- [25] Spatzenegger, M., Jaeger, W.: Drug Metab. Rev. 27, 397 (1995)
- [26] <http://www.cyped.uni-stuttgart.de/> (26.3.2012)
- [27] Guengerich, F.P.: Cancer Res. 48, 2946-2954 (1988)
- [28] Guengerich, F.P.: Human Cytochrome P450 Enzymes, v knize Cytochrome P450 - Structure, Mechanism and Biochemistry (de Montellano, P.R.O. ed.) Springer, NY, USA, str. 396 (2005)
- [29] Gonzalez, F.J., Gelboin, H.V.: Drug Metab. Rev. 26, 165 (1994)
- [30] Ioannides, C., Parke, D.V.: Drug Metab. Rev. 25, 485 (1993)
- [31] Juchan, M.R., Lee, Q.P., Fantel, A.G.: Drug Metab. Rev. 24, 195 (1992)
- [32] Penning, T.M.: Metabolic Activation of Chemical Carcinogens, v knize Chemical Carcinogenesis, Current Cancer Research (Penning, T.M ed.), Springer, USA, str. 135-159 (2010)
- [33] Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J., Martínek, V., Páca, J.: Chem. Listy 98, 876-890 (2004)
- [34] Goldman, R., Claycamp, G.H., Sweetland, A.: Free Radical Biol. Med. 27, 1053-1063 (1999)
- [35] O'Brian, P.J.: Chem.-Biol. Interact. 129, 113-139 (2000)
- [36] Malejka-Giganti, D., Ritter, C.L.: Environ. Health Perspect. 102, 75-81 (1994)
- [37] Gorlewska-Roberts, K.M., Teitel, C.H., Lay, J.O., Roberts, D.W., Kadlubar, F.F.: Chem. Res. Toxicol. 17, 1659-1666 (2004)
- [38] Wolz, E., Pfau, W., Degen, G.H.: Food Chem. Toxicol. 38, 513-522 (2000)

- [39] Kelley, D.J., Mestre, J.R., Subbaramaiah, K., Sacks, P.G., Schantz, S.P., Tanabe, T., Inoue, H., Ramonetti, J.T., Dannenberg, A.J.: *Carcinogenesis* 18, 795-799 (1997)
- [40] Vogel, C., Schuhmacher, U.S., Degen, G.H., Bolt, H.M., Pineau, T., Abel, J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 351, 265-271 (1998)
- [41] Zigler, D.M.: *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 321-324 (1990)
- [42] Krueger, S.K., Williams, D.E.: *Pharmacol. Ther.* 106, 357– 387 (2005)
- [43] Jancová, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E.: *Biomed. Pap.* 154, 103-116 (2010)
- [44] Gregory, P.A., Lewinsky, R.H., Gardener-Stephen, D.A, Mackenzie, P.I.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59, 405-411 (2004)
- [45] Cheng, Z., Radomska-Pandya, A., Tephly, T.R.: *Drug. Metab. Dispos.* 27, 1165-1170 (1999)
- [46] Grant, D.M., Blum, M., Beer, M., Mayer, U.A.: *Mol. Pharmacol.* 2, 184-191 (1991)
- [47] Armstrong, R.M.: *Chem. Res. Toxicol.* 10, 2-18 (1997)
- [48] Dostálek, M., Stark, A.K.: *Glutathione-S-transferases, v knize Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics* (Anzenbacher, P., Zanger, U.M. ed.) John Wiley & Sons, Weinheim, Germany, str. 147-165 (2012)
- [49] Falany, C.N.: *FASEB J.* 11, 206–216 (1997)
- [50] Glatt, H., Pabel, U., Meinl, W., Frederiksen, H., Frandsen, H., Muckel, E.: *Carcinogenesis* 25, 801-807 (2004)
- [51] Turesky, R.J., Marchard, L.L.: *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1169-1214 (2011)
- [52] Coughtrie, M.W.H, Sharp, S., Maxwell, K., Innes, N.P.: *Chem.-Biol. Int.* 109, 3-27 (1998)
- [53] Nagata, K., Yamazoe, Y.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 159-176 (2000)
- [54] Weinshilboum, R.M., Otterness, D.M., Aksoy, I.A., Wood, T.C., Her, C., Raftogians, R.B.: *FASEB J.* 11, 3-14 (1997)
- [55] Glatt, H.: *Chem.-Biol. Interact.* 129, 141-170 (2000)
- [56] Lindsay, J., Wang, L.L., Li, Y., Zhou, S.F., *Curr. Drug Metab.* 9, 99-105 (2008)
- [57] Brix, L.A., Duggleby, R.G., Gaedigk, A., McManus, M.E.: *Biochem. J.* 337, 337-343 (1999)
- [58] Ozawa, S., Chou, H.C., Kadlubar, F.F., Nagata, K., Yamazoe, Y., Kato, R.: *Jpn. J. Cancer Res.* 85, 1220–1228 (1994)
- [59] Meisheri, K.D., Johnson, G.A., Puddington, L.: *Biochem. Pharmacol.* 45, 271-279 (1993)

- [60] Hempel, N., Barnett, A., Gamage, N., McManus, M.E., Negishi, M.: Human SULT1A Sulfotransferases, v knize Human Cytosolic Sulfotransferases (Pacifci, G.M., Coughtrie, M.W.H. ed.), CRC Press, London, str. 181-232 (2005)
- [61] Glatt, H., Boeing, H., Engelke, C.E., Ma, L., Kuhlow, A., Pabel, U., Pomplun, D., Teubner, W., Meinel, W.: *Mutat. Res.* 482, 27–40 (2001)
- [62] Glatt, H.: Sulfotransferases, v knize Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics (Ioannides C. ed) John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, str. 363-450 (2001)
- [63] Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, R.G., Windmill, K.F., Martin, J.L., McManus, M.E.: *Toxicol. Sci.* 90, 5-22 (2006)
- [64] Nowell, S., Ambrosone, C.B., Ozawa, S., MacLeod, S.L., Mrackova, G., Williams, S., Plaxco, J., Kadlubar, F.F., Lang, N.P.: *Pharmacogenetics* 10, 789–797 (2000)
- [65] Chou, H.C., Lang, N.P., Kadlubar, F.F.: *Cancer Res.* 55, 525–529 (1995)
- [66] Yamazoe, Y., Nagata, K., Ozawa, S., Gong, D.W., Kato, R.: *Proc. Int. Symp. Princess Takamatsu Cancer Res. Fund.* 23, 154–162 (1995)
- [67] Abu-Zeid, M., Yamazoe, Y., Kato, R.: *Carcinogenesis* 13, 1307–1314 (1992)
- [68] Muckel, E., Frandsen, H., Glatt, H.: *Food Chem. Toxicol.* 40, 1063-1068 (2002)
- [69] Yamazoe, Y., Ozawa, S., Nagata, K., Gong, D.W., Kato, R.: *Environ. Health Perspect.* 102, 99-103 (1994)
- [70] Turesky, R.J., Skipper, P.L., Tannenbaum, S.R., Coles, B., Ketterer, B.: *Carcinogenesis* 7, 1483 - 1485 (1986)
- [71] Turesky, R.J., Aeschbacher, H.U., Malnoe, A., Würzner, H.P.: *Food Chem. Toxicol.* 26, 105-110 (1988)
- [72] Yasuda, S., Idell, S., Liu, M.C.: *Biochem. J.* 401, 497–503 (2007)
- [73] Sundaram, R.S., Szumanski, C., Otteness, D., Van Loon, J.A., Weinshilboum, R.D.: *Drug Metab. Dispos.* 17, 255-264 (1989)
- [74] Eisenhofer, G., Coughtrie, M.W.H., Goldstein, D.S.: *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 41-53 (1999)
- [75] Falany, C.N., Roth, J.A.: *Mol. Pharmacol.* 36, 29-33 (1989)
- [76] Hildebrandt, M.A.T., Salavaggione, O.E., Marin, Y.N., Flynn, H.C., Jalal, S., Wieben, S., Weinshilboum, R.M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 870-878 (2004)
- [77] Fujita, K., Nagata, K., Ozawa, S., Sasano, H., Yamazoe, Y.: *J. Biochem.* 122, 1052-1061 (1997)
- [78] Wang, J., Falany, J.L., Falany, C.N.: *Mol. Pharmacol.* 53, 274-282 (1998)

- [79] Fujita, K., Nagata, K., Yamazaki, T., Watanabe, E., Shimada, M., Yamazoe, Y.: *Biol. Pharm. Bull.* 22 446-452 (1999)
- [80] Teubner, W., Pabel, U., Meinl, W., Coughtrie, M.W.H., Falany, C.N, Kretzmacher, M., Seide, A., Glatt, H.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357, 135 (1998)
- [81] Dooley, T.P., Haldeman-Cahill, R., Joiner, J., Wilborn, T.W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 236-245 (2000)
- [82] Kester, M.H.A., Kaptein, E., Roest, T.J., van Dijk, C.H., Tibboel, D., Meinl, W.: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, 592-598 (2003)
- [83] Dunn, R.T., Gleason, B.A, Hartley, D.P, Klaassen, C.D.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 319-324 (1999)
- [84] Glatt, H., Pabel, U., Muckel, E., Meinl, W.: *Polycyclic Aromat. Compd.* 22, 955–967 (2002)
- [85] Shin, H.C., Kim, H.R, Cho, H.J., Yi, H., Cho, S.M., Lee, D.G., El-Aty, A.M.A., Kim, J.S., Sun, D., Amidon, G.L.: *Biopharm. Drug Dispos.* 30, 411-421 (2009)
- [86] Nagata, K., Ozawa, S., Miyata, M., Shimada, M., Gong, D.W., Yamazoe, Y., Kato, R.: *J. Biol. Chem.* 268, 24720–24725 (1993)
- [87] Edenharder, R., Sager, J.W., Glatt, H., Muckel, E., Platt, K.L: *Mutat. Res.* 521, 57-72 (2002)
- [88] Xinying, L., Clemens, D.L., Anderson, R.J.: *Biochem. Pharmacol.* 60, 1713-1716 (2000)
- [89] Yoshinary, K., Nagata, K., Shimada, M., Yamazoe, Y.: *Carcinogenesis* 19, 951-953 (1998)
- [90] Her, C., Kaur, G.P., Athwal, R.S., Weinshilboum, R.M.: *Genomics* 41, 467-470 (1997)
- [91] Freimuth, R.R., Raftogianis, R.B., Wood, T.C., Moon, E., Kim, U.-J., Siciliano, M.J., Weinshilboum, R.M.: *Genomics* 65, 157 - 165 (2000)
- [92] Blanchard, R.S., Freimuth, R.R., Buck, J., Weinshilboum, R.M, Coughtrie M.W.H: *Pharmacogenetics* 14, 199-211 (2004)
- [93] Xiangrong, L., Jöhnk, C., Hartmann, D., Schestag, F., Krömer, W., Gieselmann, V.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 242–250 (2000)
- [94] Meinl, W., Donath, C., Schenider, H., Sommer, Y., Glatt, H.: *Food Chem. Toxicol.* 46, 1249 - 1256 (2008)

- [95] Zhu, X., Veronese, M.E, Iocco, P., McManus, M.E.: *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28, 565-571 (1996)
- [96] Suiko, M., Sakakibara, Y., Liu, M-C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267, 80-84 (2000)
- [97] Sakakibara, Y., Yanagisawa, K., Takami, Y., Nakayama, T., Suiko, M., Liu, M-C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 681-686 (1998)
- [98] Wong, S., Tan, K., Carey, K.T., Fukushima, A., Tigauis, T., Cole, T.J.: *Endocrinology* 151, 185-194 (2010)
- [99] Falany, C.N., Krasnykh, V., Falany, J.L.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52, 529-539 (1995)
- [100] Kester, M.H.A., Kaptein, E., Roest, T.J., van Dijk, C.H., Tibboel, D., Meinl, W., Glatt, H., Coughtrie, M.W.H., Visser, T.J.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 1357-1364 (1999)
- [101] Engst, W., Pabel, U., Glatt, H.: *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11, 243-250 (2002)
- [102] Hagen, M., Pabel, U., Landsiedel, R., Bartsch, I., Falany, C.N., Glatt, H.: *Chem.-Biol. Int.* 109, 249-253 (1998)
- [103] Forbes-Bamforth, K.J., Coughtrie, M.W.H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 707-711 (1994)
- [104] Her, C., Szumlanski, C., Aksoy, I.A., Weinshilboum, R.M.: *Drug Metab. Dispos.* 24, 1328-1335 (1996)
- [105] Falany, J.L., Falany, C.N.: *Cancer Res.* 56, 1551-1555 (1996)
- [106] Falany, J.L., Azziz, R., Falany, C.N.: *Chem.-Biol. Int.* 109, 329-339 (1998)
- [107] Lewis, A.J., Walle, U.K., King, R.S., Kadlubar, F.F., Falany, C.N., Walle, T.: *Carcinogenesis* 19, 2049-2053 (1998)
- [108] Kester, M.H.A., Bulduk, S., Tibboel, D., Meinl, W., Glatt, H., Falany, C.N.: *Endocrinology* 141, 1897-1900 (2000)
- [109] Glatt, H., Engelke, Ch.E.H., Pabel U., Teubner, W., Jones, A.L., Coughtrie, M.W.H., Andrae K., Falany, Ch.N., Meinl, W.: *Toxicol. Lett.* 112-113, 341-348 (2000)
- [110] Zhou, T., Huang, Ch., Chen, Y., Shanbhag, P., Chen, G.: *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* 5, 125-132 (2010)
- [111] Comer, K.A., Falany, C.N.: *Mol. Pharmacol.* 41, 645-651 (1992)
- [112] Aksoy, I.A., Wood, T.C., Weinshilboum, R.M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 1621-1624 (1994)

- [113] Radomska, A., Comer, K.A., Zimniak, P., Falany, J., Isean, M., Falany, C.M.: *Biochem. J.* 272, 597-604 (1990)
- [114] Glatt, H., Pauly, K., Czich, A., Falany, J.L., Falany, C.N.: *Eur. J. Pharmacol.* 293, 173-181 (1995)
- [115] Glatt, H.: *FASEB J.* 11, 314-321 (1997)
- [116] Li, X., Pandak, W.M., Erickson, S.K., Ma, Y., Yin, L., Hylemon, P., Ren, S.: *J. Lipid Res.* 48, 2587-2596 (2007)
- [117] Glatt, H., Davis, W., Meinl, W., Hermsdörfer, H., Venitt, S., Phillips, D.H.: *Carcinogenesis* 19, 1709-1713 (1998)
- [118] Dawis, W., Hewer, A., Rajkowski, K.M., Meinl, W., Glatt, H., Phillips, D.H.: *Cancer Res.* 60, 2887-2891 (2000)
- [119] Pedersen, L.C., Petrotchenko, E.V., Negishi, M.: *FEBS Lett.* 475, 61-64 (2000)
- [120] Nimmagadda, D., Cherala, G., Ghatta, S.: *Indian J. Exp. Biol.* 44, 171-182 (2004)
- [121] Fuda, H., Lee, Y.C., Shimizu, C., Javitt, N.B., Strott, C.A.: *J. Biol. Chem.* 277, 36161-36166 (2002)
- [122] Her, Ch., Wood, T.C., Eichler, E.E., Mohrenweiser, H.W., Ramagli, L.S., Siciliano, M.J., Weinshilboum, R.M.: *Genomics* 53, 284-295 (1998)
- [123] Kohjitani, A., Fuda, H., Hanyu, O., Strott, Ch.A.: *Gene* 367, 66-73 (2006)
- [124] Falany, C.N., Xie, X., Wang, J., Ferrer, J., Falany, J.L.: *Biochem. J.* 346, 857-864 (2000)
- [125] Liyou, N.E, Buller, K.M, Tresillian, M.J., Elvin, C.M., Scott, H.L., Dood, P.R.: *J. Histochem. Cytochem.* 51, 1655-1664 (2003)
- [126] Sakakibara, Y., Suiko, M., Pai, T.G., Nakayama, T., Takami, Y., Katafuchi, J., Liu, M-Ch.: *Gene* 285, 39-47 (2002)
- [127] Brennan, M.D., Condra, J.: *Am. J. Med. Genet., Part B* 139, 69-72 (2005)
- [128] Modena, P., Lualdi, E., Facchinetti, F., Veltman, J., Reid, J.F., Minardi, S., Janssen, F. a kol.: *J. Clin. Oncol.* 24, 5223-5233 (2006)
- [129] Freimuth, R.R., Wiepert, M., Chute, C.G., Wieben, E.D., Weinshilboum, R.M.: *Pharmacogenomics J.* 4, 54-65 (2004)
- [130] Takahashi, S., Sakakibara, Y., Mishiro, E., Kouriki, H., Nobe, R., Kurogi, K., Yasuda, S., Liu, M-Ch., Suiko, M.: *J. Biochem.* 146, 399-405 (2009)

- [131] Department of Pharmacology and Toxicology, University of Louisville: <http://louisville.edu/medschool/pharmacology/consensus-human-arylamine-n-acetyltransferase-gene-nomenclature/> (1.5.2012)
- [132] Kawamura, A., Graham, J., Mushtag, A., Tsiftoglou, S.A, Vath, G.M, Hanna, P.E, Wagner, C.R, Sim, E.: *Biochem. Pharmacol.* 2, 347-359 (2005)
- [133] Hein, D.W., Doll, M.A., Fretland, A.J., Leff, M.A., Webb, S.J, Xiao, G.H., Devanaboyina, U.-S., Nangju, N.A., Feng, Y.: *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 9, 29-42 (2000)
- [134] Hein, D.W.: *Mutat. Res.* 506, 65-67 (2002)
- [135] Hein, D.W., Doll, M.A., Rustan, T.D., Gray, K., Feng, Y., Feguson, R.J., Grant, D.M., *Carcinogenesis* 14, 1633-1638 (1993)
- [136] Wakabayashi, K., Nagao, M., Esumi, H., Sugimura, T.: *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 16, 307-348 (1986)
- [137] Kato, R.: *CRV Crit. Rev. Toxicol.* 16, 307-348 (1986)
- [138] Kato, R., Yamazoe, Z.: *Jpn. J. Cancer Res.* 78, 297-311 (1987)
- [139] Bendaly, J., Zhao, S., Neale, J.R., Metry, K.J., Doll, M.A., States, J.Ch., Pierce, W.M., Hein, D.W.: *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 16, 1503-1509 (2007)
- [140] Wu, R.W., Tucker, J.D., Sorensen, K.J., Thomson, L.H., Felton, J.S.: *Mutat. Res.* 390, 93-103 (1997)
- [141] Snyderwine, E.G.: *Mutat. Res.* 506-507, 145-152 (2002)
- [142] Metry, K.J., Neale, J.R., Bendaly, J., Smith, N.B., Pierce, W.M., Hein, D.W.: *Drug Metab. Dispos.* 37, 2123-2126 (2009)
- [143] Kolektiv autorů: *Biochemie, skriptum PřF UK, Praha*, str. 54-59 (2009)
- [144] Haslam, E.: *Polyphenols - Structure and Biosynthesis*, v knize *Practical Polyphenols - From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*, Cambridge University Press, Cambridge, str. 10-84 (1998)
- [145] Pietta, P.G.: *J. Nat. Prod.* 63, 1035-1042 (2000)
- [146] Moon, Y.J., Wang, X., Morris, M.E.: *Toxicol. In Vitro* 20, 187-210 (2005)
- [147] Kale, A., Gavande, S., Kotwal, S.: *Phytother. Res.* 22, 567-577 (2008)
- [148] Nurmi, T., Mursu, J., Heinonen, M., Nurmi, A., Hiltunen, R., Voutilainen, S.: *J. Agric. Food Chem.* 57, 2274 - 2281 (2009)
- [149] Ferguson, L.R.: *Mutat. Res.* 475, 89-111 (2001)

- [150] Hodek, P., Křížková, J., Burdová, K., Šulc, M., Kizek, R., Hudeček, J., Stiborová, M.: *Chem.-Biol. Int.* 180, 1-9 (2009)
- [151] Nishimuta, H., Ohtani, H., Tsujimoto, M., Ogura, K., Hiratsuka, A., Sawada, Y.: *Biopharm. Drug Dispos.* 28, 491-500 (2007)
- [152] Ghazali, R.A., Waring, R.H.: *Life Sci.* 65, 1625-1632 (1999)
- [153] Nagai, M., Fukamachi, T., Tsujimoto, M., Ogura, K., Ohtani, H., Hori, S., Sawada, Y.: *Biol. Pharm. Bull* 32, 105-109 (2009)
- [154] Harris, R.M., Wood, D.M., Bottomley, L., Blagg, S., Owen, K., Hughes, P.J., Waring, R.H., Kirk, C.J.: *J. Endocrinol. Metab.* 89, 1779-1787 (2004)
- [155] Bian, H.S., Ngo, S.Y.Y., Tan, W., Wong, Ch.H., Boelsterli, K.A., Tan, T.M.Ch.: *Life Sci.* 81, 1659-1667 (2007)
- [156] Maiti, S., Chen, X., Chen, G.: *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96, 44-53 (2005)
- [157] Chen, Y., Huang, Ch., Zhou, T., Chen, G.: *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103, 533-559 (2008)
- [158] Yeh, C-T., Huang, S-M., Yen, G-C.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 4773-4776 (2005)
- [159] Miyano, J., Yamamoto, S., Hanioka, N., Narimatsu, S., Ishikawa, T., Ogura, K., Watabe, T., Nishimura, M., Ueda, N., Naito, S.: *Biochem. Pharm.* 69, 941-950 (2005)
- [160] Chen, Y., Huang, Ch., Zhou, T., Zhang, S., Chen, G.: *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 24, 102-114 (2009)
- [161] Zhou, T., Chen, Y., Huang, Ch., Chen, G.: *J. Appl. Toxicol.* 10.1002/jat.1698 (2011)
- [162] Kukongviriyapan, V., Phromsopa, N., Tassaneeyakul, W., Kukongviriyapan, U., Sripan B., Hahnvajjanawong, V., Bhudhisawasdi, V.: *Xenobiotica* 36, 15-28 (2006)
- [163] Chen, G.W., Chung, J.G., Hsieh, C.I., Lin, J.G.: *Food Chem. Toxicol.* 36, 761-770 (1998)
- [164] Mitchell, K.D., Warshavsky, D.: *Toxicol. Lett.* 139, 11-23 (2003)
- [165] Welling, G.W., Weijer, W.J., Van der Zee, R., Welling-Wester, S.: *FEBS Lett.* 188, 215-218 (1985)
- [166] www.expasy.org (15.5.2012)
- [167] Janin, J.: *Nature* 277, 491-492 (1979)
- [168] Kyte, J., Doolittle, R.F.: *J. Mol. Biol.* 157, 105-132 (1982)
- [169] Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., Deléage, G.: *TIBS* 25, 147-150 (2000)
na webových stránkách <http://npsa-pbil.ibcp.fr> (12.5.2012)

- [170] Guermeur, Y., Geourjon, C., Gallinari, P., Deléage, G.: *Bioinformatics* 15, 413-421 (1999)
- [171] King, R.D, Sternberg, M.J.E.: *Protein Sci.* 5, 2298-2310 (1996)
- [172] Frishman, D., Argos, P.: *Protein Eng.* 9, 133-142 (1996)
- [173] Rost, B., Sander, C.: *Proteins* 19, 55-72 (1994)
- [174] www.uniprot.org (20.5.2012)
- [175] Hoge, S.: Proteomics, Sigma-Genosys, The Woodlands, TX, USA
- [176] <https://www.openbiosystems.com/antibodies/custom/AntigenProfiler/?aliaspath=%2fantibodies%2fcustom%2fAntigenProfiler> (18.5.2012)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka