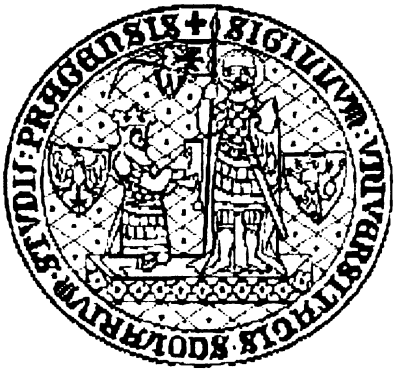
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



Studium redukční aktivace environmentálního polutantu a karcinogenu 3-nitrobenzanthronu

Diplomová práce

Jana Zavázalová

Školitelka: Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2007

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky doc. RNDr. Marie Stiborové, DrSc a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 9.4 2007 Jana Zavázalová

Děkuji vedoucí diplomové práce doc. RNDr.Marii Stiborové, DrSc. za zadání zajímavého tématu, cenné připomínky a rady a RNDr. Martině Svobodové za všestranný zájem, který mi při vypracování práce poskytla. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu laboratoře za potřebné rady, pomoc a příjemné pracovní prostředí.

Předmětová hesla: Indukce enzymů, Western blot, Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC

Klíčová hesla: 3-nitrobenzanthron, 3-aminobenzanthron, DT-diaforasa, mikrosomy, cytochrom P450

OBSAH

OBSAH.....1

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....4

1 ÚVOD.....7

1.1 Kancerogenese.....7

1.1.1 Mechanismus kancerogenese.....8

1.2 Biotransformace xenobiotik.....9

1.2.1 Derivatizační fáze biotransformace.....10

1.2.2 Konjugační fáze biotransformace.....11

1.3 Mikrosomální monooxygenázový systém.....13

1.3.1 Cytochrom P450.....13

1.3.1.1 Vybrané podrodiny CYP.....15

1.3.1.2 Reakční mechanismus monooxygenasové reakce.....17

1.3.1.3 Regulace hladiny cytochromů P450 indukcí enzymu.....19

1.3.2 NADPH:cytochrom P450 reduktasa.....20

1.4 Cytoplasmatické enzymy katalyzující redukční rce xenobiotik.....22

1.4.1 DT-diaforasa.....22

1.4.1.1 Indukce DT-diaforasy.....23

1.4.2 Xanthinoxidasa.....23

1.5 Aromatické nitrosloučeniny.....24

1.5.1 3-nitrobenzanthron.....25

1.5.1.1 Metabolismus 3-nitrobenzanthronu.....26

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....27

3 MATERIÁL A METODY.....28

3.1 Materiál.....28

3.2 Přístroje.....29

3.3 Metody.....3
3.3.1 Premedikace laboratorních potkanů.....31
3.3.2 Isolace subcelulárních systémů z orgánů lab. potkanů.....31
3.3.3 Stanovení koncentrace cytochromu P450..... 32
3.3.4 Stanovení koncentrace proteinu.....33
3.3.5 Studium metabolismu 3-NBA lids.rekombinantní DT-diaforasou.....34
3.3.5.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....35
3.3.6 Studium metabolismu 3-NBA mikrosomy jater potkanů premedikovaných fenobarbitalem, β-naftoflavonem a nepremedikovaných zvířat.....35
3.3.7 Studium vazby 3-NBA aktivovaného jaterním mikrosomálním systémem na proteiny.....36
3.3.8 Stanovení vybraných isoforem cytochromu P450.....36
3.3.8.1 Elektroforesa na polyakrylamidovém gelu za účast SDS.....37
3.3.8.2 Metoda ''Western blot''..... 39
3.3.8.3 Imunochemická detekce isoforem cytochromů P450.....40
3.3.8.4 Stanovení aktivity CYP1A1/2 O-dealkylací 7-ethoxyresorufinu.....40
3.3.8.5 Stanovení aktivity CYP1A1/2 oxidací Sudanu I.....41
4 VÝSLEDKY.....42
4.1 Metabolismus lidskou rekombinantní DT-diaforasou.....42
4.1.1 HPLC 3-NBA a 3-ABA.....42
4.1.2 Závislost přeměny 3-NBA na koncentraci DT-diaforasy.....43
4.1.3 Závislost přeměny 3-NBA na době inkubace.....44
4.1.4 Závislost přeměny 3-NBA na koncentraci 3-NBA.....45
4.2 Metabolismus 3-NBA jaterními mikrosomy potkana.....46

4.2.1 Závislost přeměny 3-NBA na době inkubace s mikrosomy jater potkanů premedikovaných fenobarbitalem, β-naftoflavonema potkanů nepremedikovaných..... 47

4.2.1.1 Studium za aerobních podmínek.....47

4.2.1.2 Studium za anaerobních podmínek.....49

4.2.2 Studium vazby 3-NBA aktivovaného jater.enzym.syst. potkana.....51

4.3 Vliv 3-NBA na vybrané biotransformační enzymy lab. potkana.....53

4.3.1 Vliv premedikace lab. potkanů 3-NBA na expresi proteinů cytochromů P450 1A1 a 1A2 v mikrosomech z jaterní tkáně.....54

4.3.2 Vliv premedikace potkanů 3-NBA na aktivitu CYP 1A1/2A.....55

5 DISKUSE.....57

6 ZÁVĚR.....59

7 SEZNAM LITERATURY.....60

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	aristolochové kyseliny
$A_{450\ (490,\ 550)}$	absorbance při vlnové délce 450 (490, 550) nm
3-ABA	3-aminobenzanthron
ACTH	adrenokortikotropní hormon
β-NF	β-naftoflavon
BHA	butylovaný hydroxyanisol
BHT	butylovaný hydroxytoluen
BSA	hovězí sérový albumin
$c_{b\ (P450)}$	koncentrace bílkoviny (cytochromu P450)
c_{BSA}	koncentrace hovězího sérového albuminu (BSA)
CDP	cytidindifosfát
CYP	cytochrom P450
CYP2	rodina cytochromu P450
CYP2B	podrodina cytochromu P450
CYP2B4	konkrétní isoforma cytochromu P450
Da	dalton
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EROD	O-deethylace 7-ethoxyresorufinu
ε	molární absorpční koeficient
FAD	flavinadenindinukleotid (chinoidní forma)
FADH	flavinadenindinukleotid (semichinoidní radikál)
$FADH_2$	flavinadenindinukleotid (hydrochinon)
FAFNT	A-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamid
FMN	flavinadeninmononukleotid (chinoidní forma)
FMNH	flavinadeninmononukleotid (semichinoidní radikál)

$FMNH_2$	flavinadeninmononukleotid (hydrochinon)
GIT	gastrointestinální trakt
HSA	lidský sérový albumin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IARC	Mezinárodní institut pro výzkum rakoviny (International Institute for Research on Cancer)
J 0,4 (4,0. 40)	jaterní mikrosomální frakce iSolovaná z potkanů premedikovaných 3-NBA
kDa	kilodalton
λ	vlnová délka
M (mM)	$mol.dm^{-3}$ ($mmol.dm^{-3}$)
MFO	systém monooxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxygenases)
ml	mililitr
mol	mol
MS	mikrosomy
3-NBA	3-nitrobenzanthron
NADH	nikotinamidadenindinukleotid, redukovaná forma
$NADP^+$	nikotinamidadenindinukleotidfosfát, oxidovaná forma
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát, redukovaná forma
NADPH g.s.	NADPH – generující systém
NAT	N-acetyltransferasa
nmol	nanomol
N-OH-ABA	N-hydroxy-3-aminobenzanthron
NQO1	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa
P 1 (2, 3)	pufr číslo 1 (2, 3)
PAPS	3´-fosfoadenosin-5´-fosfosulfát
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PB	fenobarbital
P450	pigment s maximem absorbance při 450 nm (cytochrom P450)

RNA	ribonukleová kyselina
RPM	počet otáček za minutu
SDS	sodná sůl kyseliny dodekasulfonové
SULT	sulfotransferasa
T_3	trijodtyronin
TRE	element pro thyroidální hormony
TRIS	tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	standardní jednotka enzymové aktivity (1U = 1 mol substrátu přeměněný enzymem za 1 minutu)
UDP	uridindifosfát
UV záření	ultrafialové záření
v/v	objemový zlomek
w/v	hmotnost/objem

1 ÚVOD

1.1 KANCEROGENESE

Za kancerogenesi je považován proces maligní transformace nenádorové buňky v nádorovou, následné dělení buněčného klonu, včetně další dediferenciace a zvyšování maligního potenciálu dělících se buněk[1]. Nádor je patologický útvar tvořený buňkami vlastního těla, které trvale rostou bez zřetele na potřeby organismu. Za základní podmínku vývoje nádorových procesů je v současnosti považováno vyvolání určitých genetických změn, které porušují regulační procesy a jež následně vedou ke ztrátě diferenciace buněk, k jejich nekontrolovanému množení a k narušení tkáňové celistvosti[2]. Proniká-li nádorová tkáň do sousední zdravé tkáně a odplavují-li se nádorové buňky do jiných orgánů, kde mohou vytvořit dceřiné nádory (metastázy), označujeme takový nádor za **maligní** (zhoubný). Buňky **benigních** (nezhoubných) nádorů též jeví sníženou kontrolu růstu, ale neinvadují do místní tkáně a nerozšiřují se do ostatních částí těla. Nádory mohou způsobovat agens fyzikální, chemická a biologická **(Tab. 1)**. Na vzniku nádorového onemocnění se nejčastěji podílejí chemické kancerogeny, které působí genotoxicky (váží se kovalentní vazbou na DNA), epigeneticky (modifikují DNA nekovalentně) či způsobují změny struktury DNA.

Tab. 1 Faktory vyvolávající kancerogenesi[3]

FYSIKÁLNÍ	UV záření, paprsky X, tepelné záření, mechanické vlivy
BIOCHEMICKÉ	onkogenní viry obsahují DNA nebo RNA jako svůj genom
CHEMICKÉ	k expozici dochází v zaměstnání (azbest, benzen), podáváním léků, stravy (aflatoxin B_1), životním stylem (kouření)

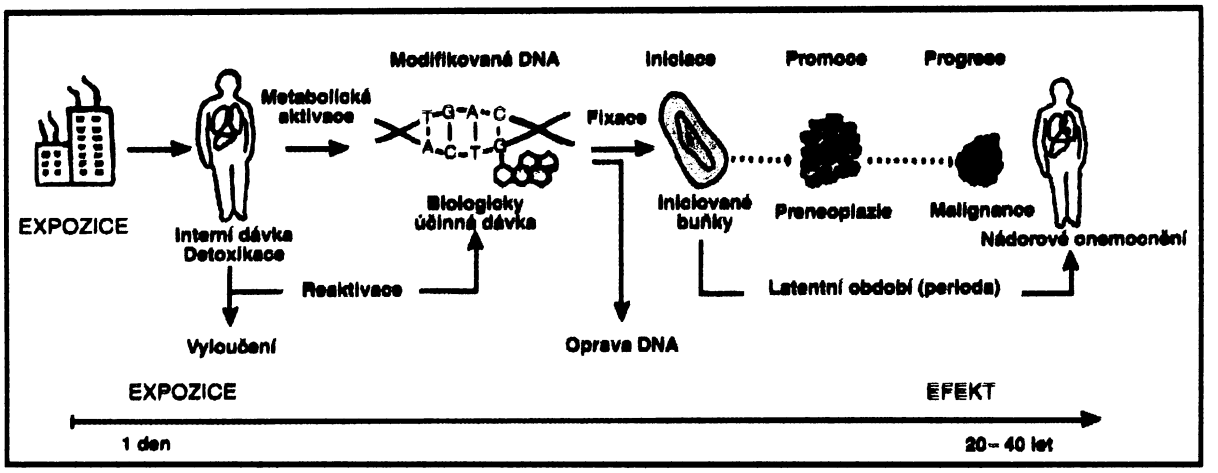
1.1.1 MECHANISMUS KANCEROGENESE

Samotný proces kancerogenese lze rozdělit do tří fází: iniciační, promoční a progresivní **(Obr. 1)**.

a) iniciační: dochází ke změnám genetické informace zdravých buněk, které vedou ke tvorbě prekancirogenní léze. Ta je vyvolána řadou modifikací molekul DNA. Většina těchto modifikací je eliminována opravnými mechanismy, některé však přetrvají a způsobí permanentní mutace v důležitých genech a výsledkem jsou rakovinotvorné procesy. Za nejzávažnější modifikaci DNA je třeba považovat tvorbu kovalentních aduktů, protože nádorové procesy jsou právě kovalentními vazbami na DNA iniciovány v případě více než 90% sloučenin prokázaných jako karcinogeny[2].

b) promoční: dochází ke zvýšené proliferaci primárně pozměněných buněk Klíčovými faktory této fáze jsou především aktivity proteinkinas a fosfatas a jejich regulace. Dalšími ovlivňujícími faktory jsou produkty onkogenů uvolňované po aktivaci onkogenů onkogenním virem nebo jiným kancerogenním podnětem a oxidativní změny molekuly DNA způsobené radikálovými formami kyslíku, jejichž vznik je často výsledkem oxidačních i redukčních reakcí, kterými jsou karcinogeny nebo další sloučeniny participující na této fázi kancerogenese metabolisovány[2].

c) progrese: nastává konečná přeměna do té doby částečně kontrolovaného růstu benigního (nezhoubného) nádoru na růst nekontrolovaný. Vzniká maligní (zhoubný) nádor, který prorůstá i do sousedních tkání a ničí je. Po vniknutí do cévního a lymfatického systému se nádorové buňky dostávají i do vzdálených orgánů a vznikají tak metastázy. Pro vznik maligního nádoru je potřeba vícenásobné genotoxické působení progresoru na cílovou tkáň[4].



Obr. 1 Schéma vícestupňového procesu kancerogenese[2].

1.2 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK

Proces chemické přeměny cizorodých látek (xenobiotik) v organismu vedoucí k ukončení či změně biologické aktivity se nazývá biotransformace. K biotransformaci dochází v řadě orgánů, z nichž nejdůležitější jsou játra, dále ledviny, plíce a další orgány. Vzhledem k tomu, že řada xenobiotik jsou organické látky hydrofobní povahy, které procházejí membránami a mohou se v těle kumulovat, je hlavním cílem biotransformace přeměna xenobiotik na polárnější metabolity snáze se vylučující[5]. Biotransformaci ovlivňuje mnoho individuálních faktorů **(Tab. 2)**.

V závislosti na chemické struktuře daného xenobiotika a enzymového systému, který přeměňuje danou látku v organismu, může dojít k negativnímu procesu, kdy místo detoxikace dané látky dojde k její aktivaci. Právě o působení karcinogenů je známo, že řada z nich (proximální karcinogeny) musí procházet biologickou aktivací, zatímco jen málo z nich je karcinogenní okamžitě (ultimální karcinogeny). Proces biotransformace xenobiotik je v živočišných organismech rozdělen do dvou fází – fáze derivatizační a na ni navazující fáze konjugační. V derivatizační fázi dochází ke zvýšení polarity, ve druhé fázi dochází ke konjugaci těchto polarizovaných molekul s endogenními látkami.

Tab. 2 Faktory ovlivňující biotransformaci

GENETICKÉ FAKTORY
EXISTENCE INDUKTORŮ A INHIBITORŮ MIKROSOMÁLNÍCH ENZYMŮ Při zvýšení aktivity se aplikovaná látka rychleji biotransformuje.
ONEMOCNĚNÍ JATER
ONEMOCNĚNÍ SRDCE Při sníženém průtoku játry se zhoršuje metabolismus některých látek.
VĚK PACIENTA Nejcitlivější jsou jedinci s nedostatečně vyvinutými detoxikačními mechanismy (děti) a nebo s těmito mechanismy „opotřebovanými" (staří lidé).
FARMAKODYNAMICKÉ FAKTORY Např. vazba xenobiotika (léčiva) na bílkoviny krevní plazmy.
POHLAVÍ
STRUKTURA XENOBIOTIKA

1.2.1 DERIVATIZAČNÍ FÁZE BIOTRANSFORMACE

Derivatizační fáze (I. fáze) zahrnuje takové reakce, kdy se zvyšuje polarita přijaté látky. Při těchto dějích dochází k vytvoření nebo odkrytí funkčních skupin v molekule metabolizované látky. Zahrnuje děje:

- **oxidace** (C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace, dealkylace, deaminace, epoxidace, oxidace alkoholů, oxidace aldehydů apod.)
- **hydrolýza** (esterů a amidů)
- **redukce** (nitro- a azoredukce)

Přeměnu xenobiotik zprostředkovávají v organismu mnohé enzymy. Mezi enzymy I. fáze patří v prvé řadě mikrosomální systém monooxygenas se smíšenou funkcí **(MFO), cytochromy P450,** flavinové monooxygenasy, aldehyddehydrogenasa, karbonylreduktasy, peroxidasy a další[8]. Pro aromatické nitrosloučeniny je typická aktivace redukční cestou. Mezi významné reduktasy, které mohou participovat na redukční aktivaci, patří NADPH:cytochrom P450 reduktasa, DT-diaforasa (NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa), xanthioxidasa, aldehydoxidasa a cytochromy P450[6]. Přehled buněčné lokalizace těchto enzymů je uveden v **Tab. 3.**

Tab. 3 Příklady buněčné lokalizace enzymů I. fáze [7].

Enzym	**Lokalizace**
cytochromy P450	mikrosomy (endoplasmatické retikulum)
flavinové monooxygenasy	mikrosomy
alkoholdehydrogenasy	cytosol
aldehyddehydrogenasy	**mitochondrie,** cytosol
peptidasy	**lysosomy, krev**

1.2.2 KONJUGAČNÍ FÁZE BIOTRANSFORMACE

Konjugační fáze (II. fáze) zahrnuje řadu syntetických reakcí, při nichž jsou xenobiotikum nebo jeho metabolit konjugovány s endogenními hydrofilními molekulami za vzniku nových chemických sloučenin, které jsou potom snadněji exkretovány. Mezi poznané konjugační složky patří kyseliny glukuronová, aktivní acetát, aktivní sulfát, cystein, acetylcystein, glycin, glutamin, glutathion a taurin[8]. Exkrece nejčastěji probíhá močí a žlučí.

I v této fázi však může dojít k aktivaci xenobiotika na toxičtější sloučeninu. Tak je tomu např. u konjugátů se sulfátem vznikajících účinkem sulfotransferas. Při tomto

procesu musí být sulfát nejprve aktivován na 3´-fosfoadenosin-5´-fosfosulfát (PAPS). Konjugát sulfátu s N-hydroxy sloučeninami (z I. fáze biotransformace) je v kyselém prostředí moči nestabilní a rozpadá se za vzniku nitréniového (event. karbeniového) iontu. Vzniká tedy elektrofil reagující s DNA a proteiny. Podobně účinkem acetyltransferas vznikají O-, N-acetylderiváty. V případě aromatických aminů se jedná o N-acetylarylaminy nebo N-acetoxyarylaminy, které se také rozpadají za vzniku nitréniového (karbéniového) iontu. Konjugáty s glukuronovou kyselinou přispívají spíše k detoxifikaci než aktivaci[6]. Tvoří se glukosiduronáty působením UDP-glukuronosyltransferasy. Konjugáty s glutathionem mají také výrazně detoxifikační povahu. Tvoří se též spontánně, ale reakci urychluje glutathiontransferasa. Výsledné vyloučené sloučeniny jsou merkapturové kyseliny. γ-glutamylový zbytek je odštěpen v ledvinách a glycinový v játrech, zbylý cysteilový zbytek je ještě acetylován. Řada látek se vylučuje i v kombinaci s různými aminokyselinami (např. cystein, glycin, taurin) [9].

Tab. 4 Příklady buněčné lokalizace enzymů II. fáze [7].

Enzym	**Lokalizace**
UDP-glukuronosyltransferasy	mikrosomy
glutathion S-transferasy	cytosol, mikrosomy
sulfotransferarasy	cytosol

Enzymová výbava je u jednotlivých druhů značně odlišná, proto může být stejná látka u jednotlivých druhů živočichů rozdílně metabolisována. Proto je také přenos metabolických experimentů prováděných na laboratorních zvířatech někdy obtížně přenositelný na člověka. Rozdíly v enzymové výbavě však existují i v rámci druhu, protože zde existuje geneticky podmíněný polymorfismus[6]. Ten má za následek, že u některých jedinců se chemická látka může metabolisovat mnohem rychleji či naopak mnohem pomaleji než u jiných nebo může být dokonce metabolisována i rozdílným způsobem[6].

1.3 MIKROSOMÁLNÍ MONOOXYGENASOVÝ SYSTÉM

Mikrosomální monooxygenasový systém je soubor enzymů katalyzující celou řadu oxidačních, oxygenačních, popř. redukčních reakcí, přičemž využívá především molekulární kyslík[10]. Je též nazýván systémem oxidas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases = MFO systém). Má tři základní složky: flavoproteinový enzym **NADPH:P450 reduktasu**, která slouží jako dělič elektronového páru, hemthiolátový enzym **cytochrom P450** jako terminální oxidasu a jeho neméně důležitou součástí je též biologická membrána. **Membránové lipidy** způsobují konformační změny cytochromu P450 zvyšující jeho afinitu k substrátu, stimulují tvorbu funkčně aktivního komplexu cytochrom P450-NADPH:P450 reduktasa a jsou „zásobárnou" uložených substrátů cytochromu P450[11]. Fakultativně může MFO systém obsahovat také cytochrom b_5 a NADH:cytochrom b_5 reduktasu[6].

MFO systém může být lokalizován:

- na vnější (cytosolární) straně membrány hladkého i hrubého endoplasmatického retikula v orgánech exponovaných látkám cizorodé povahy (játra, ledviny, plíce, GIT, kůže, mozek). Zde se účastní první fáze biotransformace xenobiotik nebo
- na mitochondriální membráně, jak je tomu zejména v kůře nadledvin, kde participuje na metabolismu endogenních látek (například steroidů mastných kyselin).

1.3.1 CYTOCHROM P450

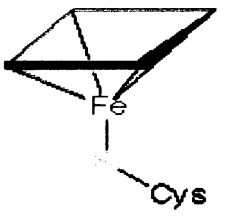
Cytochrom P450 (Obr. 2), je terminální oxidasou MFO systému - zprostředkovává vazbu molekulárního kyslíku, jeho aktivaci a zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu[12], přičemž druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Elektrony potřebné k redukci dodává NADPH:cytochrom P450 reduktasa[13], případně NADH:cytochrom b_5 reduktasa[14].

Obr. 2 Cytochrom P450 3A4 [54]

Garfinkel s Klingenbergem v roce 1958 objevili v jaterních mikrosomech pigment, který po redukci vykazuje v komplexu s oxidem uhelnatým **absorbční maximum při 450 nm**[15,16]. Hemoproteinový charakter pigmentu dokázali Omura a Sato roku 1964 a na základě podobnosti povahy vazby hemu cytochromům b a podle netypického maxima Söretova pásu jej nazvali cytochromem P450 (CYP)[17]. Cytochromy P450 se vyskytují nejen v živočišné říši, ale lze je nalézt i v rostlinách a bakteriích. Cytochrom P450 je v eukaryotických buňkách lokalizován v membráně endoplasmatického retikula nebo mitochondrií. Jedná se o hemoprotein složený z jednoho polypeptidového řetězce o délce okolo 500 aminokyselin obsahující jednu molekulu hemu b vázanou koordinačně kovalentní vazbou přes -SH skupinu cysteinu, která je proximálním (pátým) ligandem železa v hemu[11]. **Nejedná se tedy o klasický cytochrom, ale o hemthiolátový protein** (správnější označení by tedy bylo „enzym P450").

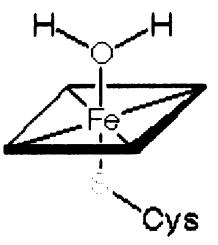
Cytochromy P450 díky přechodnému charakteru hemového železa existují ve dvou spinových formách [11]:

- **vysokospinová forma (Obr. 3)** vzniká v případě, že ion železa je **pentakoordinovaný** a všechny jeho valenční elektrony jsou nespárované (spin 5/2). Ion železa je „vytahován" thiolátovou skupinou nad rovinu porfyrinového skeletu a tato forma vykazuje maximum Söretova pásu při **390 nm**.



Obr. 3 Vysokospinová forma

- **nízkospinová forma (Obr. 4)** spin 1/2 je charakteristická maximem absorbce **při 418 nm** (Söretův pás). Ion železa je **hexakoordinován**, hemové železo tedy interaguje ještě s jedním ligandem (např. s -OH, -COOH nebo $-NH_2$ skupinou postranních řetězců aminokyselin.



Obr. 4 Nízkospinová forma

apoproteinu [4] či atomem kyslíku z molekuly vody) a nachází se pak prakticky v rovině kruhu protoporfyrinu IX. Oba spinové stavy jsou v klidovém stavu v rovnováze. Jejich poměr se značně mění při **vazbě substrátu** do vazebného místa, kdy dochází k vytlačení šestého ligandu a tedy nárůstu obsahu vysokospinové formy. V absorpčním spektru se tedy ukáže nárůst absorbance při 390 nm a pokles při 418 nm tzv. "substrátové spektrum" .

Šestým ligandem železa se však může stát i samotný **substrát** (či nepřeměňovaná látka vázající se do aktivního centra enzymu) – pak registrujeme pokles absorbance při 390 nm a nárůst (dle heteroatomu) při 418 až 460 nm, tedy tak zvané "ligandové spektrum".

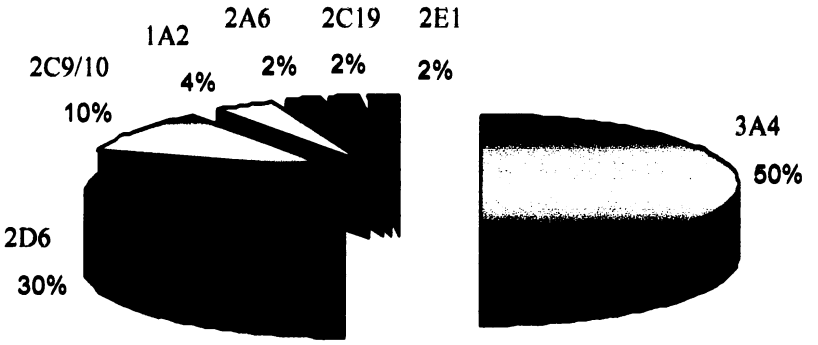
1.3.1.1 VYBRANÉ PODRODINY CYP450

Do současné doby bylo u člověka identifikováno 60 genů cytochromů P450. Byly nalezeny v játrech, střevě, plících, kůži, mozku, svalech, endotelu cév, krevních destičkách, placentě, nadledvinách a v jiných orgánech. Přehled jejich nejdůležitějších forem podílejících se na metabolismu xenobiotik u člověka, včetně orgánové distribuce, typických substrátů a inhibitorů, je uveden v **Tab. 4.**

Tab. 4 Přehled nejvýznamnějších lidských cytochromů P450[6,8]

CYP	lokalizace	typ. substrát	typ. induktor	rel. obsah (%)
1A1	plíce, játra, mozek, GIT, lymfocyty	PAH	PAH	1
1A2	játra	aromat.slouč.	PAH	12
2A6	játra	kumarin, steroidy	barbituráty	4
2B6	játra	nikotin	barbituráty	1
2C9	játra, ledviny	warfarin, ibalgin	barbituráty	10
2D6	játra	antidepresiva	není	4
2E1	játra	etanol, nitrosaminy	hlad,etanol,diabetes	6
3A4	játra, GIT, ledviny plíce, mozek	aflatoxiny	steroidy, barbituráty rifampicin	30

Jednotlivé cytochromy P450 se podílejí na metabolismu xenobiotik různou měrou. Relativní význam těchto enzymů v játrech člověka pro metabolismus cizorodých látek, zejména léčiv je znázorněn v **Obr. 5.**



Obr. 5 Relativní podíl forem CYP na biotransformaci xenobiotik

- **CYP1A**: Lidská podrodina CYP1A má dva členy CYP1A1 a CYP1A2, oba enzymy jsou si značně podobné (vykazují až 70% homologii v aminokyselinové sekvenci), oba se nejvýznamněji podílejí na metabolismu karcinogenních látek.
- **CYP1A1** je silně indukován β-NF, 3-methylchlorantrenem, fenothiazinem, (TCDD), benzo[a]pyrenem a dalšími látkami, a to i v játrech. Substráty CYP1A1 jsou polykondenzované aromatické uhlovodíky či aflatoxiny.
- **CYP1A2** se vyskytuje jen v játrech, úroveň jeho exprese zde podléhá polymorfismu. Indukován je obdobně jako CYP1A1. CYP1A2 metabolisuje antipyrin, tamoxifen, theofylin.
- **CYP2B:** V lidském organismu je v játrech a plicích zastoupen hlavně CYP2B6. Silnými induktory podrodiny CYP2B jsou barbituráty a dexamethazon.
- **CYP2C:** Je málo inducibilní. V lidském organismu převažuje CYP2C8 a CYP2C9. Substráty této podrodiny jsou hlavně léčiva s menší molekulou např. ibuprofen, diazepam.
- **CYP2D:** V lidském organismu se vyskytuje CYP2D6. Tato podrodina je podobná podrodině CYP2C (metabolisuje především léčiva s menší molekulou)[17].

- **CYP2E1:** V játrech lidského i potkaního organismu je zastoupen CYP2E1 asi 7%. Do jeho aktivního místa ústí úzký přístupový kanál, kterým projdou jen malé substráty.
- **CYP3A:** Tato podrodina hraje významnou roili v metabolismu xenobiotik v lidském organismu. Nejvýznamnějšími členy této podrodiny jsou v lidském organismu CYP3A4 a CYP3A5. Po indukci se jejich koncentrace může zvýšit až 20krát. Substrátová specifita CYP3A4 je mezi cytochromy P450 asi nejširší, CYP3A4 metabolisuje menší molekuly léčiv (nifedipin, cyklofosfamid), dále látky steroidní povahy (kortizo, testosteron, estradiol), ale také velkoobjemové substráty (erytromycin, cyklosporiny).

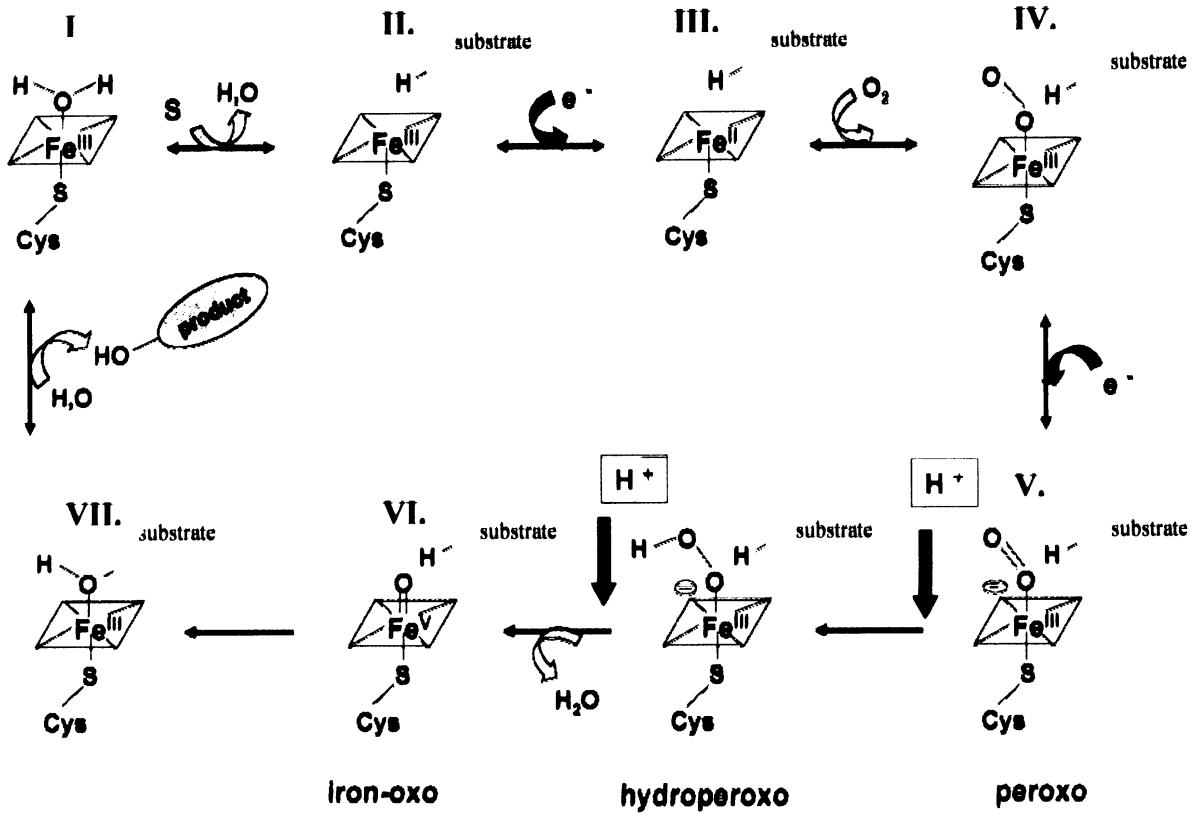
1.3.1.2 REAKČNÍ MECHANISMUS MONOOXYGENASOVÉ REAKCE

Nejtypičtější reakcí katalyzovanou cytochromy P450 je monooxygenasová reakce, která představuje aktivaci molekulárního kyslíku a zabudování jednoho atomu do molekuly substrátu prostřednictvím MFO systému. Aktivace kyslíku je umožněna dvěma elektrony pocházejícími převážně z NADPH:cytochrom P450 reduktasy, ale donorem druhého elektronu může být i cytochrom b_5 reduktasa[11]. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Obecný průběh monooxygenasové reakce katalyzované cytochromem P450 lze vyjádřit sumární rovnicí:

$$\mathbf{AH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow AOH + H_2O + NADP^+}$$

kde AH je substrát a AOH hydroxylovaný produkt reakce.

Reakční cyklus cytochromů P450 probíhá uspořádaným mechanismem jehož schéma je znázorněno na **Obr. 6.**



Obr. 6 Schéma reakčního mechanismu monooxygenasové reakce

I. V klidovém stavu je hemové železo ve ferri formě (má oxidační číslo III) a je hexakoordinováno (nízkospinový stav). Šestá valence je obsazena kyslíkem vody či aminokyselinovým (interním) ligandem.

II. Po vniknutí substrátu (AH) do aktivního místa dochází k vytlačení šestého ligandu železa, které zůstane pentakoordinované, a zároveň nastane konformační změna v molekule enzymu[19]. Vzniká binární komplex enzym-substrát (Fe^{III+} - AH).

III. Dalším krokem je jednoelektronová redukce cytochromu P450 pomocí NADPH:cytochrom P450 reduktasy, čímž se hemové železo redukuje na ferro formu (Fe^{II}), protože pouze redukovaná forma je schopna vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy. Železo je stále pentakoordinováno (vysokospinový stav).

IV. Navázáním molekulárního kyslíku na formu [III] vzniká ternární ferri-

superoxidový komplex. Ion železa je v nízkospinové formě a hexakoordinován. Tento komplex není příliš stabilní, je dále redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou nebo NADH:cytochrom b5 reduktasou, čímž je aktivován kyslík za tvorby peroxidového aniontu. Pokud není druhý elektron k dispozici dostatečně rychle, komplex [IV] se rozpadá a uvolněný superoxidový anionradikál je pak superoxiddismutasou přeměněn na peroxid vodíku, který je pro buňku toxický[19].

V. U komplexu cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku, který je již po druhé redukci zcela aktivovanou formou cytochromu P450, dochází k heterolytickému štěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku je redukován, přijme dva protony a dojde k uvolnění vody[19].

VI. Druhý atom kyslíku zůstává vázán na atomu Fe v hemu a vzniká ferrioxenový komplex, který je stabilizován mesomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylovaného radikálu vázaného na Fe hemu.

VII. Dochází k rekombinaci radikálů za uvolnění hydroxyderivátu substrátu (AOH) z enzymu a obnovení nativní formy cytochromu P450 [I] [19].

1.3.1.3 Regulace hladiny cytochromů P450 indukcí enzymu

Řada cytochromů P450 patří mezi inducibilní enzymy. Indukce enzymů je definována jako nárůst exprese katalyticky aktivních forem enzymů, jinak řečeno jako syntéza enzymů *de novo*, kdy dochází ke zvýšení transkripce na základě stimulace chemickým signálem[6].

Ve většině případů indukce cytochromů P450 zvyšuje biotransformaci xenobiotika, která by měla vést k jeho detoxifikaci a k vyloučení z organismu. Jedná se tedy především o ochranný mechanismus, avšak role indukovaných cytochromů P450 není v toxicitě xenobiotik zcela jednoznačná. Je pravdou , že indukce cytochromů P450 zvyšuje inaktivaci potenciálních toxických cizorodých látek, ale na druhé straně některé cytochromy P450 mohou nereaktivní sloučeninu aktivovat na chemicky

reaktivní intermediáty či intermediáty, které jsou toxické a některé z nich dokonce vykazují karcinogenní aktivitu[6].

U léčiv, která jsou účinná bez metabolické aktivace, může indukce cytochromu P450 zvýšit jejich eliminaci a snížit tak farmakologický efekt. Pokud je například léčivo induktorem a zároveň substrátem některé isoformy cytochromu P450, může tak stimulovat svoji detoxifikaci a tato skutečnost může vést až k toleranci organismu vůči danému léčivu. Naopak u „proléčiv", látek, které vyžadují metabolickou aktivaci a jejich efekt je vyvolán jejich metabolity, může indukce cytochromu P450 jejich farmakologický účinek zvýšit[6].

Indukce cytochromů P450 tedy může být pro organismus jak pozitivní (např. aktivace „proléčiv"), tak i negativní (např. vznik okamžitých karcinogenů). Výsledný efekt záleží také na dalších okolnostech indukce (v jakém orgánu k indukci dochází, jaká isoforma cytochromu P450 a v jakém množství je indukována)[6].

Indukci cytochromů P450 můžeme sledovat několika způsoby:

- rozdílnou farmakologickou účinností léčiva
- nárůstem množství mRNA detekovaným metodou „Northern blot"
- nárůstem katalytické aktivity cytochromu P450 (měření aktivity vůči specifickým substrátům)
- zvýšením obsahu cytochromu P450 (stanovení koncentrace cytochromu P450 spektrálními metodami a detekce metodou „Western blot" za použití specifických protilátek)

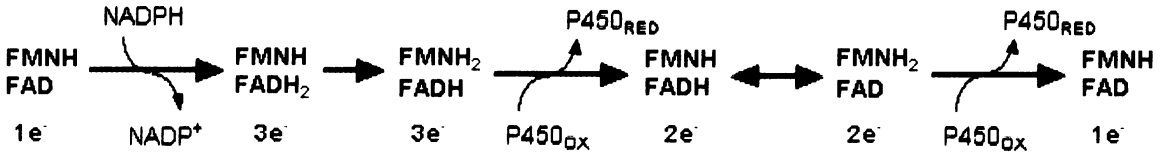
1.3.2 NADPH:CYTOCHROM P450 REDUKTASA

Enzym NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (EC 1.6.2.4) je membránově vázaný „žlutý protein", který katalyzuje přenos elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromu P450[20] (v daném organismu je jedna forma NADPH:cytochrom P450 reduktasy schopna spolupracovat s více formami cytochromu P450), dále také na cytochrom c[21], cytochrom b_5[20] hem oxygenasu, ferrikyanid, elongasu mastných kyselin a další[11,22]. NADPH:cytochrom P450

reduktasa může být za určitých okolností zastoupena NADH:cytochrom b_5 reduktasou[6], které jako donor vodíku slouží NADH.

Funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy je jako dělič elektronového páru **(Obr. 7)**[23]. Akceptorem elektronů (resp. atomů vodíku) od NADPH je FAD, který elektrony následně předává FMN. Za jednoelektronovou redukci akceptorové molekuly - cytochromu P450 - je (v případě savčí NADPH:cytochrom P450 reduktasy) zodpovědný zcela redukovaný $FMNH_2$[6].

Aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy je regulována zejména **hormonálně**, a to především hormonem štítné žlázy trijodtyroninem (T_3), který zasahuje do regulace exprese genu pro NADPH:cytochrom P450 reduktasu. Při absenci thyroidních hormonů v organismu dojde k poklesu aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy v mikrosomech jater o 75 až 85 %, naproti tomu v ledvinách či plicích činí tento pokles 30 až 50 % V nadledvinách a jiných steroidogenních tkáních je hladina NADPH:cytochrom P450 reduktasy regulována adrenokortikotropním hormonem (ACTH)[24].



Obr. 7 Schéma přenosu elektronů mezi flaviny NADPH:cytochrom P450 reduktasy

NADPH:cytochrom P450 reduktasa je v rámci fylogenese velmi konzervativní enzym, NADPH:cytochrom P450 reduktasy z různých rostlinných a živočišných druhů vykazují vysokou homologii v aminokyselinové sekvenci (například lidská a potkaní forma mají sekvenční homologii 92 %, přičemž nejvíce odlišností v aminokyselinové sekvenci se nachází v N-terminální "kotvící" oblasti a naopak, FMN-vazebná doména je u obou forem téměř shodná[25]. Tento fakt ukazuje na významnou roli tohoto enzymu v průběhu evoluce.

1.4 CYTOPLASMATICKÉ ENZYMY KATALYZUJÍCÍ REDUKČNÍ REAKCE XENOBIOTIK

1.4.1 DT-DIAFORASA

DT-diaforasa [NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa] je flavoprotein katalyzující dvouelektronové redukce chinonů a chinoidních sloučenin. Donorem elektronů pro tyto reakce může být jak NADH, tak i NADPH s totožnou efektivitou[26].

Enzym je homodimer, v každém aktivním centru má jednu prosthetickou skupinu (FAD). DT-diaforasa má supresní vliv na karcinogenezi způsobenou chinony a jejich metabolickými prekurzory (např. benzen, benzo[a]pyren)[27]. Toxické efekty chinoidních sloučenin spočívají v jejich kovalentní vazbě na DNA, RNA, proteiny a také v účasti na jednoelektronových oxidačně-redukčních pochodech vedoucích k tvorbě oxidativního stresu[24]. Ochranná role tohoto enzymu souvisí s jeho schopností redukovat chinony na hydrochinony a na jeho schopnosti kompetovat s dalšími reduktasami, které tvoří reaktivní formy kyslíku při katalýze jednoelektronových redukcí chinonů na semichinony[44]. Vzniklé hydrochinony jsou následně inaktivovány UDP-glukuronosyltransferasami[24].

Vedle redukce chinonů může DT-diaforasa rovněž redukovat (a aktivovat) řadu dalších sloučenin. Jde o cytostatika (např. mitomycin C nebo tirapazamin-3-amino-1,2,4-benzotriazen-1,4-dioxid) nebo o toxické polutanty jako azobarviva, nitroso- a nitroaromáty. Experimenty prováděné v naší laboratoři (katedra biochemie, PřF UK Praha) potvrdily, že potkaní DT-diaforasa vykazuje také nitroreduktasovou aktivitu vůči aristolochovým kyselinám (AA)[24,29]. Aktivita DT-diaforasy je vyšší v nádorových buňkách ve srovnání s buňkami zdravé tkáně. Enzym je nejúčinnější v anaerobních podmínkách, které jsou typické pro maligně transformované buňky[30,31].

Hlavní cytosolární forma lidské DT-diaforasy je kódována genem *NQO1*, lokalizovaným na chromozomu 16q2.2. V lidské populaci se vyskytují dvě rozdílné alely genu *NQO1*[29].

1.4.1.1 INDUKCE DT-DIAFORASY

DT-diaforasa je inducibilní enzym. Existuje mnoho strukturně odlišných sloučenin, které mají schopnost indukovat DT-diaforasu, a tak chránit laboratorní zvířata před efekty karcinogenů. Patří sem např. 1,1´-azonaftaleny, analoga Sudanu I, Sudanu III, kumariny, flavonoidy, polycyklické aromatické uhlovodíky, sloučeniny obsahující ve své molekule síru, fenolické antioxidanty, butylovaný hydroxytoluen (BHT), butylovaný hydroxyanisol (BHA)[32]. Přesný mechanismus indukce DT-diaforasy ještě nebyl zcela objasněn, nicméně existence různých genů v potkaních i lidských játrech nasvědčuje přítomnosti násobných forem enzymu[33]. DT-diaforasa je indukována prostřednictvím Ah receptoru, stejně jako například CYP1A. Tímto pravděpodobně nejdůležitějším mechanismem stimulují expresi tohoto enzymu například azobarviva a polycyklické aromatické uhlovodíky[32]. Tamoxifen, transhydroxytamoxifen a další látky patřící do skupiny antiestrogenů zajišťují indukci tohoto enzymu prostřednictvím receptoru specifického pro estrogeny (ER receptor)[34], jiné induktory (např. tert-butylhydrochinon) k indukci DT-diaforasy intracelulární receptor nepotřebují[35].

1.4.2 XANTHINOXIDASA

Xanthinoxidasa je flavoprotein, který katalyzuje oxidativní hydroxylaci řady aromatických heterocyklických sloučenin (xanthinu, hypoxanthinu) a aldehydů. V organismu má důležitou funkci především při odbourávání purinových bází. Z purinů se nejprve odštěpí ribosa a uvolněný guanin se deaminuje na xanthin. Ten podléhá hydroxylaci v poloze C_8 a vzniká kyselina močová[36]. Reakci lze schematicky znázornit rovnicí:

$$\text{xanthin} + O_2 + H_2O \rightarrow \text{kyselina močová} + H_2O_2$$

Eukaryotická xanthinoxidasa je homodimer, složený se ze dvou identických podjednotek o molární hmotnosti 130 kDa. Každý monomer je uspořádán do několika domén (několika systémů přenášejících elektrony):

- každá z prvních dvou domén je koordinována s $[Fe_2S_2]$ klastrem
- následuje flavinová doména
- nakonec jsou dvě domény vážící dvě molekuly molybdenu jako kofaktoru.

Tento komplex cyklicky přechází z plně oxidovaného stavu (Mo VI) do redukovaného stavu (Mo IV). Enzym se vyskytuje v jaterní tkáni obratlovců převážně ve formě xanthindehydrogenasy, skladováním při teplotě -20°C za přidání organických rozpouštědel může být převeden do oxidasové formy. Indukce xanthinoxidasy xenobiotiky nebyla prakticky zjištěna, existuje však regulace její aktivity endogenními látkami[37].

1.5 AROMATICKÉ NITROSLOUČENINY

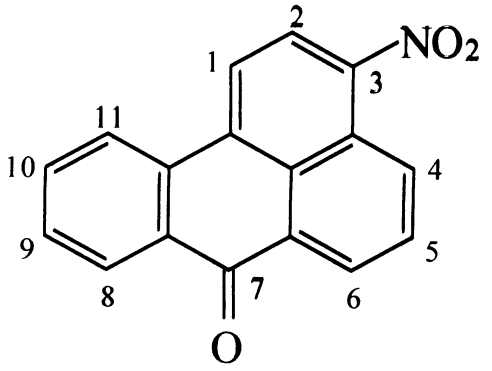
Aromatické nitrosloučeniny jsou významnou skupinou toxických a karcinogeních kontaminantů životního prostředí, které představují značný rizikový faktor pro lidské zdraví. Je zřejmé, že jsou přítomny ve všech složkách životního prostředí. Nitroaromáty jsou významnou součástí výfukových plynů a vzdušných prachových částic, na jejichž povrchu jsou adsorbovány. Nitroaromáty vznikají z oxidů dusíku produkovaných všemi vysokoteplotními procesy (spalování fosilních paliv, zpracování kovů), dalších vzdušných polutantů a polycyklických aromatických uhlovodíků – ty provázejí především automobilovou dopravu. Lokální znečištění aromatickými nitrosloučeninami je vyvoláno především úniky z technologií jejich zpracování. Přítomny jsou rovněž v cigaretovém kouři a vznikají též při úpravě některých potravin[38].

Z hlediska vlivu na zdraví člověka jsou aromatické nitrosloučeniny někdy považovány za jednotnou skupinu sloučenin. Jednotliví zástupci však vykazují speciální působení, které vyplývá z heterogenity jejich metabolismu a enzymů podílejícího se na tomto procesu v organismech. Většina aromatických nitrosloučenin

vykazuje mutagenní aktivitu v bakteriálních i savčích systémech a jsou karcinogeny vyvolávající nádorové procesy především na játrech, plicích a prsních žlázách. Jejich podíl na vývoji nádorových procesů nebyl doposud jednoznačně prokázán, ale epidemiologické studie u pacientů trpících nádorovým onemocněním prsu a plic naznačují potenciální podíl těchto sloučenin na etologii onemocnění obyvatelstva žijícího v prostředí jimi kontaminovaném[38].

1.5.1 3-NITROBENZANTHRON

3-nitrobenzanthron (3-NBA, 3-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on, **Obr. 8**), polycyklická aromatická nitrosloučenina, je jedním z nejsilnějších mutagenů, který je i karcinogenem pro hlodavce[39]. Jeho genotoxicita byla prokázána v řadě testů na mutagenitu[40,41] a byl dokázán potenciál tvořit specifické adukty s DNA detekované v experimentech *in vitro*, v buněčných kulturách a *in vivo* v organismu laboratorního potkana[6,28,29,32]. Jeho výskyt ve složkách životního prostředí a jako součást výfukových plynů byl prokázán teprve nedávno[44]. Tvořen je pravděpodobně buď nedokonalým spalováním nafty nebo reakcí parentálního polycyklického uhlovodíku s oxidy dusíku z atmosféry[39]. Výskyt 3-NBA je však rozmanitější. Nedávno byl detekován také v půdě na zemském povrchu a jako součást povrchových vod [43,44,45]. Tato sloučenina tedy ohrožuje velké skupiny lidské populace. Ohroženi jsou především profesionální řidiči, mechanici či horníci. Jako marker vystavení populace 3-NBA by mohl sloužit i jeho redukční metabolit 3-aminobenzanthron (3-ABA). Ten byl nedávno detekován v moči pracovníků solných dolů. I u této sloučeniny byla prokázána její genotoxicita [46].



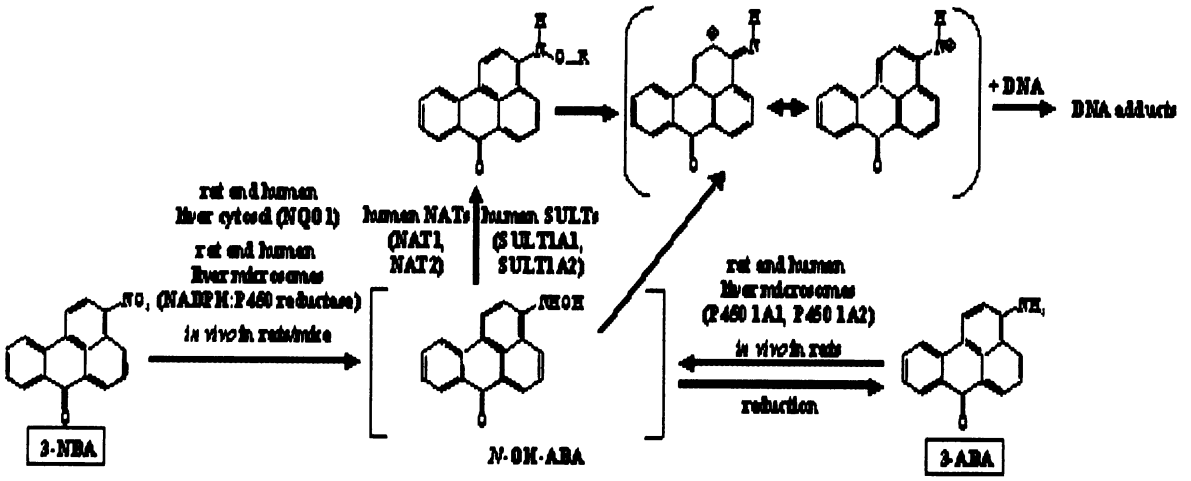
Obr. 8 Struktura 3-nitrobenzanthronu

1.5.1.1. METABOLISMUS 3-NBA

Předpokládaná cesta metabolické aktivace 3-NBA a 3-ABA za tvorby aduktů s DNA je uvedena na **Obr. 9.** Biotransformace 3-NBA probíhá zřejmě zejména redukční cestou. $-NO_2$ skupina je redukována na –NHOH. N-hydroxylamin je nestabilní, rozpadá se na nitréniový ion, který buď sám nebo po přeměně na ion karbéniový reaguje s nukleofilními centry DNA za tvorby aduktů. Tvorba nitréniového iontu je zvýšena konjugací s aktivním sulfátem nebo acetátem[29].

N-hydroxylamin může být redukován až na 3-ABA, který může být naopak oxidován za vzniku N-hydroxylaminu.

Metabolická aktivace 3-NBA a 3-ABA probíhají v organismu enzymově katalyzovanými reakcemi. Enzymy participující na aktivaci těchto sloučenin byly určeny teprve nedávno. Jedná se o cytochromy P450 (oxidují 3-ABA na N-hydroxylamin), NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu a DT-diaforasu (redukují 3-NBA na N-hydroxylamin)[47,48].



Obr. 9 Předpokládaná cesta metabolické aktivace 3-NBA a 3-ABA[47]

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo rozšířit poznatky o metabolismu aromatické nitrosloučeniny 3-NBA a jeho vlivu na biotransformační enzymy. 3-NBA je silným mutagenem a karcinogenem pro organismy. Práce navazuje na studie, které byly prováděny při vypracování mé bakalářské práce[49]. Konkrétním cílem pak bylo:

- Studium redukce 3-NBA lidskou rekombinantní DT-diaforasou
- Studium metabolismu 3-NBA potkaním mikrosomálním systémem za aerobních a anaerobních podmínek
- Studium vlivu 3-NBA na expresi proteinů cytochromů P450 1A1 a P450 1A2

Diplomová práce byla řešena jako součást grantového projektu GAČR 303/05/2195 a MŠMTČR (MSM0021620808), který je zaměřen na studium mechanismu působení 3-nitrobenzanthronu a jiných karcinogenů na lidský organismus.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 MATERIÁL

Chemikálie a materiál, které byly použity v experimentech, pocházejí z těchto zdrojů:

- **Chemopetrol, Česká republika**
  suchý led

- **Fluka, Švýcarsko**
  Tween 20, akrylamid, Coomasie Brilliant Blue R-250, tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), methanol, 7-ethoxyresorufin,

- **Lachema, Česká republika**
  ethanol, glycerol, methanol, aceton, ethylester kyseliny octové, hydroxid sodný, hydroxid draselný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, síran amonný, chlorid sodný, chlorid draselný, dithioničitan sodný, bromfenolová modř, hydrogenuhličitan sodný, uhličitan sodný dekahydrát, síran měďnatý pentahydrát, dihydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan sodný, pyrofosforečnan sodný dekahydrát, acetát sodný, chlorid hořečnatý, vínan sodnodraselný

- **Linde, Česká republika**
  kapalný dusík, oxid uhelnatý

- **Roche, SRN**
  NADH, NADPH

- **Serva Heidelberg, SRN**
  hypoxanthin, N,N´- methylen-bis-akrylamid, Triton X-100, N,N,N´,N´-tetramethylethylendiamin (TEMED)

- **Sevapharma a.s., Česká republika**
  hovězí sérový albumin (BSA)

- **Sigma, USA**
  kyselina bicinchoninová (BCA), dodecylsulfát sodný, standard pro SDS-elfo („Wide Range standard", Mr 6500 – 205000), 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitrobluetetrazolium (BCIP/NBT), dexfenfluramin, PCN, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, chlorzoxazon, fenacetin, lidská rekombinantní DT-diaforasa, dimethylsulfoxid (DMSO)

- za poskytnutí primárních protilátek proti cytochromům P450 podrodiny 1A, použitých při imunochemické detekci těchto forem cytochromu P450 a primárních protilátek proti reduktase a DT-diaforase velice děkuji doc. RNDr. Petru Hodkovi

- 3-nitrobenzanthron a 3-aminobenzanthron – dar od Doc.Dr. H. H. Schmeisera, Německé centrum pro výzkum rakoviny v Heidelbergu

- jaterní mikrosomy cytosoly potkana– isolovány kolegy v laboratoři (katedra biochemie, PřF UK)

3.2 PŘÍSTROJE

- **Centrifugy:**
  K23, Janetzki, Německo (výkyvný rotor)
  K24, Janetzki, Německo (úhlový rotor)
  T52.2, MLW, Německo (výkyvný rotor)
  Optima LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter, USA (úhlový rotor Ti 45)
  Microcentaur MSE, Sanyo, UK (úhlový rotor)

- **Spektrofotometry:**

  Hewlett Packard E8453, USA

  Spektromom 195 D, MOM, Maďarsko

  Specord M40, Carl-Zeiss Jena, Německo

  Specord M42, Carl-Zeiss Jena, Německo

- **Váhy:**

  PESA 40SM-200A, Švýcarsko (analytické váhy)

  KERN EW600-2M, Německo (předvážky)

- **Systém HPLC:**

  pumpa: Dionex pump P580

  ASI-100 Automated Sample Injector

  UV/VIS Detector UVD 170S/340S, USA

  termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101

  kolona: Macherey-Nagel, Německo - nukleosil 100-5 C18 HD (4 x 250 mm)

  program Chromeleon$_{TM}$ 6.01

- **Další přístroje:**

  pH metr ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou, USA

  magnetická míchačka Variomag, Monotherm, Německo

  homogenizátor dle Pottera a Elvehjema

  sonikátor Teson1, Tesla

  Vortex MS 1 Minishaker, Schiller Pharma

  Vortex Genius 3, IKA

  inkubátor Thermomixer compact, Eppendorf, Německo

  automatické mikropipety: Biohit, Finsko

  Nichiryo Nichipet EX, Japonsko

  vakuová odparka Laborota 4002 digital s manostatem, Heidolph, Německo

  bodotávek Melting Point B-545, Büchi, Švýcarsko

3.3 METODY

3.3.1 PREMEDIKACE LABORATORNÍCH POTKANŮ

V experimentu, jehož cílem bylo zjistit obsah a aktivity enzymů biotransformujících xenobiotika, byli k premedikaci použiti samci laboratorních potkanů kmene Wistar o hmotnosti 100 až 120 gramů. Potkani byli drženi při teplotě 22 ± 2°C. Voda a granulovaná strava jim byly podávány *ad libitum.* Premedikace byla zahájena po zhruba týdenní aklimatizaci potkanů.

Premedikace potkanů 3-nitrobenzanthronem *(Stiborová, M., ústní sdělení)*

3-nitrobenzanthron byl rozpuštěn v rostlinném oleji. Koncentrace 3-NBA byla upravena tak, aby byl potkanům aplikován 1 ml roztoku pro výslednou dávku 3-NBA 0,4 mg/kg, 4 mg/kg a 40 mg/kg hmotnosti zvířete. Roztok 3-NBA byl aplikován intraperitoneálně (**Obr. 10**). Aplikace intraperitoneální cestou byla prováděna ve firmě R.S.D Dobřichovice. Zvířata byla usmrcena 24 hodin po podání roztoku 3-NBA. Játra zvířat byly vyjmuta a použita pro isolaci subcelulárních systémů (mikrosomů a cytosolu).

Obr. 10 Nákres intraperitoneální aplikace

3.3.2 ISOLACE SUBCELULÁRNÍCH SYSTÉMŮ Z ORGÁNŮ LABORATORNÍCH POTKANŮ

Vyjmuté orgány byly zváženy, 2x promyty *pufrem 1* (0.15 M KCl; 0.05 M TRIS; pH 7.4) a nastříhány. Homogenisace byla provedena při 4 °C v *pufru 1*, jehož objem v mililitrech číselně odpovídal trojnásobku váhy orgánů v gramech. Získaný homogenát byl filtrován přes gázu a centrifugován 10 minut při 2000 RPM ve

výkyvném rotoru 4 x 70 ml za chlazení na 4 °C. Supernatant byl uschován a sediment rehomogenizován v *pufru 1* (o objemu odpovídajícímu hmotnosti orgánů) a centrifugován za stejných podmínek. Oba supernatanty byly spojeny a centrifugovány po dobu 20 minut při 13 500 RPM v úhlovém rotoru 6 x 35 ml za chlazení na 4 °C. Supernatant byl slit a centrifugován při 30 000 RPM 90 minut v úhlovém rotoru 6 x 64 ml při 4 °C. Cytosolární supernatant byl odlit a zmražen, sediment byl resuspendován v *pufru 2* (0.1 M $Na_2P_2O_7.10H_2O$; pH 7.2) v množství dvojnásobném oproti původní hmotnosti orgánů a centrifugován 65 min za posledně uvedených podmínek.
Mikrosomální sediment byl resuspendován v *pufru 3* (0.15 M KCl; 0.05 M TRIS; 20 % glycerin) v objemu odpovídajícímu 1/5 původní hmotnosti orgánů a rehomogenizován pomocí malého homogenizátoru. Výsledný mikrosomální preparát byl zmražen v kapalném dusíku a uložen do mrazícího boxu při -80 °C.

3.3.3 STANOVENÍ KONCENTRACE CYTOCHROMU P450[17]

Princip: Cytochrom P450 vykazuje v redukovaném stavu v komplexu s CO absorpční maximum při vlnové délce 450 nm[17]. Na základě této vlastnosti se stanovuje koncentrace cytochromu P450 metodou diferenční spektroskopie.
Postup: Do zkumavky bylo pipetováno podle odhadnutého ředění měřeného vzorku n ml (0,05 – 1,0 ml vzorku) a doplněno pufrem do 2 ml. Dále bylo přidáno 5 mg dithioničitanu sodného, čímž proběhla redukce cytochromu P450. Po promíchání byl roztok rozdělen do dvou kyvet s optickou drahou 1 cm. První kyveta sloužila jako srovnávací, roztok v druhé kyvetě byl sycen proudem CO (g) po dobu 60 sekund. Následně bylo na dvoupaprskovém spektrofotometru Specord M-40 měřeno diferenční spektrum v rozsahu vlnových délek 400 – 510 nm. Koncentrace cytochromu P450 byla vypočtena ze získaných absorbancí podle vzorce:

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

c_{P450}.....koncentrace cytochromu P450

A_{450}.....absorbance při vlnové délce 450 nm

A_{490}.....absorbance při vlnové délce 490 nm

ε_{P450}.....molární absorpční koeficient cytochromu P450 ($\varepsilon = 0{,}091$ mmol^{-1} · dm^3 · cm^{-1})

3.3.4 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINU [50]

Princip: Bílkoviny přítomné ve vzorku se rozpustí v alkalickém roztoku deoxycholátu sodného a následně reagují po přidání Folinova činidla (roztok fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny) za vzniku modré rozpustné sloučeniny.

Postup: 100 µl vzorku bylo ředěno do 0,5 ml destilovanou vodou, pak bylo přidáno 0,15 ml 2 % deoxycholátu sodného (w/v) a 0,15 ml 2 M NaOH. Vše bylo promícháno a ponecháno 10 minut stát. K roztoku byly přidány 3 ml čerstvě připraveného alkalického činidla [0,5 ml 1 % roztoku $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ (w/v) + 0,5 ml 2 % roztoku vínanu draselnosodného (w/v) + 49 ml 2 % roztoku Na_2CO_3 (w/v)], znovu bylo vše promícháno a ponecháno 10 minut stát. Následně bylo k roztoku přidáno 0,3 ml Folinova činidla (těsně před použitím bylo ředěno v poměru 1:1 destilovanou vodou), roztok byl promíchán a nechán stát 30 minut. Po uplynutí této doby byla ihned měřena absorbance vzorku při 550 nm oproti „slepému" vzorku obsahujícímu destilovanou vodu namísto měřeného vzorku. Jako standard byl připraven roztok BSA o koncentraci 0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 a 0,0125 mg/ml.

Ze získané kalibrační křivky byly určeny hodnoty koncentrace proteinu ve vzorcích podle vztahu:

$$\mathbf{c_b = A_{550}\ (vzorek)/A_{550}\ (standard)\ c_{BSA} \cdot ředění\ [mg/ml]}$$

c_b – koncentrace bílkoviny

A_{550} – absorbance při vlnové délce 550 nm

c_{BSA} – koncentrace standardu

3.3.5 STUDIUM METABOLISMU 3-NBA LIDSKOU REKOMBINANTNÍ DT-DIAFORASOU

Složení inkubační směsi:

- pufr 50 mM TRIS/HCl + 0,4 % Tween 20, pH 7,4
- 1 mM NADPH
- roztok DT-diaforasy v pufru (od 5 μg/ml do 100 μg/ml)
- roztok 3-NBA v DMSO (od 5 μM do 50 μM)

Inkubační směs o objemu 0,5 ml obsahovala: pufr (50 mM TRIS/HCl + 0,4 % Tween 20, pH 7,4), 50 μl 10 mM NADPH a různé množství zásobního roztoku DT-diaforasy (0,25 mg/ml). Nad směsí byla vytvořena inertní atmosféra pomocí dusíku (g). Po 15 minutách inkubace směsi při 37°C byla reakce startována přidáním 5 μl 2 mM 3-NBA a směs inkubována po dobu 60 minut (Thermomixer compact eppendorf, 400 RPM, 37°C).

Reakce byla ukončena přidáním 1 ml ethylacetátu a produkty reakce extrahovány do tohoto organického rozpouštědla. Dále bylo k směsi přidáno 5 μl 1 mM fenacetinu jako vnitřního standardu a opakována extrakce produktů spolu s interním standardem do ethylacetátu. Směs byla centrifugována 3 minuty při 13 000 RPM (minicentrifuga MicroCentaur MSE, úhlový rotor). Po oddělení organické fáze s produkty reakce byl k vodné fázi přidán opět 1 ml ethylacetátu a provedena další extrakce stejným postupem.

Spojené extrakty byly odpařeny. Těsně před analýzou byly odparky rozpuštěny ve 30 μl methanolu. Metabolity byly separovány pomocí HPLC (aplikováno 20 μl). Při zjišťování závislosti přeměny 3-NBA na koncentraci DT-diaforasy obsahovala inkubační směs 5, 10, 20, 30, 40 a 100 μg/ml DT-diaforasy. V případě zjišťování vlivu doby inkubace na metabolismus 3-NBA byla inkubační směs inkubována 15, 30 a 60 minut. Pro zjištění vlivu koncentrace 3-NBA na jeho metabolickou přeměnu pomocí DT-diaforasy o koncentraci 40 μg/ml byla použita koncentrace 3-NBA v inkubační směsi 5, 10, 20 a 50 μM.

3.3.5.1 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

K separaci látek obsažených v jednotlivých inkubačních vzorcích byla použita metoda RP-HPLC na koloně C_{18} (Macherey-Nagel, SRN) při teplotě 35°C. Jako mobilní fáze byl použit 70 % methanol. Rychlost průtoku mobilní fáze při měření byla 0,6 ml/min a jednotlivé složky inkubačních směsí byly detekovány při vlnové délce 254 nm. Vzorky byly aplikovány v množství 20 µl.

3.3.6 STUDIUM METABOLISMU 3-NBA MIKROSOMY JATER POTKANŮ PREMEDIKOVANÝCH FENOBARBITALEM, β-NAFTOFLAVONEM A NEPREMEDIKOVANÝCH ZVÍŘAT

Složení inkubační směsi:

- pufr - 50 mM TRIS/HCl, pH 7,4
- 1 mM NADPH
- mikrosomy (0,5 mg proteinu/ml)
- 20 µM 3-NBA v DMSO

Inkubační směs o objemu 0,5 ml obsahovala: pufr (50 mM TRIS/HCl, pH 7,4), 50 µl 10 mM NADPH a mikrosomy v takovém množství, aby inkubační směs obsahovala 0,5 mg proteinu/ml. Reakce byla startována přidáním 5 µl 2 mM 3-NBA a směs inkubována (Thermomixer compact eppendorf, 400 RPM, 37°C). Další postup byl stejný jako při studiu metabolismu 3-NBA NQO1. Pro zjištění vlivu doby inkubace na metabolismus 3-NBA jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem, β-NF a nepremedikovaných zvířat byla inkubační směs inkubována po dobu 60, 120 a 180 minut.

Ke studiu metabolismu 3-NBA mikrosomy jater potkanů premedikovaných fenobarbitalem, β-naftoflavonem a nepremedikovaných zvířat za anaerobních podmínek byla nad inkubační směsí vytvořena inertní atmosféra N (g) a při RP-HPLC

byly užity stejné podmínky jako při studiu metabolismu 3-NBA lidskou rekombinantní DT-diaforasou .

3.3.7 STUDIUM VAZBY 3-NBA AKTIVOVANÉHO JATERNÍM MIKROSOMÁLNÍM SYSTÉMEM NA PROTEINY

Ke studiu vazby 3-NBA aktivovaného lidskou DT-diaforasou na proteiny byly použity vodné fáze jednotlivých inkubací, které jsme získali po oddělení organické fáze. K inkubačním směsím byly po extrakci ethylacetátem přidány 4 ml acetonu, roztok byl promíchán a centrifugován (centrifuga MLW 52.2 T, 8 000 RPM, 10 minut). Aceton byl odebrán. Peleta byla dvakrát promyta 1 ml acetonu, roztok byl promíchán a centrifugován za stejných podmínek (viz výše). Aceton byl opět odebrán a peleta promyta 2 ml 100 % ethanolu. Směs byla promíchána a opět centrifugována za stejných podmínek. Etanol byl odebrán a k peletě přidány 2 ml 70 % ethanolu. Roztok byl zamíchán a centrifugován za výše uvedených podmínek. Ethanol byl odebrán a peleta dosušena v digestoři. Peleta byla rozpuštěna v 1 ml 1 M NaOH. Zkumavky s roztokem byly opatrně zahřáty na vodní lázni až do rozpuštění pelet.

Po vychladnutí roztoku byla proměřena absorpční spektra na spektrofotometru Hewlett Packard E8453. Jako blank byl použit 1 mM roztok NaOH. Ve vzorcích byl stanoven obsah proteinu Lowryho metodou[50].

3.3.8 STANOVENÍ OBSAHU VYBRANÝCH ISOFOREM CYTOCHROMU P450

Stanovení specifické aktivity jednotlivých isoforem cytochromu P450 neposkytuje zcela přesnou informaci o obsahu jednotlivých isoforem, neboť enzymy mohou být poškozeny (např. během izolačních postupů), a ztrácí tedy svou katalytickou schopnost. Obsah vybraných isoforem byl tedy stanovován metodou „Western blot“ za použití specifických protilátek proti jednotlivým isoformám.

Po rozdělení dle molekulové hmotnosti pomocí elektroforesy v přítomnosti

dodecylsulfátu sodného byly proteiny obsažené v mikrosomální frakci přeneseny z polyakrylamidového gelu na přenosovou membránu z polyvinylidenfluoridu (PVDF) nebo nitrocelulosovou membránu. Poté byla provedena imunochemická detekce jednotlivých forem cytochromu P450.

3.3.8.1. ELEKTROFORESA NA POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU V PŘÍTOMNOSTI SDS

Provedení elektroforesy na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti 0,1% dodecylsulfátu sodného (SDS) vycházelo z postupu Laemmliho. Elektroforesa byla provedena za stálého chlazení vodovodní vodou v aparatuře od firmy OMNI-BIO (Česká republika).

Složení roztoků a pufrů:

Pufr A (separační gel):	0,375 M Tris-Cl, 0,1% (m/v) SDS, pH 8,8
Polymerační roztok A:	30% akrylamid, 0,8% N,N'-methylen-bis-akrylamid (BIS) v pufru A
Pufr B (zaostřovací gel):	0,125 M Tris-Cl, 0,1% (m/v) SDS, 0,0006% bromfenolová modř, pH 6,8
Polymerační roztok B:	30% akrylamid, 0,8% N,N'-methylen-bis-akrylamid (BIS) v pufru B
Vzorkový pufr redukující:	0,063 M Tris-Cl, 2% (m/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 0,003% (m/v) bromfenolová modř, 5% (v/v) merkapto-ethanol, pH 6,8
Elektrodový pufr:	0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1% (m/v) SDS, pH 8,3
Barvící lázeň: 0,25% (m/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250, 46% (v/v) ethanol, 9,2% (v/v) kyselina octová
Odbarvovací lázeň:	směs ethanol-kyselina octová-voda (25:10:65)

Příprava gelů:

Mezi odmaštěná skla uchycená v zařízení pro přípravu gelů byl nalit v případě použití gelu pro metodu „Western blot" 10%-ní separační gel (4 ml polymeračního roztoku A, 8 ml pufru A, 10 µl TEMED a 3-6 mg persíranu amonného), v případě použití gelu pro vizualizaci barevných stop 7,5%-ní separační gel (3 ml polymeračního roztoku A, 9 ml pufru A, 10 µl TEMED a 3-6 mg persíranu amonného). Gel byl převrstven destilovanou vodou. Po polymeraci gelu byla odsáta voda a nalit 3%-ní zaostřovací gel (směs 0,5 ml polymeračního roztoku B, 4,5 ml pufru B, 5 µl TEMED a 3-6 mg persíranu amonného). Do tohoto roztoku byl vložen hřeben, tvořící 12 komůrek. Po zpolymerování gelu byl hřeben vyjmut a skla s gelem umístěna do aparatury pro elektroforézu. Vzniklý gel měl rozměry 5 x 8 cm a byl silný 1,5 mm. Jamky byly naplněny elektrodovým pufrem a vzorky v nich byly umístěny podvrstvením.

Příprava vzorků na elektroforesu:

Vzorky byly ředěny v poměru 1:1, nebo 1:3 ve 2krát, resp. 4krát koncentrovaném vzorkovém pufru tak, aby v aplikovaných 20 µl vzorku bylo 10-20 µg proteinu. Poté byly vzorky 5 minut povařeny. Vzorky byly aplikovány do jamek mikrostříkačkou Hamilton (Hamilton Company, USA).

Vlastní elektroforesa:

Elektroforéza probíhala za konstantního napětí 100 V po dobu asi 2 hodin. Byla zastavena, jakmile vzdálenost mezi barevným čelem a hranou gelu byla menší než 0,5 cm. Gel byl použit pro metodu Western blot nebo byla provedena vizualizace barevných stop použitím barvicí lázně s Coomassie Brilliant Blue R-250, ve které se gely barvily za stálého míchání 30 minut. Pozadí bylo odbarveno v odbarvovací lázni přes noc. Poté byly gely vysušeny mezi dvěma listy celofánové fólie při laboratorní teplotě.

Vyhodnocení elektroforesy:

Jako standardů bylo využito 13 proteinů se známými molekulovými hmotnostmi, tzv. Wide Range: myosin 205 kDa, β-galaktosidasa 116 kDa, fosforylasa b 97 kDa, fruktosa-6-fosfátkinasa 84 kDa, albumin 66 kDa, glutamindehydrogenasa 55 kDa, ovalbumin 45 kDa, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa 36 kDa,

karbonátanhydrasa 29 kDa, trypsinogen 24 kDa, inhibitor trypsinu 20 kDa, α-laktalbumin 14,2 kDa a aprotinin 6,5 kDa. Závislost logaritmu molekulové hmotnosti standardních proteinů na jejich relativní mobilitě (tj. poměr vzdálenosti stopy daného proteinu od startu a délky celého gelu) sloužila jako kalibrační křivka, podle které byla určena molekulová hmotnost neznámého proteinu.

3.3.8.2 METODA „WESTERN BLOT"

„Western blot" je metoda přenosu proteinů z elektroforetického gelu na nitrocelulosovou nebo PVDF membránu (Milipore) schopnou sorbovat proteiny.

Složení roztoků a pufrů: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, pH 8,3 - přenosový pufr; 0,5% Red Ponceau v 1% kyselině octové (v/v)

Postup: PVDF membrána byla nejdříve smočena 10 sekund v methanolu a následně 2 minuty v destilované vodě a 5 minut v transferovém pufru.

Gel byl po skončení SDS elektroforesy 20 minut inkubován v přenosovém pufru (0,025 M Tris, 0,192 M glycin, pH 8,3). Dále byl sestaven elektropřenosový aparát „semi dry" („Fast-blot" B-32, firma Biometra) a „sandwich", který tvořily tři kusy chromatografického papíru Whatman 3 (o stejné velikosti jakou měl gel) namočené v přenosovém pufru, membrána, gel a další tři kusy navlhčeného chromatografického papíru. Elektropřenos se prováděl nejprve 10 minut při 0,8 mA/cm^2 gelu, poté 45 minut při 2,0 mA/cm^2 gelu.

Po skončení transferu byly proteiny přenesené na membránu vizualizovány obarvením v roztoku 0,5 % Ponceau Red (w/v) v 1 %-ní kyselině octové. K odbarvení membrány došlo v destilované vodě.

3.3.8.3. IMUNOCHEMICKÁ DETEKCE FOREM CYTOCHROMU P450

Složení roztoků a pufrů:

- PBS (1,8 mM Na_2HPO_4 + 1 mM NaH_2PO_4 + 0,134 M NaCl; pH 7,2) s 0,3% Tritonem X-100 (w/v)
- 5% nízkotučné sušené mléko (w/v) – rozpuštěné v PBS s Tritonem X-100
- primární protilátka (15 μg/ml) - polyklonální slepičí protilátka proti potkaním rekombinantnímu CYP1A1

- sekundární protilátka značená alkalickou fosfatasou (7 μg/10 ml) – králičí IgG proti slepičí IgY s navázanou alkalickou fosfatasou

Postup: PVDF membrána, na níž byly přeneseny proteiny metodou „Western blot", se nechala přes noc v blokovacím roztoku (5 % sušené mléko v PBS s Tritonem X-100). Membrána byla inkubována dvě hodiny v roztoku specifické primární protilátky v blokovacím roztoku, v koncentraci 10 mg/ml.

Poté byla membrána promývána blokovacím roztokem (5krát 2 minuty) a následně vložena do roztoku sekundární protilátky (5 μl v 10 ml blokovacího roztoku), kde byla ponechána jednu hodinu. Po inkubaci se membrána promývala (4krát 2 minuty) v blokovacím roztoku, poté (4krát 2 minuty) v PBS s Tritonem. Inkubace i promývání byly prováděny za stálého míchání při laboratorní teplotě.

K vyvolání se použil roztok připravený rozpuštěním jedné tablety (BCIP/NBT - substrát pro alkalickou fosfatasu) v 10 ml destilované vody. Na membráně inkubované v roztoku specifické protilátky vznikly přibližně po pěti minutách vyvolávání fialové zóny v místech, kde došlo k navázání protilátky na enzymy. Reakce byla zastavena vložením membrány do destilované vody. Intenzita zón ilustrující množství enzymů byla kvantifikována programem Elfoman.

3.3.8.4 STANOVENÍ AKTIVITY CYP1A1/2 *O*-DEALKYLACÍ 7-ETHOXYRESORUFINU

Určení aktivity těchto isoforem se provádělo fluorimetrickým stanovením *O*-dealkylace 7-ethoxyresorufinu (EROD). Reakční směs o celkovém objemu 0,5 ml byla zpracována podle Burkeho a kol. a obsahovala mikrosomální frakci (0,1 μM CYP), NADPH generující systém (10 mM), 7-ethoxyresorufin (0,175 mM) a fosfátový pufr (0,1 M K_2HPO_4, pH 7,4). Jedno objemové procento reakční směsi tvořil methanol, ve kterém byl rozpouštěn 7-ethoxyresorufin. Pro sestrojení kalibrační křivky se použilo stejné složení reakční směsi, ale místo 7-ethoxyresorufinu bylo pipetováno 20, 40, 80 a 120 pmol 10 μM resorufinu. K mikrosomům zředěným pufrem bylo přidáno 5 μl roztoku 7-ethoxyresorufinu v methanolu. Reakce byla startována přidáním 50 μl

NADPH generujícího systému, inkubace probíhala 10 minut při 37 °C a reakce byla zastavena přidáním 2 ml methanolu. Vzorky byly centrifugovány 5 min při 4000 RPM (centrifuga T 52.2) a poté se změřila fluorescence na luminiscenčním spektrometru LS-5B Perkins-Elmer ($\lambda_{excitace}$=530 nm, excitační štěrbina 15, λ_{emise}=585 nm, emisní štěrbina 10). Přístroj byl vynulován na „blank", který obsahoval všechny složky reakční směsi kromě NADPH. Z kalibrační křivky se vypočítalo množství resorufinu (pmol) vytvořeného ve vzorcích.

3.3.8.5 STANOVENÍ AKTIVITY CYP1A1 OXIDACÍ SUDANU I

Složení inkubační směsi - roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr (NaH_2PO_4, pH 7,4)
- 10 mM NADPH generující systém
- ethylacetát
- 5 mM Sudan I rozpuštěný v methanolu

Postup: Reakce probíhala v celkovém objemu reakční směsi 0,25 ml. Do zkumavky byl pipetován pufr, různé množství ředěných mikrosomů, aby koncentrace proteinu ve směsi byla 1 mg/ml, 25 µl NADPH generujícího systému a 5 µl roztoku Sudanu I. Tato směs byla důkladně promíchána a inkubována za přístupu vzduchu 60 min při teplotě 37°C. Inkubace se ukončila zastavila přidáním ethylacetátu (0,5 ml). Po protřepání a centrifugaci (5 minut, 4000 RPM centrifuga T 52.2) byla odsáta vrstva s ethylacetátem a použita dále. K vodné fázi bylo opět přidáno 0,5 ml ethylacetátu a celý postup zopakován. Následovalo odpaření extraktů do sucha na vakuové odparce „Speed Vac" (DNA 110, firma Savant). Těsně před analysou byly odparky rozpuštěny v 30 µl mobilní fáze HPLC (90% methanol; 0,1 M NH_4HCO_3; pH 8,0).

4 VÝSLEDKY

4.1 METABOLISMUS 3-NBA LIDSKOU REKOMBINANTNÍ DT-DIAFORASOU

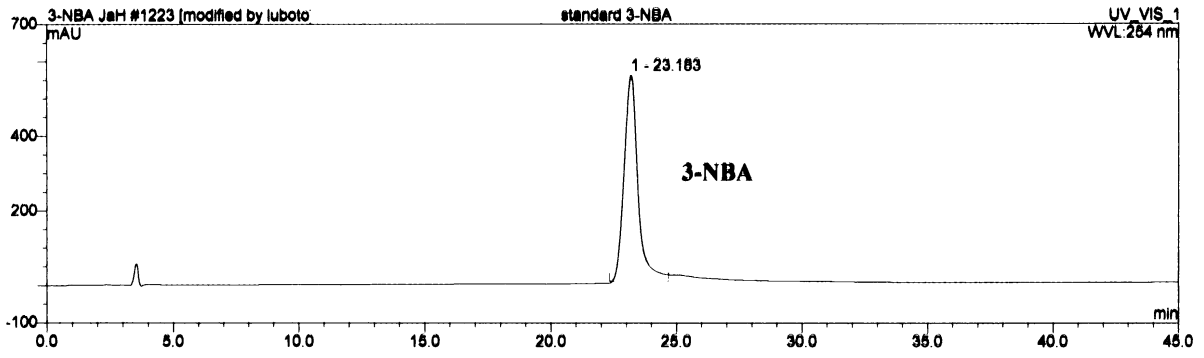
V experimentech byla použita lidská rekombinantní DT-diaforasa (NQO1). Zjistili jsme, že 3-NBA je DT-diaforasou přeměňován za tvorby metabolitu 3-aminobenzanthronu, který je tvořen redukcí nitroskupiny 3-NBA. 3-ABA byl od 3-NBA separován pomocí HPLC a detekován při vlnové délce 254 nm.

4.1.1 HPLC 3-NBA A 3-ABA

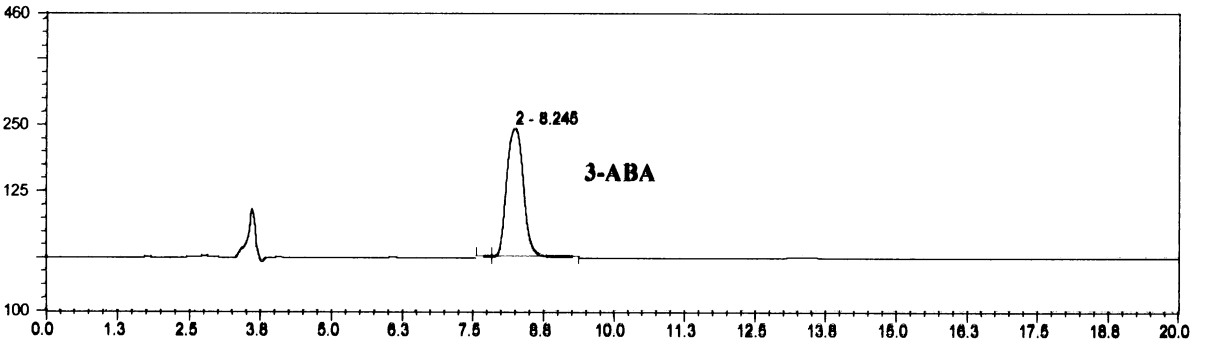
Pro zjištění optimálních podmínek separace 3-NBA od jeho redukčního partnera, 3-ABA, bylo nejdříve jejich chování při HPLC analyzováno separátně. K těmto experimentům byly jako standardy použity 3-NBA a 3-ABA syntetisované na partnerském pracovišti Německého centra výzkumu rakoviny (Heidelberg).

Vzorky byly připraveny tak, že k 25 µl methanolu bylo přidáno 5 µl 2 mM 3-NBA (resp. 5 µl 1 mM 3-ABA). Takto připravené roztoky byly promíchány na Vortexu a centrifugovány 3 minuty při 13 000 RPM (centrifuga Microcentaur MSE, úhlový rotor).

3-NBA je pomocí HPLC eluován v retenčním čase 23,2 minut **(Obr. 11)**. 3-ABA je eluován při HPLC za stejných podmínek uvedených v kapitole v 8. minutě. HPLC probíhala za stejných podmínek jako v případě 3-NBA. Výsledek analysy HPLC je uveden na **Obr. 12.**



Obr. 11 HPLC 3-NBA. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 70 % metanol, průtok 0,6 ml/min, kolona Macherey Nagel RP18, teplota 35°C, aplikováno 20 µl vzorku, detekce při 254 nm.



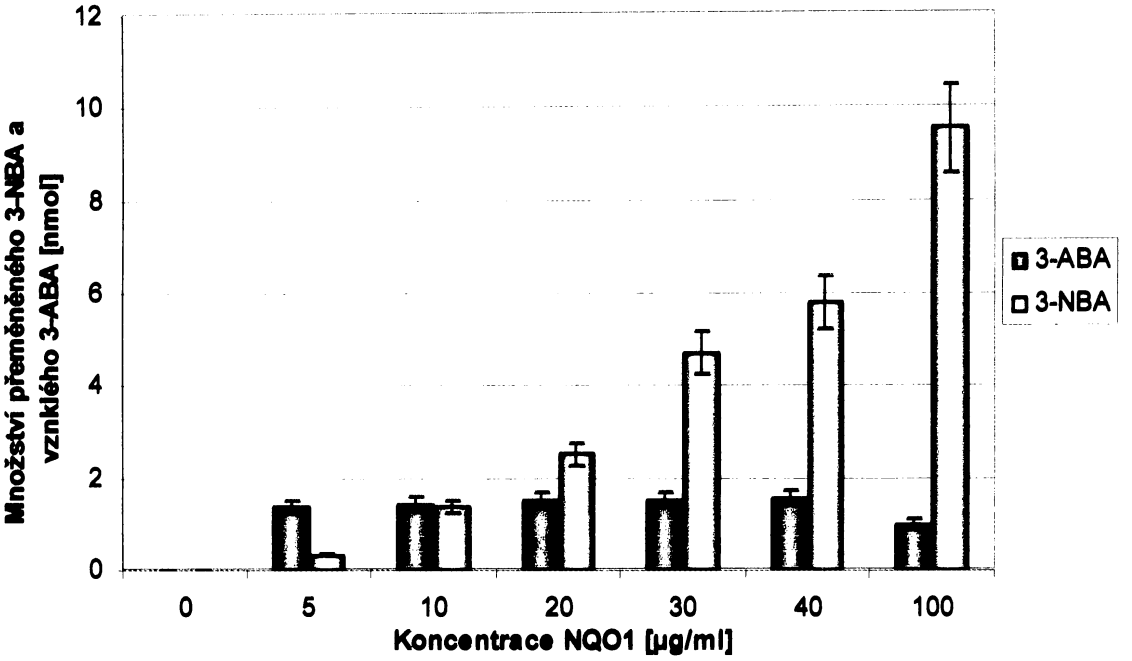
Obr. 12 HPLC 3-ABA. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 70 % metanol, průtok 0,6 ml/min, kolona Macherey Nagel RP18, teplota 35°C, aplikováno 20 µl vzorku, detekce při 254 nm.

4.1.2 ZÁVISLOST PŘEMĚNY 3-NBA NA KONCENTRACI DT-DIAFORASY

Aby byla zjištěna závislost účinnosti přeměny 3-NBA DT-diaforasou na koncentraci enzymu, byly v inkubační směsi použity 5, 10, 20, 30, 40 a 100 µg/ml lidské rekombinantní DT-diaforasy. Výsledky analýz pomocí HPLC jsou uvedeny na **Obr. 13** .

Se zvyšující se koncentrací DT-diaforasy v inkubační směsi dochází ke zvýšení přeměny 3-NBA a současně ke zvyšování tvorby redukčního metabolitu (3-ABA). Až

při nejvyšší koncentraci DT-diaforasy klesla koncentrace vzniklého 3-ABA o třetinu. Pro další studie byla používána koncentrace DT-diaforasy 40 μg/ml.

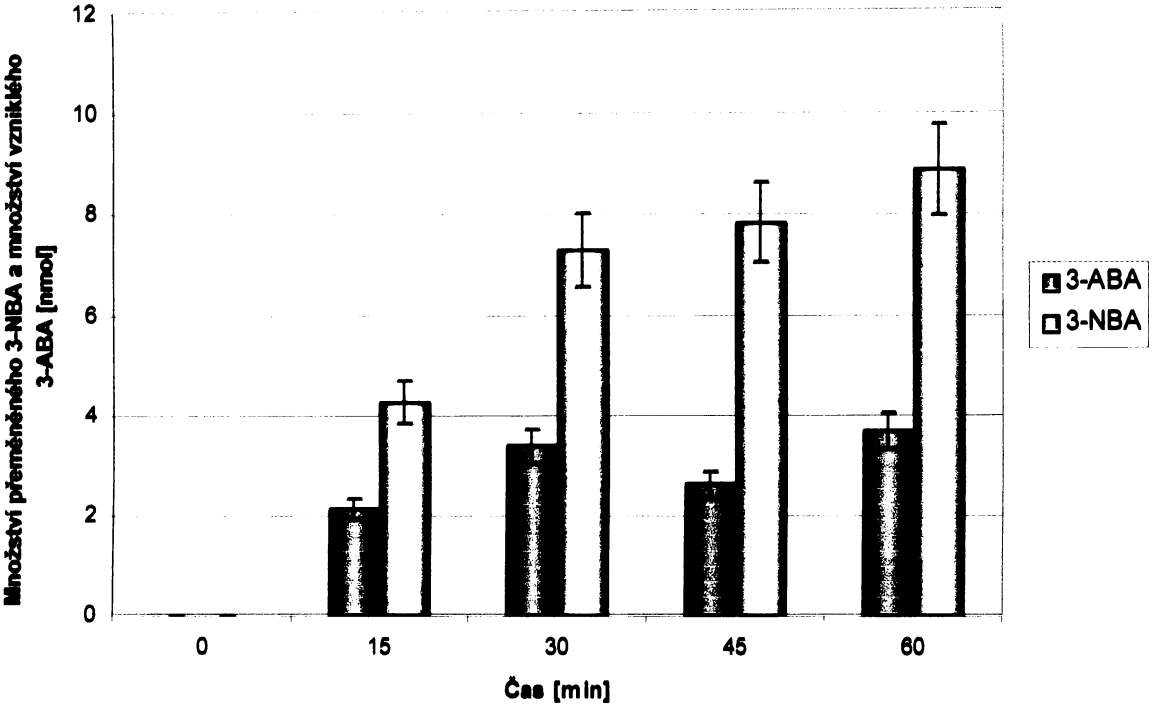


Obr. 13 Závislost přeměny 3-NBA a vzniku 3-ABA na koncentraci NQO1. Sloupce uvedené v obrázku udávají množství přeměněného 3-NBA a vzniklého 3-ABA za 60 minut. Data uvedená v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních experimentů.

4.1.3 ZÁVISLOST PŘEMĚNY 3-NBA NA DOBĚ INKUBACE S DT-DIAFORASOU

Pro zjištění vlivu doby inkubace na přeměnu 3-NBA DT-diaforasou byla reakční směs inkubována po dobu 15, 30, 45 a 60 minut. Výsledky analýz pomocí HPLC jsou uvedeny na **Obr. 14**.

Se zvyšující se dobou inkubace 3-NBA s NQO1 dochází ke zvýšení přeměny 3-NBA a k nárůstu množství vzniklého 3-ABA. Množství přeměněného 3-NBA v čase koreluje s přírůstkem jeho redukčního metabolitu 3-ABA.

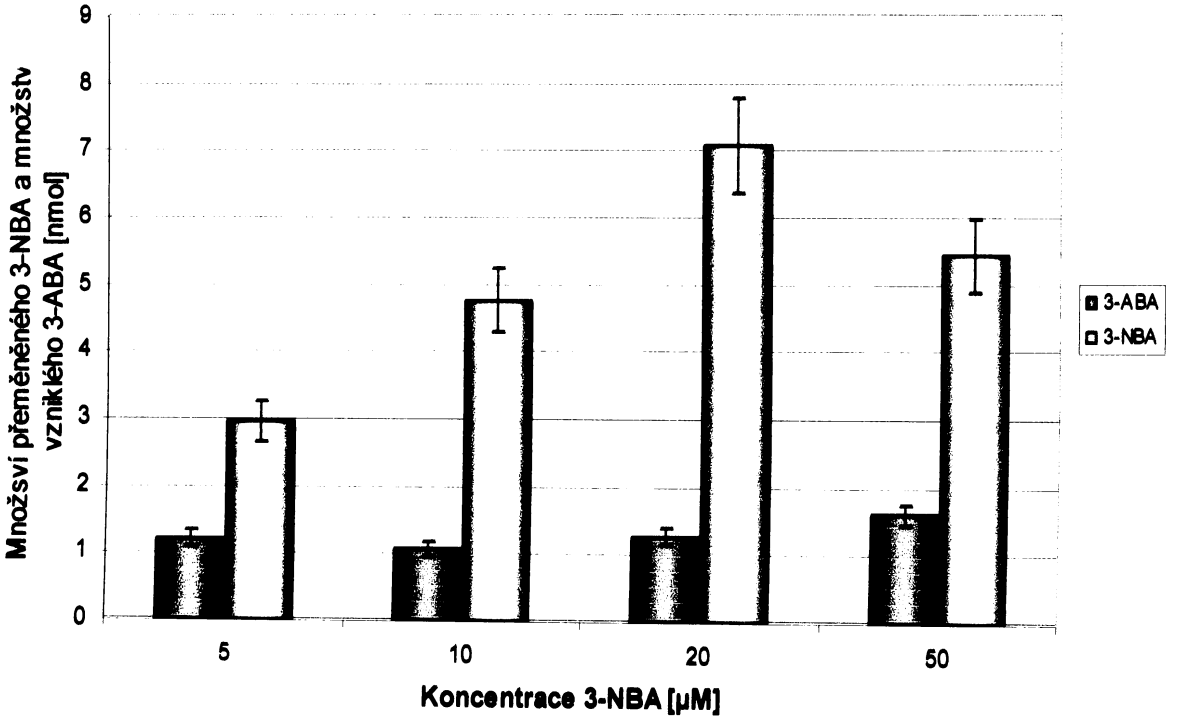


Obr. 14 Závislost přeměny 3-NBA a vzniku 3-ABA na době inkubace s NQO1. Sloupce uvedené v obrázku udávají množství přeměněného 3-NBA a vzniklého 3-ABA. Data uvedená v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních experimentů.

4.1.4 ZÁVISLOST PŘEMĚNY 3-NBA DT-DIAFORASOU NA KONCENTRACI 3-NBA

Pro zjištění vlivu koncentrace 3-NBA na jeho metabolickou přeměnu DT-diaforasou byl do inkubačních směsí přidán 3-NBA o koncentracích 0, 5, 10, 20 a 50 μM. Výsledky analýz pomocí HPLC jsou uvedeny na **Obr. 15**.

Se zvyšující se koncentrací 3-NBA v inkubační směsi dochází ke zvyšování jeho přeměněného množství až do koncentrace 20 μM pak se množství přeměněného 3-NBA snižuje . Nárůst množství vznikajícího metabolitu, 3-ABA, byl pozorován až do koncentrace 50 μM. Redukce 3-NBA lidskou NQO1 vykazuje saturační kinetiku.



Obr. 15 Závislost přeměny 3-NBA a vzniku 3-ABA lidskou DT-diaforasou na jkoncentraci 3-NBA. Sloupce uvedené v obrázku udávají množství vzniklého 3-ABA za 60 minut. Data uvedená v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních experimentů.

4.2 METABOLISMUS 3-NBA JATERNÍMI MIKROSOMY POTKANA

V další části diplomové práce bylo sledováno, zda je 3-NBA metabolisován enzymy přítomnými v jaterních mikrosomech potkana, a to za aerobních a anaerobních podmínek. Anaerobní prostředí bylo vyvoláno probubláváním reakční směsi vzdušným proudem N_2 (1 min).

4.2.1 ZÁVISLOST PŘEMĚNY 3-NBA NA DOBĚ INKUBACE S MIKROSOMY JATER POTKANŮ PREMEDIKOVANÝCH FENOBARBITALEM, β-NAFTOFLAVONEM A POTKANŮ NEPREMEDIKOVANÝCH

Pro zjištění vlivu doby inkubace na přeměnu 3-NBA jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem, β-naftoflavonem a nepremedikovaných (kontrolních) zvířat byla inkubační směs inkubována po dobu 30, 60, 120 a 180 minut. Výsledky analýz za aerobních podmínek pomocí HPLC jsou uvedeny na **Obr. 16** a **Obr. 17** , za anaerobních podmínek na **Obr.18** a **Obr. 19**.

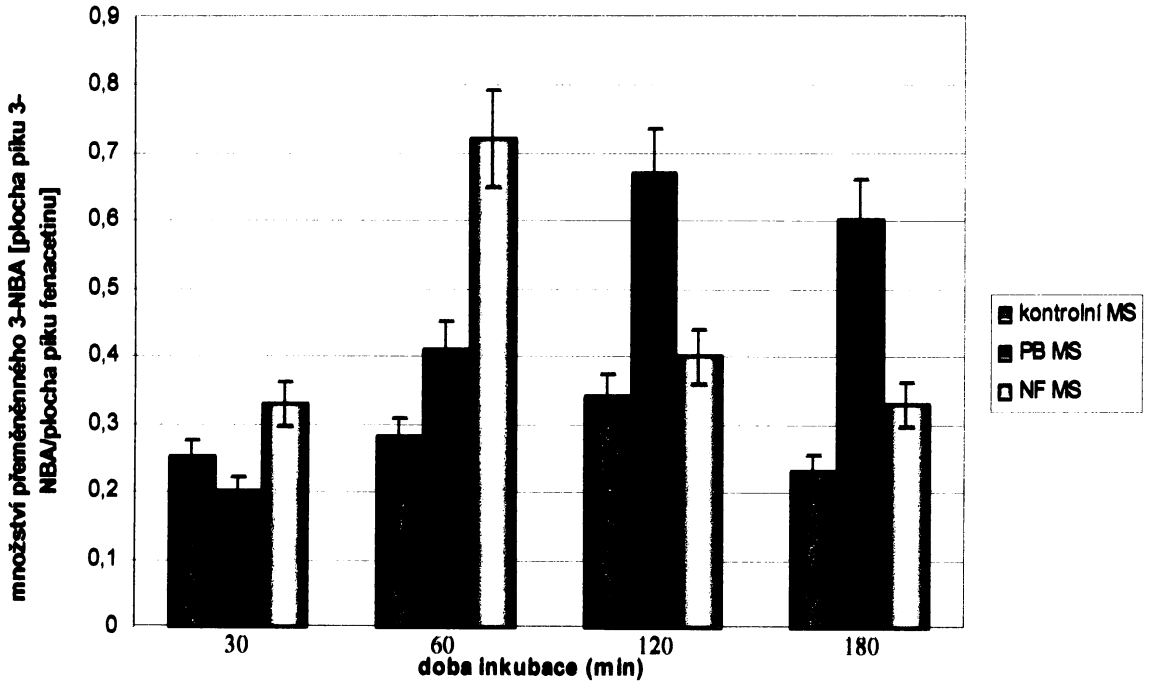
4.2.1.1 Studium metabolismu 3-NBA jaterními mikrosomy za aerobních podmínek

Všechny typy mikrosomů redukují 3-NBA na 3-ABA. Mikrosomy zvířat premedikovaných β-naftoflavonem dosahují v přeměně 3-NBA nejvyšší hodnotu. Množství přeměněného 3-NBA je nejvyšší při 60-minutové inkubaci, při 120-minutové inkubaci dochází poklesu přeměněného 3-NBA a při inkubaci 180 minut je množství přeměněného 3-NBA více než o polovinu nižší. Mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem vykazují menší účinnost v přeměně 3-NBA než mikrosomy isolované ze zvířat premedikovaných β-naftoflavonem. K nejvyšší přeměně 3-NBA zde dochází při inkubaci trvající 120 minut. Postupné zvyšování množství přeměněného 3-NBA od inkubace trvající 30 minut do inkubace trvající 120 minut vykazuje lineární závislost a ve 180minutové inkubaci dochází poklesu přeměněného množství 3-NBA o desetinu. Nejmenší efektivitu v přeměně 3-NBA mají mikrosomy nepremedikovaných (kontrolních) zvířat. Zde efektivita jaterních mikrosomálních enzymů s narůstající dobou inkubace mírně narůstá a při 180minutové inkubaci dochází k poklesu účinnosti těchto enzymů.

Naopak nárůst tvorby 3-ABA byl pozorován v případě mikrosomů nepremedikovaných (kontrolních) zvířat. Množství vzniklého 3-ABA narůstá až do doby inkubace 180 minut. Mikrosomy jater potkanů premedikovaných fenobarbitalem

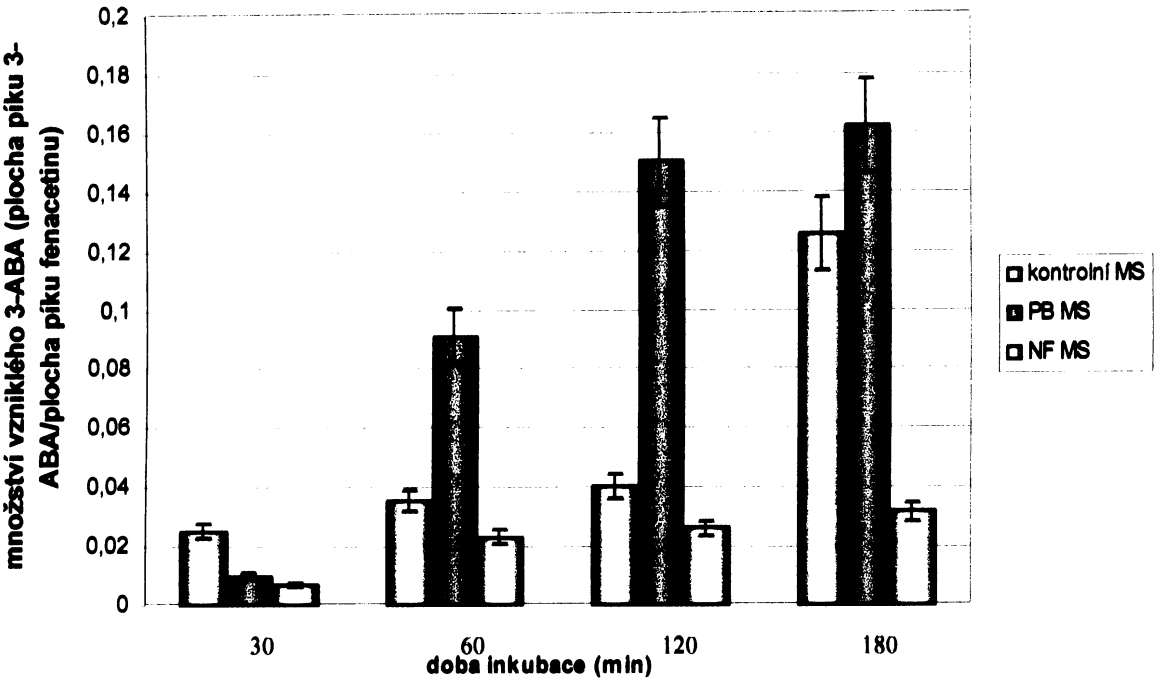
jsou v tvorbě 3-ABA nejefektivnější a v inkubaci trvající 180 min jsou účinnější než mikrosomy zvířat premedikovaných β-NF o čtvrtinu ..U „β-NF mikrosomů" je množství vzniklého 3-ABA téměř shodné při inkubaci 60 i 120 minut. Při inkubaci trvající 180 minut je množství vzniklého 3-ABA přibližně o pětinu vyšší.

Diskrepance mezi přeměnou 3-NBA a tvorbou 3-ABA jednotlivými mikrosomálními systémy lze za současných znalostí obtížně vysvětlit. Zda se jedná o komplexní redox systém přeměňující 3-NBA a 3-ABA navzájem, bude v naší laboratoři předmětem dalšího studia.



Obr. 16 Závislost přeměny 3-NBA na době inkubace s jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem (PB MS), β-naftoflavonem (NF MS) a potkanů nepremedikovaných (kontrolní MS). Sloupce uvedené v obrázku udávají množství přeměněného 3-NBA. Data uvedená v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních experimentů.

V průběhu metabolismu 3-NBA jaterními mikrosomy za oxidačních podmínek nevzniká žádný oxidační metabolit, dochází pouze k redukci 3-NBA na 3-ABA



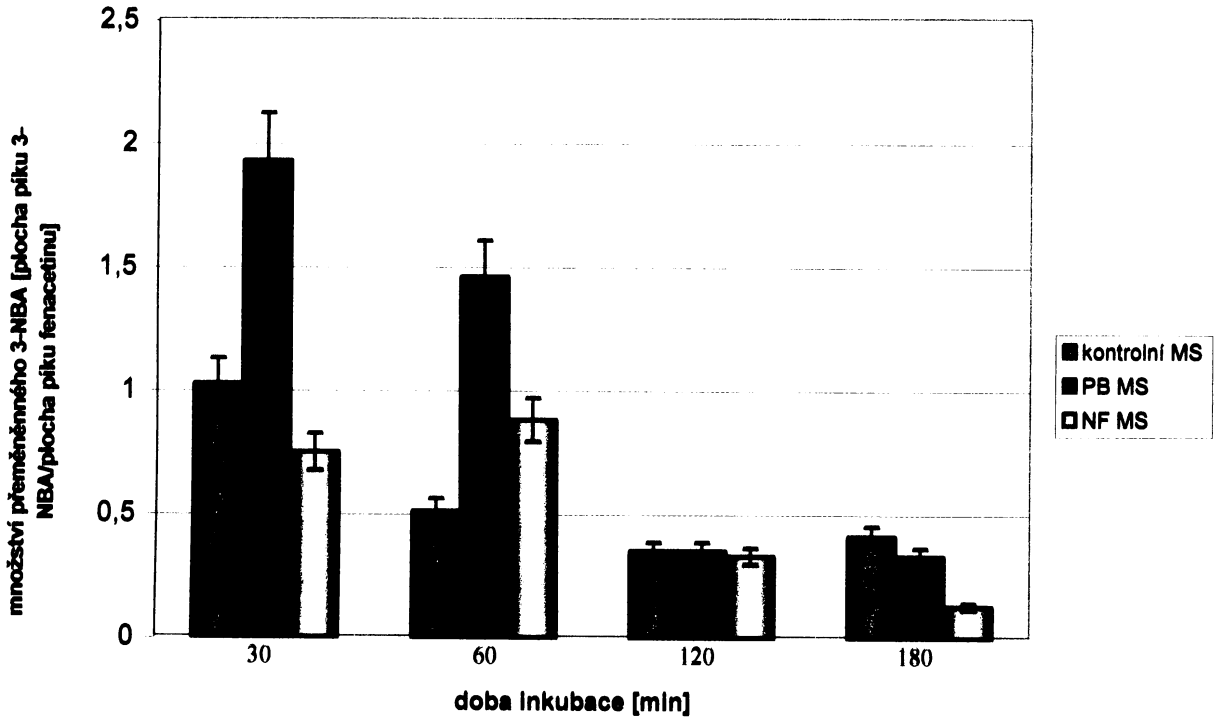
Obr. 17 Závislost přeměny 3-NBA na době inkubace s jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem (PB MS), β-naftoflavonem (NF MS) a potkanů nepremedikovaných (kontrolní MS). Sloupce uvedené v obrázku udávají množství přeměněného 3-ABA. Data uvedená v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních experimentů.

4.2.1.2 Studium metabolismu 3-NBA jaterními mikrosomy za anaerobních podmínek

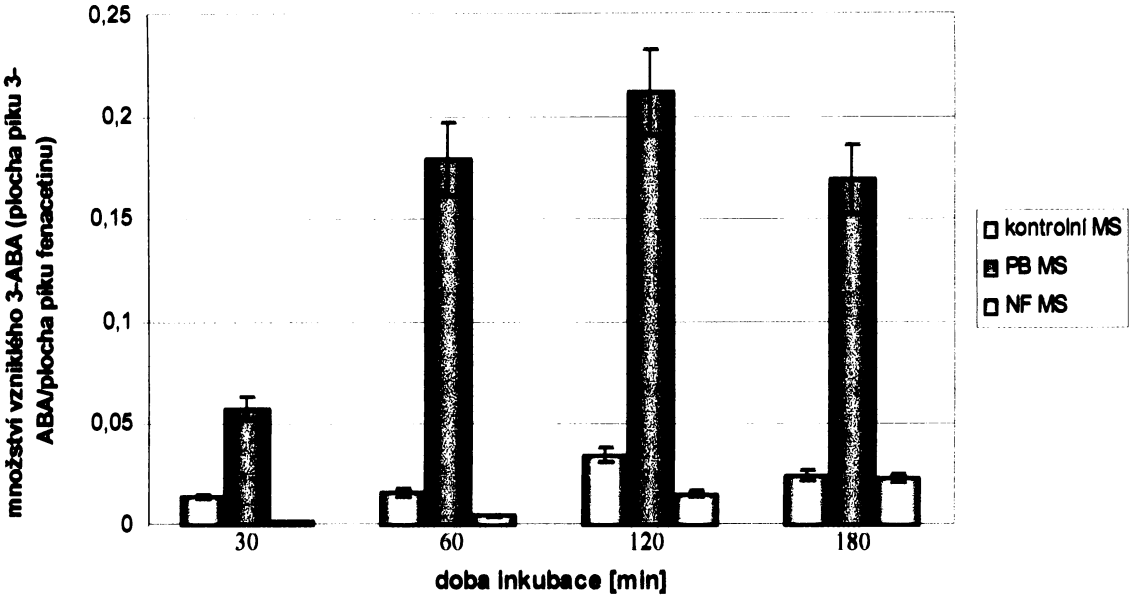
3-NBA je jaterními mikrosomy za anaerobních podmínek redukován efektivněji, než za podmínek oxidačních. Mikrosomy jater zvířat premedikovaných fenobarbitalem jsou v přeměně 3-NBA nejefektivnější, a to v inkubaci trvající 30 minut. Pak účinnost této přeměny klesá a v inkubaci trvající 180 min je množství přeměněného 3-NBA téměř 6krát menší než v 30minutové inkubaci. Mikrosomy jater potkanů premedikovaných β-naftoflavonem nejsou tak účinné jako ´´fenobarbitalové mikrosomy´´. Nejdříve množství přeměněného 3-NBA stoupá, maxima dosahuje v inkubaci trvající 60 min, poté dochází ke snížení množství přeměněnného 3-NBA a nejmenší hodnota přeměněného 3-NBA byla detekována v inkubaci 180 minut, zde bylo množství 3-NBA 6krát menší než v inkubaci trvající 60 minut. Mikrosomy jater

nepremedikovaných potkanů jsou v přeměně 3-NBA nejefektivnější při inkubaci trvající 30 minut, a jsou v této inkubaci o čtvrtinu účinnější než ''β-NF mikrosomy''. Se zvyšující se dobou této přeměny dochází k poklesu množství přeměněného 3-NBA a v inkubacích trvající 120 minut a 180 minut je tato přeměna podobná.

Nejvyšší nárůst vzniku 3-ABA byl pozorován za použití mikrosomů zvířat premedikovaných fenobarbitalem, kde se množství 3-ABA postupně zvyšuje a v inkubaci trvající 120 minut dosahuje nejvyšší hodnoty. Poté dochází k poklesu vzniklého 3-ABA asi o třetinu. ''β-NF mikrosomy'' vykazují při tvorbě 3-ABA nejmenší účinnost. Postupné zvyšování množství 3-ABA vykazuje časovou lineární závislost až do inkubace trvající 120 min. Nejvyšší množství 3-ABA bylo detekováno v inkubaci trvající 180 minut. Mikrosomy jater u potkanů, kteří nebyli premedikováni vykazují v tvorbě 3-ABA větší efektivitu než jaterní mikrosomy zvířat, která byla premedikována β-NF. V inkubačních směsí bylo detekováno podobné množství vzniklého 3-ABA. Výjimku tvoří 120minutová inkubace, kde bylo množství vzniklého 3-ABA nejvyšší.



Obr. 18 Závislost přeměny 3-NBA na době inkubace s jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem (PB MS), β-naftoflavonem (NF) a potkanů nepremedikovaných (kontrolní MS) za anaerobních podmínek. Sloupce uvedené v obrázku udávají množství přeměněného 3-NBA. Data uvedená v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních experimentů.



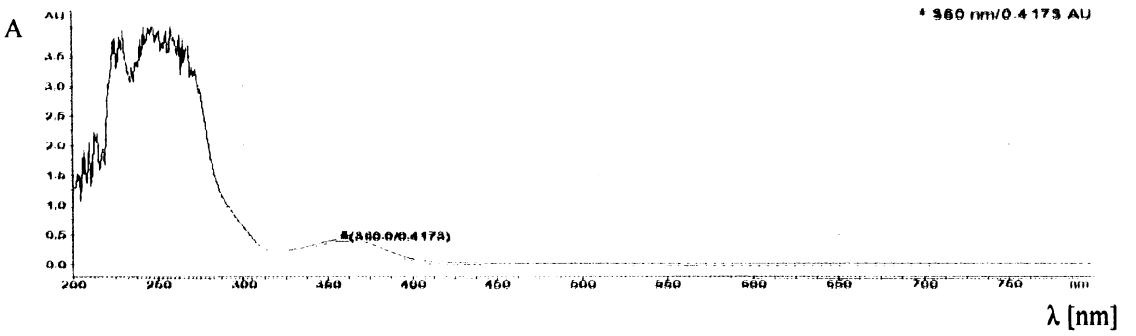
Obr. 19 Závislost přeměny 3-NBA na době inkubace s jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem (PB MS), β-naftoflavonem (NF) a potkanů nepremedikovaných (kontrolní MS) za anaerobních podmínek. Sloupce uvedené v obrázku udávají množství přeměněného 3-ABA. Data uvedená v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních experimentů.

4.2.2 STUDIUM VAZBY 3-NBA AKTIVOVANÉHO JATERNÍM ENZYMOVÝM SYSTÉMEM POTKANA

Ke studiu vazby 3-NBA aktivovaného jaterním enzymovým systémem potkana na proteiny byly použity vodné fáze získané z jednotlivých inkubací 3-NBA s mikrosomy jater potkanů premedikovaných fenobarbitalem, β-NF a nepremedikovaných (kontrolních) zvířat po extrakci ethylacetátem. Výsledek stanovení za aerobních podmínek je uveden na **Obr. 21** a **Obr. 22** udává výsledky měření prováděná za anaerobních podmínek.

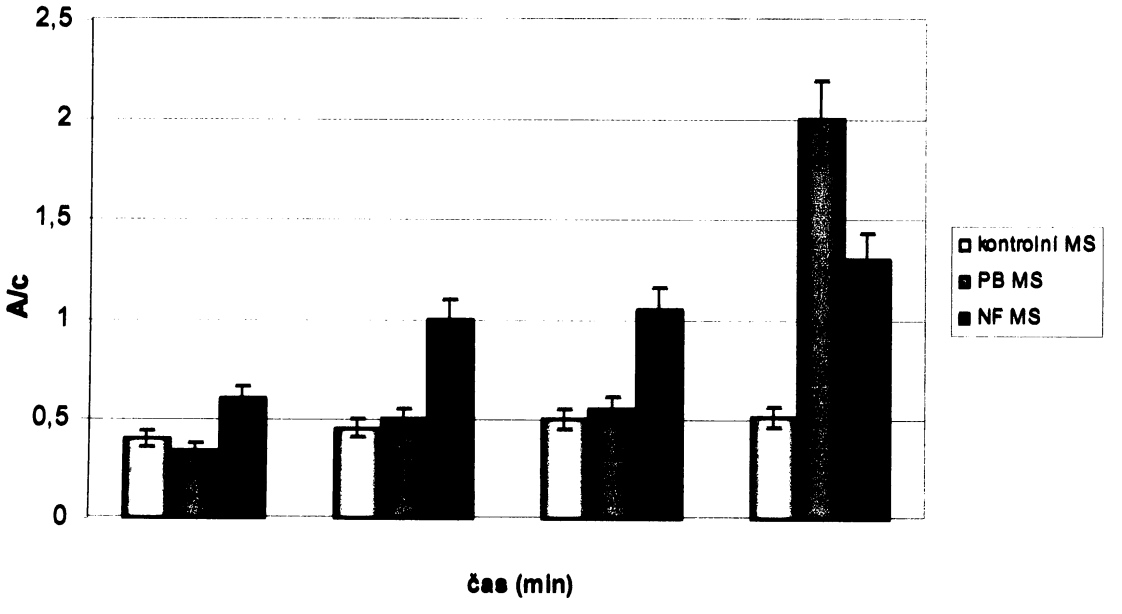
Vazba aktivovaného 3-NBA byla sledována spektrálně. Lze předpokládat, že v případě reaktivních metabolitů 3-NBA jako je 3-N-hydroxyaminobenzanthron (3-N-OH-ABA) dojde vazbou na protein ke změně spektra modifikovaných proteinů. Skutečně v průběhu metabolismu 3-NBA mikrosomálními systémy dochází ke změně

spektrálních vlastností mikrosomálních proteinů. Modifikované proteiny vykazují nový absorpční pás s maximem při 360 nm (**Obr. 20**).



Obr. 20 Absorpční spektrum reakční směsi 3-NBA s mikrosomy jater potkana po extrakci produktů ethylacetátem

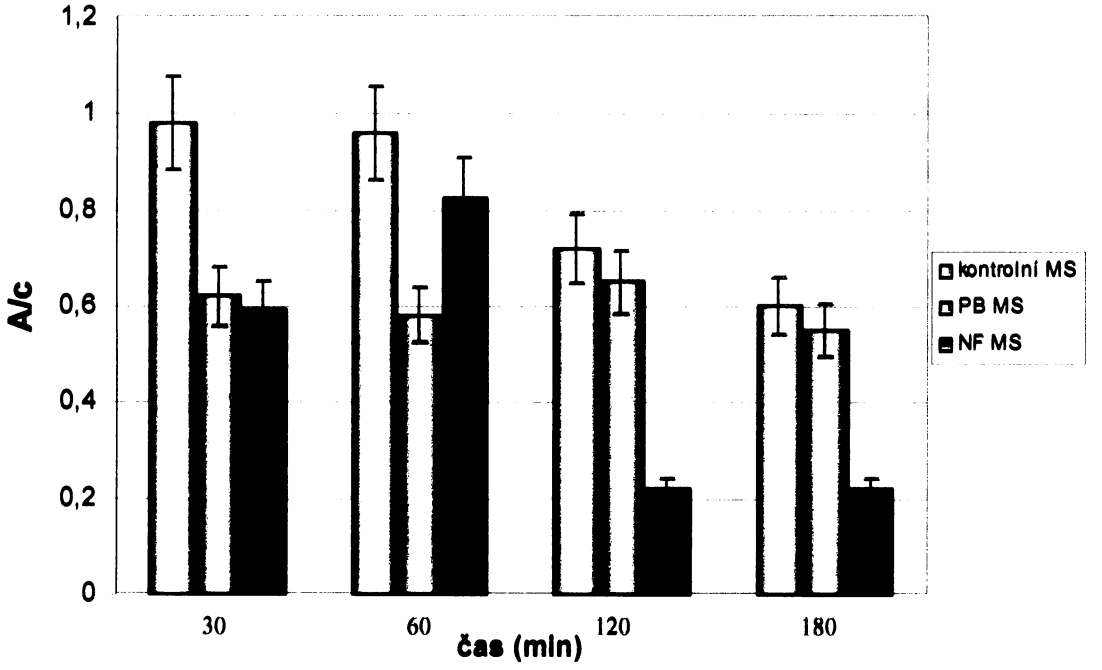
Vazba aktivovaného 3-NBA na mikrosomální proteiny za aerobních podmínek je nejvyšší u mikrosomů jater potkanů premedikovaných fenobarbitalem při inkubaci trvající 180 minut. U β-NF mikrosomů vazba aktivovaného 3-NBA na proteiny narůstá se zvyšující se dobou inkubace. U mikrosomů jater nepremedikovaných (kontrolních) potkanů je tato vazba nejnižší.



Obr. 21 Vazba 3-NBA aktivovaného jaterním enzymovým systémem potkana na proteiny v závislosti na čase za aerobních podmínek. Sloupce uvedené v obrázku udávají absorbanci proteinu při 360 nm vztaženou

na koncentraci proteinů. Data uvedená v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních experimentů.

K vazbě aktivovaného 3-NBA na mikrosomální proteiny za anaerobních podmínek dochází při kratší době inkubace (30-60 minut) než za podmínek aerobních **(Obr. 20, 21).** Vazba aktivovaného 3-NBA na mikrosomální proteiny za anaerobních podmínek je nejvyšší u mikrosomů jater potkanů nepremedikovaných při inkubaci trvající 30 minut. U β-naftoflavonových mikrosomů vazba aktivovaného 3-NBA na proteiny narůstá až do inkubace trvající 60 min, a poté klesá. U mikrosomů jater premedikovaných fenobarbitalem jsou hodnoty podobné.



Obr. 21 Vazba 3-NBA aktivovaného jaterním enzymovým systémem potkana na proteiny v závislosti na čase za anaerobních podmínek. Sloupce uvedené v obrázku udávají absorbanci proteinu při 360 nm vztaženou na koncentraci proteinů. Data uvedená v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních experimentů

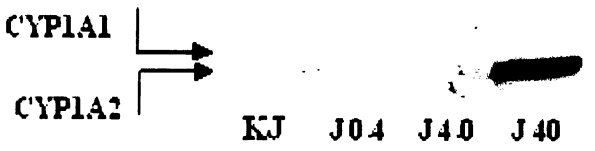
4.3 VLIV 3-NBA NA VYBRANNÉ BIOTRANSFORMAČNÍ ENZYMY LABORATORNÍHO POTKANA

Laboratorní potkani kmene Wistar byli premedikováni roztokem

3-nitrobenzanthronu o různé koncentraci. Jmenovitě 0,4, 4 a 40 mg/kg zvířete. Všechny premedikace probíhaly podle postupu uvedeného v kap. 3.3.1. Z vybraných orgánů testovaných zvířat jsme frakční centrifugací isolovali mikrosomální a cytosolární frakce a charakterizovali je z hlediska obsahu a aktivit vybraných enzymů participujících na oxidačním a redukčním metabolismu xenobiotik.

4.3.1 VLIV PREMEDIKACE LABORATORNÍCH POTKANŮ 3-NBA NA EXPRESI PROTEINŮ CYTOCHROMŮ P450 1A1 A P450 1A2 V MIKROSOMECH ISOLOVANÝCH Z JATERNÍ TKÁNĚ

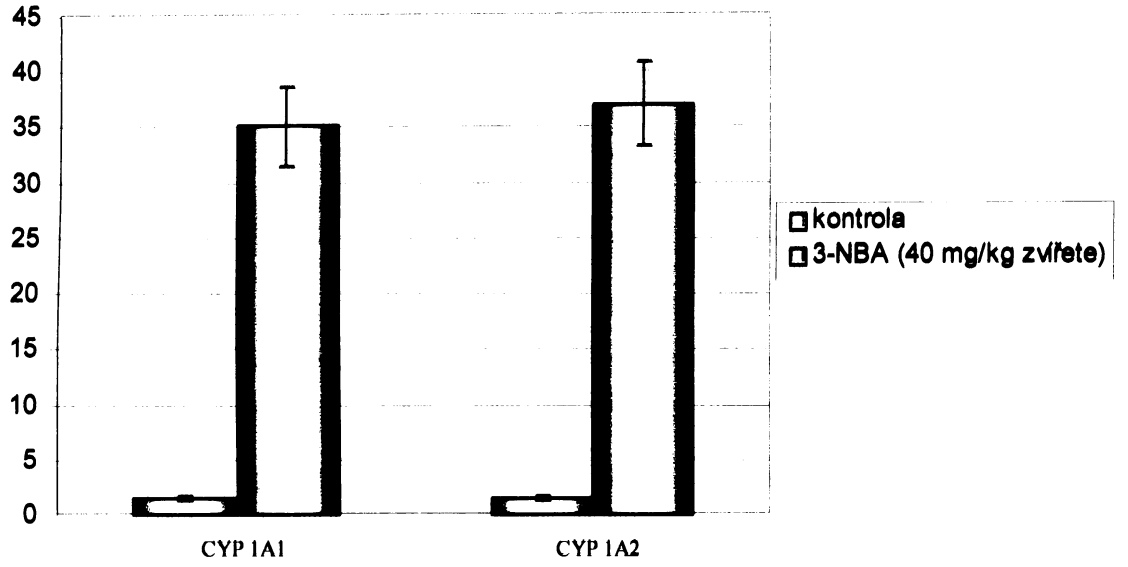
V mikrosomálních frakcích isolovaných z jater experimentálních zvířat jsme sledovali vliv 3-NBA na expresi proteinů jeho jednotlivých isoforem. K tomu jsme užili metodu „Western blot" za použití specifických protilátek proti proteinům těchto enzymů. Příklad PVDF membrány ukazující expresi proteinů cytochromů P450 1A1 a P450 1A2 v jaterní mikrosomální frakci potkanů premedikovaných 3-NBA jsou zobrazeny na **Obr. 22**.



Obr. 22 Exprese proteinů CYP1A1 a 1A2 v mikrosomech izolovaných z jaterní tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA

KJ - vzorek mikrosomální frakce isolované z nepremedikovaných zvířat
J0,4 - vzorek mikrosomální frakce isolované ze zvířat premedikovaných roztokem 3-NBA o koncentraci 0,4 mg/kg zvířete
J4 - vzorek mikrosomální frakce isolované ze zvířat premedikovaných roztokem 3-NBA o koncentraci 4 mg/kg zvířete
J40 - vzorek mikrosomální frakce isolované ze zvířat premedikovaných roztokem 3-NBA o koncentraci 40 mg/kg zvířete

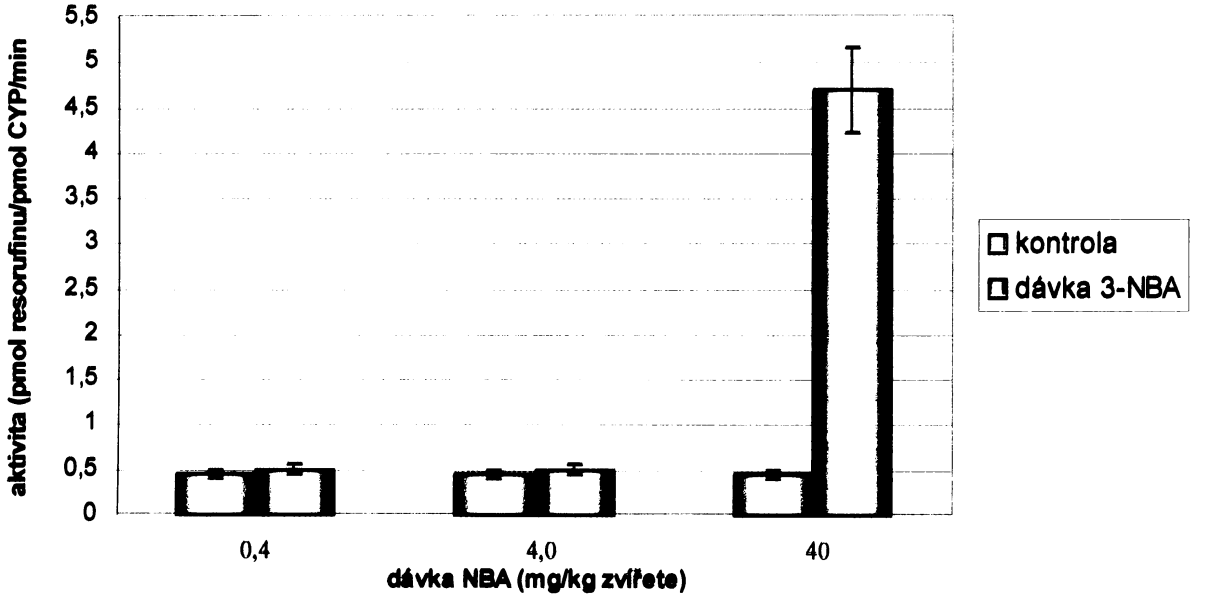
Výsledky z metody „Western blot" byly kvantifikovány v programu Elfoman a jsou uvedeny v **Obr. 23**. Z výsledků je patrné, že 3-NBA působí jako induktor exprese CYP1A1 a CYP1A2.



Obr. 23 Vliv premedikace potkanů na expresi proteinů cytochromů P450 1A1 a P450 1A2 v jaterní tkáni
Data uvedená v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních experimentů

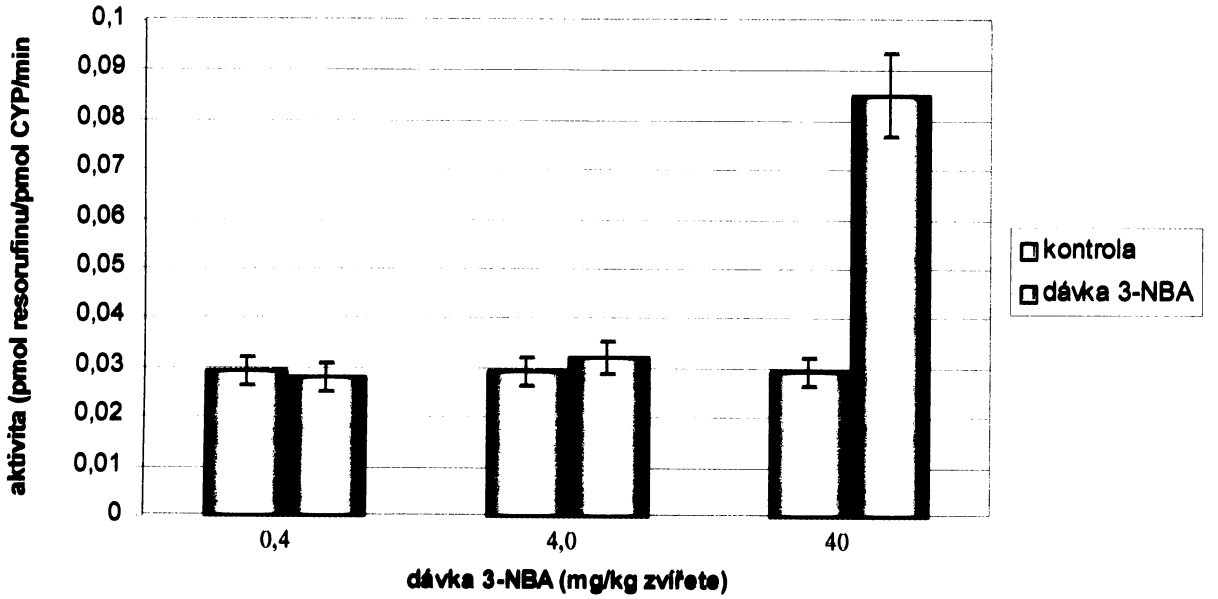
4.3.2 VLIV PREMEDIKACE LABORATORNÍCH POTKANŮ 3-NBA NA AKTIVITY CYTOCHROMŮ P4501A1 A P4501A2

Pro potvrzení výsledků získaných při sledování exprese cytochromů P450 bylo dále sledováno, zda je 3-nitrobenzanthronem ovlivněna i jejich aktivita. Aktivita jednotlivých cytochromů P450 byla zjišťována pomocí jejich specifických substrátů. Výsledky získané za použití jaterních mikrosomů jsou uvedeny v **Obr. 24** a **Obr. 25**. Sledování vlivu premedikace potkanů 3-NBA na oxidaci 7-ethoxyresorufinu (*O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu, EROD) a Sudanu I, zprostředkované cytochromy P450 1A1 a 1A2, potvrdilo výsledky získané studiem ovlivnění jejich exprese. Působením 3-NBA premedikací potkanů dávkou 40 mg 3-NBA/kg dochází i ke zvýšení obou specifických aktivit



Obr. 24 Vliv premedikace potkanů 3-NBA na oxidaci 7-ethoxyresorufinu (EROD) v jaterních mikrosomech
Data uvedená v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních experimentů

0,4 - mikrosomální frakce isolovaná ze zvířat premedikovaných roztokem 3-NBA o koncentraci 0,4 mg/kg zvířete
4 - mikrosomální frakce isolovaná ze zvířat premedikovaných roztokem 3-NBA o koncentraci 4 mg/kg zvířete
40 - mikrosomální frakce isolovaná ze zvířat premedikovaných roztokem 3-NBA o koncentraci 40 mg/kg zvířete



Obr. 25 Vliv premedikace potkanů 3-NBA na oxidaci Sudanu I v jaterních mikrosomech
Data uvedená v obrázku jsou průměry a standardní odchylky tří paralelních experimentů

5 DISKUSE

Cílem diplomové práce bylo rozšířit poznatky o metabolismu 3-nitrobenzanthronu (3-NBA). 3-NBA je silným mutagenem a karcinogenem pro laboratorní potkany způsobujícím tvorbu nádorů plic po intratracheální aplikaci[51]. 3-NBA je genotoxická sloučenina, schopná kovalentně modifikovat DNA. To bylo prokázáno jak v experimentech *in vivo*, tak *in vitro*[42,52]. Z dosud provedených studií je zřejmé, že klíčovým místem metabolické aktivace této sloučeniny je nitroskupina[38].

Bylo prokázáno, že na redukční aktivaci 3-NBA se podílí nejen enzymové systémy jaterních mikrosomů[47], ale především enzymy přítomné v cytosolární frakci jaterní tkáně modelového organismu laboratorního potkana a jater člověka[48]. Zjistilo se, že adukty s DNA generované metabolity vzniklými redukční aktivací 3-NBA jsou totožné jak v případě aktivace 3-NBA mikrosomálními enzymovými systémy jater, tak i při aktivaci 3-NBA enzymy cytosolární frakce jaterní tkáně[47,48]. Nejefektivnější aktivace 3-NBA v jaterních mikrosomech je zprostředkována enzymem NADPH:cytochrom P450 reduktasou[48]. Z cytosolárních enzymů jaterní tkáně je v aktivaci 3-NBA nejvíce účinným enzymem DT-diaforasa (NQO1)[48]. Ukázalo se také, že cytosolárními enzymovými systémy jaterní tkáně je 3-NBA redukčně aktivován mnohem účinněji než enzymovými systémy jaterních mikrosomů[48,48]. Proto bylo jedním z cílů předkládané diplomové práce studium redukce 3-NBA lidskou DT-diaforasou.

Zjistili jsme, že 3-NBA je lidskou rekombinantní DT-diaforasou redukován na 3-aminobenzanthron (3-ABA). Kromě 3-ABA, redukčního metabolitu 3-NBA, nebyly detekovány žádné další metabolity. Se zvyšující se dobou inkubace NQO1 s 3-NBA i koncentrace 3-NBA a NQO1 dochází ke zvýšení přeměny 3-NBA a nárůstu množství vzniklého 3-ABA. Pokles 3-NBA v čase koreluje s přírůstkem jeho redukčního metabolitu, 3-ABA. Redukce 3-NBA lidskou NQO1 je umožněna stéricky výhodnou vazbou této sloučeniny do aktivního centra enzymu[53].

V druhé části diplomové práce byl sledován potenciál enzymů mikrosomálního systému jater potkana metabolisovat 3-NBA za aerobních a anaerobních podmínek.

Obdobně jako DT-diaforasa mikrosomální enzymy redukují 3-NBA na 3-ABA. Z hlediska množství přeměněného 3-NBA za aerobních podmínek jsou nejvíce efektivní mikrosomy jater potkanů premedikovaných β-naftoflavonem, následují mikrosomy jater potkanů premedikovaných fenobarbitalem a nejméně efektivní jsou mikrosomy jater z nepremedikovaných (kontrolních) zvířat. Jinak je tomu za anaerobních podmínek V tomto případě jsou nejefektivnější jaterní mikrosomy zvířat premedikovaně fenobarbitalem, následují ´´ mikrosomy nepremedikovaných zvířat ´´ a nejméně účinné byly mikrosomy z potkanů premedikovaných β-naftoflavonem. Z hlediska efektivity metabolisovat 3-NBA jsou mikrosomální enzymové systémy za aerobních podmínek méně účinné než lidská NQO1. Jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných β-naftoflavonem sice přeměnily 3-NBA v prvních 60 minutách inkubace s největší efektivitou, ovšem ne s takovou jako NQO1, a jejich účinnost také klesala se zvýšenou dobou inkubace. Podstatný rozdíl mezi DT-diaforasou a mikrosomálními enzymy byl zjištěn ve tvorbě 3-ABA, s nižší tvorbou v mikrosomech, i když za anaerobních podmínek je tvorba 3-ABA u potkanů premedikovaných β-NF o něco efektivnější. Zda je tato skutečnost způsobena nižší efektivitou mikrosomálních enzymů nebo „vychytáváním" reaktivního metabolitu proteiny této subcelulární frakce bude v naší laboratoři předmětem dalších studií.

Další část předkládané diplomové práce se zabývala potenciálním ovlivněním mikrosomálních enzymů jako jsou cytochromy P450 podrodiny 1A, konkrétně cytochromů P450 1A1 a P450 1A2, 3-nitrobenzanthronem. Ty jsou v redukci 3-NBA rovněž aktivní, i když s daleko menší účinností než DT-diaforasa nebo NADPH:cytochrom P450 reduktasa[48]. Tato část je pokračování mé bakalářské práce[49]. Bylo zjištěno, že 3-NBA ovlivňuje expresi a aktivitu cytochromů P450 1A1 a 1A2. Indukce byla prokázána sledováním exprese proteinů těchto enzymů metodou „Western blot". Z výsledků je zřejmé, že indukcí exprese enzymů, které 3-NBA rovněž metabolicky aktivují na intermediáty vázající se na DNA [56,57], může být jeho karcinogenní účinek ještě zvýšen.

6 ZÁVĚR

Z výsledků získaných při vypracování diplomové práce vyplývá, že zadané cíle byly splněny. Nejdůležitější poznatky získané v diplomové práci lze shrnout následovně:

- 3-nitrobenzanthron (3-NBA) je přeměňován lidskou rekombinantní DT-diaforasou (NQO1) za tvorby jednoho redukčního metabolitu, 3-aminobenzanthronu
  (3-ABA).

- Redukce 3-NBA NQO1 je závislá na koncentraci enzymu, době inkubace a koncentraci použitého 3-NBA

- Metabolickou přeměnou 3-NBA jaterním mikrosomálním systémem potkana vzniká rovněž pouze jeden metabolit, 3-ABA.

- Z mikrosomálních systémů jater potkanů užitých při experimentech jsou v přeměně 3-NBA za aerobních podmínek nejúčinnější mikrosomy potkanů premedikovaných β-naftoflavonem. a za anaerobních podmínek jsou to mikrosomy zvířat premedikovanách fenobarbitalem

- Premedikací experimentálního modelu laboratorního potkana 3-NBA je stimulována exprese cytochromů P450 podrodiny 1A (CYP1A1/2). Studovaná sloučenina je silným induktorem těchto enzymů v jaterní tkáni použitého živočišného druhu

Výsledky podtrhují význam studia sledovaného karcinogenu, který je polutantem ovzduší městského prostředí.

7 SEZNAM LITERATURY

1. Vokurka, M.: *Praktický slovník medicíny*, Maxdorf, Praha (1994)
2. Stiborová, M., Mikšanová, M.: Živa 47,4 (1999)
3. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W.: *Harperova biochemie* Nakladatelství a vydavatelství H+H, Praha (2001)
4. Rýdlová, H.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha (2001)
5. Menn, J.J.: *Environ. Health Perpect.* 27,113 (1978)
6. Stiborová, M.: *Xenobiochemie*, Přednáška na PřF UK, Praha, katedra biochemie (2006)
7. Parkinson, A.: *Toxicology (Casarett & Daull_s Toxicology, the basic science of poisons, 5 th edition, Klaassen CD.Ed.)*113, Mc Graw-Hill, New York (1996)
8. Večerková, J.: *Biotransformace léčiv a její význam pro toxikologickou praxi*, skriptum 1. LFUK, Karolinum, Praha (1997)
9. Mikšanová, M.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha (1999)
10. Coon, M.J.: *Nutr. Rev.* 36, 3198 (1978)
11. Gut, I., Souček, P., Hodek, P.: *Pracovní lékařství* 1, 15 (1992)
12. Coon, M.J., Persson, A.V.: *Enzymatic Basis of Detoxification I*, Academic Press, New York (1980)
13. Heineman, F.S., Ozols, J.: *J. Biol. Chem.* 258, 4195 (1983)
14. Taniguchi, H., Imai, Y., Sato, R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 585 (1984)
15. Garfinkel, D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493 (1958)
16. Klingenberg, M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376 (1958)
17. Omura, T., Sato, R.: *J. Biol. Chem.* 239,2370 (1964)
18. Ortiz de Montellano, P.R.: *Cytochrome P450,* 483,Plenum Press, (1995)
19. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J. Jr., Martínek, V., Páca, J.: *Chem. Listy* 98, 876 (2004)
20. Schacter, B.A., Nelson E.B., Marver, H.S., Masters, B.S.: *J. Biol. Chem.* 247, 3601 (1972)
21. Enoch, H.G., Strittmatter, P.: *J. Biol. Chem.* 254,8976 (1979)Bieler, C.A., Arlt, V.M., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Cancer Lett.* 200, 9 (2003)

22. Whitlock, J.P.:*Annu.Rev.Pharmacol-Toxicol.* 39,103 (1999)
23. Oprian, D.D., Coon, M.J.: *J. Biol. Chem.* 257, 8935 (1982)
24. Hájková, M.: *Diplomová práce*, PřF UK , Praha (2002)
25. Stiborová, M., Stiborová-Rupertová, M., Bořek-Dohalská, L., Weissler, M., Frei, E.: *Chem. Res. Toxicol.*16,38 (2003)
26. Segura-Aguilar, J., Kaiser, R., Lind, C.: *Biochem. Biophys. Acta* 1120, 33 (1992)
27. Lind, C., Vadi, H., Ernster, L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 97 (1978)
28. Enya, T., Kawanishi, M., Suzuki, H., Matsui, S.T., Hisamatsu, Y.: *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1460 (1998)
29. Stiborová, M., Frei, E., Sopko, B., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Carcinogenesis* 23, 617 (2002)
30. Patterson, A.V., Saunders, M.P., Chinje, E.C., Patterson, L.H., Stratford, I.J.: *Anti-Cancer Drug Des.*13, 541 (1998)
31. Patterson, A.V., McKeown, S.R., Robson, T., Gallagher, R., Raleigh, S.M., Orr, S.: *Anti-Cancer Drug Des.* 14, 473 (1999)
32. De Long, M.J., Santamaria, A.B., Talalay, P.: *Carcinogenesis* 8, 1549 (1987)
33. Robertson, J.A., Chen, H.C., Nebert, D.W.: *J. Biol. Chem.* 261, 15794 (1986)
34. Rosvold, E.A., McGlynn, K.A., Lustbader, E.D., Buetow, K.H.: *Pharmacogenetics* 5, 199 (1995)
35. Montano, M.M., Katzenellenbogen, B.S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2581 (1997)
36. Voet, D., Voet, J.G.: *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha (1995)
37. Pritsos, C.A.: *Chem. Biol. Interactions* 129, 195 (2000)
38. Stiborová, M.: *Chem. Listy* 96, 784 (2002)
39. Enya, T., Suzuki, T., Watanabe, T., Hirayama, T., Hisamatsu, Y.: *Environ. Sci. Technol.* 31, 2772 (1997)
40. Phousongphouang, P.T., Grosovsky, A.J., Eastmond, D.A., Covarrubias, M., Arey, J.: *Mutat. Res.* 472, 93 (2000)
41. Lamy, E., Kassie, F., Gminski, R., Schmeiser, H.H., Mersch-Sunderman, V.: *Toxicol. Lett.* 146, 103 (2003)
42. Chen, H., Lum, A., Seifried, A., Wilkens, L.R., Le Marchand, L.: *Cancer Res.* 59, 3045 (1999)

43. Murahashi, T., Iwanaga, E., Watanabe, T., Hirayama, T.: *Health Sci.* 49, 386 (2003)

44. Murahashi, T., Watanabe, T., Otake, S., Hattori, Y., Takamura, T., Wakabayashi, K., Hirayana, T.: *J. Chromatogr. A* 992, 101 (2003)

45. Watanabe, T., Hasei, T., Takahashi, T., Otake, S., Murahashi, T., Takamura, T., Hirayama, T., Wakabayashi, K.: *Mutat. Res.* 538, 121 (2003)

46. Arlt, V.M., Sorg, B.L., Osborne, M., Hewer, A., Seidel, A., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 107 (2003)

47. Arlt, V.M., Stiborová, M., Henderson, C.J., Osborne, M.R., Bieler, C.A., Frei, E., Martínek, V., Sopko, B., Wolf, C.R., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H.: *Cancer Res.* 65, 2644 (2005)

48. Arlt, V.M., Stiborová, M., Hewer, A., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H.: *Cancer Res.* 63, 2752 (2003)

49. Zavázalová, J.: *Bakalářská práce*, PřF UK, Praha (2005)

50. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 267 (1951)

51. Nagy, E., Zeisig, M., Kawamura, K., Hisamatsu, Y., Sugeta, A., Adachi, S., Moller, L.: *Carcinogenesis* 26, 1821 (2005)

52. Bieler, C.A., Arlt, V.M., Wiessler, M., Schneiser, H.H.: *Cancor Lett.* 200, 9 (2003)

53. Arlt, V.M., Stiborová, M., Henderson, C.J., Osborne, M.R., Bieler, C.A., Frei, E., Martínek, V., Sopko, B., Wolf, C.R., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H.: *Cancer Res.* 65, 2644 (2005)

54. http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2BDM (25.3.2007)