

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: BIOCHEMIE

Studijní obor: BIOCHEMIE



Petra Fousová

**Úloha chemopreventivních sloučenin a potravních aditiv v procesu
metabolismu a aktivace karcinogenů cytochromu P450**

**Role of chemopreventive compounds and food aditives in the process of
metabolism and activation of carcinogens by cytochromes P450**

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 3. 6. 2011

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady, podněty a také čas, který mi věnoval v průběhu vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Jitce Koblihové, Ph.D. a RNDr. Michaele Moserové za všestrannou pomoc, podporu a trpělivost, kterou mě provázely během mého působení v laboratoři.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým přátelům a rodině za podporu při psaní této práce.

ABSTRAKT

Při vzniku zhoubných nádorů se uplatňují různé vnitřní i vnější faktory, přičemž bylo prokázáno, že genotoxicita většiny exogenních chemických karcinogenů závisí na metabolické aktivaci enzymy. Zástupci podrodiny CYP1A se účastní aktivace prekarcinogenů, například heterocyklického aminu PhIP. Jeden z hlavních přístupů, jak dosáhnout snížení rizika rakoviny, je prevence. V poslední době se rozšířila konzumace potravních doplňků obsahujících různé chemopreventivní látky, jako jsou především flavonoidy. Na druhou stranu byly potvrzeny i negativní účinky těchto látek a to především jejich schopnost indukovat cytochromy P450 a tím zvyšovat riziko aktivace prekarcinogenů. V této práci byl sledován indukční efekt jednorázového podání chemopreventivní látky β -naftoflavonu na cytochrom P450. Dále byla provedena sekvenční studie, ve které byl nejprve potkanům podán induktor β -naftoflavon a s časovým odstupem karcinogen PhIP. Nakonec byl studován účinek PhIP na aktivitu cytochromů P450 *in vitro*.

KEY WORDS: cytochrom P450, karcinogeny, chemopreventivní látky

ABSTRACT

The origin of malignant tumors have different internal and external factors and also have been shown that, for majority of exogenous chemical carcinogens, the genotoxicity depends on metabolic activation through enzymes. Members of the subfamilies CYP1A are involved in activation of precarcinogens, for example the heterocyclic amine PhIP. One of the main approaches to achieve a reduction in a cancer risk is prevention. Recently, the consumption of dietary supplements containing various chemopreventive substances, such as flavonoids, has expanded. On the other hand, some negative effects of these compounds were also confirmed, especially their ability to induce cytochrome P450 and thus increase the risk of activating precarcinogens. In this study, the inductive effect of a single administration of chemopreventive compounds, namely the effect of β -naphthoflavon to cytochrome P450, had been investigated. Furthermore, a sequential study was carried out. In this study rats were first given an inducer, the β -naphthoflavon, and after a passed interval they were given the carcinogen PhIP. Finally, the effect of PhIP on the activity of cytochrome P450 has been studied *in vitro*.

KEY WORDS: cytochrome P450, carcinogens, chemopreventive compounds

OBSAH

1. TEORETICKÁ ČÁST	1
1.1. CYTOCHROM P450	1
1.1.1. Základní charakteristika cytochromu P450.....	1
1.1.2. Monooxygenasový systém (MFO systém)	2
1.1.3. Reakční cyklus cytochromu P450.....	3
1.1.4. Nomenklatura cytochromu P450.....	5
1.1.5. CYP1A podrodina.....	5
1.1.6. Indukce a inhibice cytochromu P450	6
1.2. BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK.....	7
1.3. KARCINOGENEZE	8
1.3.1. Karcinogeny	10
1.3.1.1. Heterocyklické aminy.....	10
1.4. CHEMOPREVENCE	14
1.4.1. Flavonoidy.....	15
1.4.1.1. Metabolismus flavonoidů	16
1.4.1.2. Flavonoidy a cytochromy P450.....	16
2. CÍL PRÁCE	17
3. MATERIÁLY A METODY	18
3.1. MATERIÁLY	18
3.1.1. Chemikálie.....	18
3.1.2. Přístroje.....	19
3.1.3. Programy	20
3.1.4. Ostatní.....	20
3.2. METODY.....	21
3.2.1. Premedikace.....	21
3.2.2. Izolace tkáně	21
3.2.3. Stanovení koncentrace proteinů	22
3.2.4. Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).....	24
3.2.5. Metoda elektropřenosu proteinů na PVDF membránu (Western blot).....	26
3.2.6. Stanovení enzymové aktivity 7-ethoxyresorufin-O-deethylasy (EROD).....	27
3.2.7. Vliv PhIP na aktivitu cytochromů P450.....	29
3.2.7.1. Studium inhibičního vlivu PhIP na cytochromy P450.....	29
3.2.7.2. Studium vlivu PhIP na cytochromy P450 v různých časových intervalech	29
3.2.7.3. Studium přídavku NADPH na metabolickou aktivaci PhIP cytochromy P450	30
4. VÝSLEDKY	31
4.1. IZOLACE A STANOVENÍ PROTEINŮ	31

4.2. VYHODNOCENÍ INDUKCE CYTOCHROMU P450	31
4.2.1. <i>Indukční efekt jednorázového podání chemopreventivní látky</i>	32
4.2.2. <i>Sekvenční podání</i>	33
4.3. INTERAKCE PHIP S CYTOCHROMY P450 IN VITRO.....	34
4.3.1. <i>Studium inhibičního vlivu PhIP na cytochromy P450</i>	35
4.3.2. <i>Studium vlivu PhIP na cytochromy P450 v různých časových intervalech</i>	35
4.3.3. <i>Studium přídatku NADPH na metabolickou aktivaci PhIP cytochromy P450</i>	36
5. DISKUZE	38
6. ZÁVĚR.....	41
7. SEZNAM ZKRATEK	42
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	44

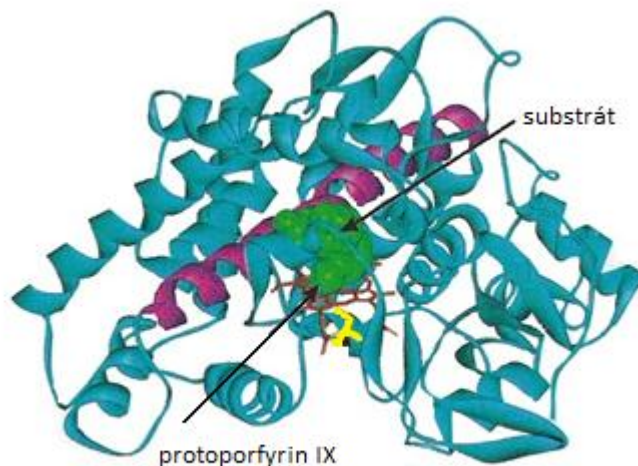
1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Cytochrom P450

1.1.1. Základní charakteristika cytochromu P450

Cytochromy P450 (*Obr. 1*, str. 1) představují unikátní rodinu hemových proteinů [1] vyskytujících se v mnoha organismech od prokaryotických po většinu eukaryotických jako jsou např. kvasinky, houby, rostliny, hmyz a savci [1, 7, 10]. Jsou to klíčové enzymy monoxygenačních dějů podílejících se na metabolismu endogenních látek i xenobiotik [11].

Název cytochrom P450 se poprvé objevuje v odborné literatuře v práci Omury a Sato [2]. Písmeno P v názvu je odvozeno od slova pigment, původně byl cytochrom P450 určen jako červené barvivo nalezené v játrech. Po redukci atomu hemového železa váže oxid uhelnatý a tento komplex absorbuje světlo při vlnové délce 450 nm [39].



Obr. 1: Struktura savčího CYP2C5. Převzato a upraveno z [1].

Jak již bylo uvedeno v prvním odstavci, jedná se o hemový protein, který se od většiny ostatních hemoproteinů, hemoglobinu a myoglobinu, liší svými spektrálními a katalytickými vlastnostmi, které jsou dané uspořádáním porfyrinového skeletu [11]. Tento porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je částečně vázán hydrobními interakcemi a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu [12].

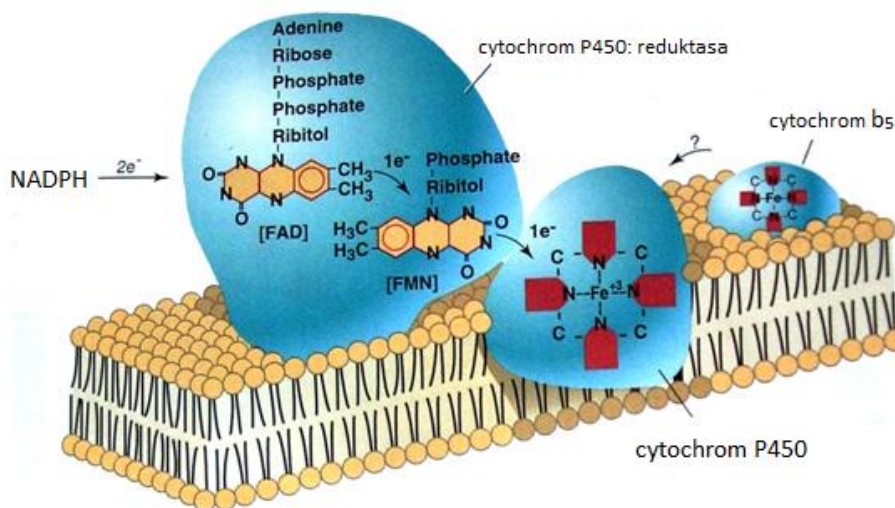
Cytochromy P450 jsou u savců nejhojněji zastoupeny v játrech, kde také probíhá největší část biotransformačních procesů [4]. V menší míře jsou zastoupeny v gastrointestinálním traktu, plicích, ledvinách, mozku a ve velmi nízkých koncentracích i v dalších tkáních a orgánech (nosní sliznice, srdeční sval aj.) [14].

Obecně lze konstatovat, že substrátová specifita cytochromů P450 je široká [3]. Přeměňují jak exogenní látky (např. léky, potravinová aditiva, polutanty jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, polycyklické aromatické nitrosoučiny, fenoly), tak i endogenní látky (steroidy, vyšší mastné kyseliny, prostaglandiny) [10]. Jednotlivé cytochromy P450 se do určité míry liší svou substrátovou specifikou, i když se jejich schopnost přeměňovat různé substráty částečně překrývá [7].

1.1.2. Monooxygenasový systém (MFO systém)

Systém cytochromu P450 je v eukaryotických buňkách vázán v membráně hladkého endoplasmatického retikula nebo mitochondrií, zatímco u bakterií se tento systém nachází v rozpustné formě v cytosolu.

Mikrosomální monooxygenasový systém (*Obr. 2*, str. 2) je soubor enzymů katalyzujících celou řadu oxidačních, oxygenačních, popř. redukčních reakcí, přičemž využívá především molekulární kyslík. Je též nazýván systémem oxidas se smíšenou funkcí



Obr. 2: Komponenty MFO systému v endoplasmatickém retikulu. Převzato a upraveno z [1].

MFO se skládá ze tří základních složek:

1.) NADPH:cytochrom P450 reduktasa

Jedná se o enzym s molekulovou hmotností kolem 80 000 [9]. Je unikátní tím, že obsahuje zároveň FAD a FMN koenzymy, díky nimž může působit jako dělič elektronového páru dodávající postupně elektrony cytochromu P450. Skládá se ze dvou domén, hydrofilní doména vykazuje NADPH:cytochrom c reduktasovou aktivitu a je umístěna vně membrány endoplasmatického retikula. Naopak hydrofobní doména slouží k ukotvení enzymu v membráně a k tvorbě funkčního systému s cytochromem P450.

2.) cytochrom P450 (viz. kap. 1.1.1)

3.) biologická membrána

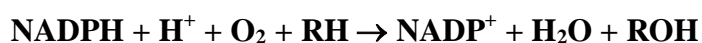
Membránové lipidy způsobují konformační změny cytochromu P450 zvyšující jeho afinitu k substrátu a jsou také „zásobárnou“ uložených hydrofobních substrátů cytochromu P450 [32].

Fakultativně může MFO systém obsahovat také cytochrom b₅ a NADPH:cytochrom b₅ reduktasu.

1.1.3. Reakční cyklus cytochromu P450

Hlavní funkcí tohoto enzymového systému je katalyzovat inkorporaci jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu a druhý atom kyslíku je redukován na vodu [7].

Obecné schéma reakce katalyzované cytochromem P450 je následující:

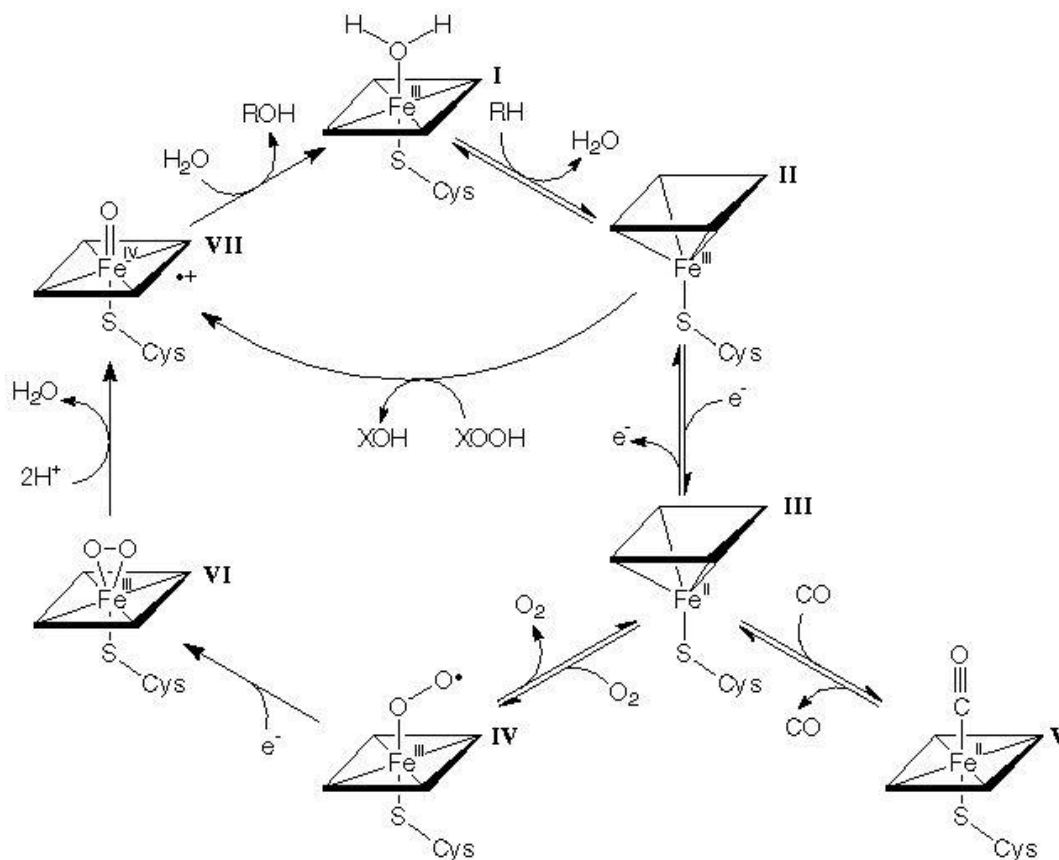


kde RH představuje substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce. Samotný reakční cyklus (*Obr. 3*, str. 4) se pravděpodobně skládá alespoň z osmi kroků.

V klidovém stavu je atom hemového železa ve ferri formě (tj. s oxidačním číslem III) a je hexakoordinováno (v nízkospinovém stavu), šestým ligandem je voda (**I**).

V prvním kroku reakčního cyklu dochází k navázání substrátu na ferri formu cytochromu P450, touto vazbou dochází k uvolnění molekuly vody, tedy šestého ligandu. Dochází ke změně konformace molekuly enzymu, zároveň atom hemového železa zůstává ve své ferri formě (**II**). Po tomto sledu událostí dochází k přenosu elektronu z NADPH:cytochrom P450 reduktasy, díky této reakci se hemové železo redukuje na ferro

formu (tj. s oxidačním číslem II), komplex zůstává pentakoordinován (ve vysokospinovém stavu). Tato forma enzymu je pak schopna vázat molekulu kyslíku nebo jiné ligandy (III) a (V). V dalším kroku se tedy vytváří ternární komplex, jehož následkem dochází k přechodu do jiného mezomerního stavu, na „ferri-superoxidový“ komplex. Tento komplex je dále redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou, v důsledku čehož se aktivuje kyslík na peroxidový anion (IV). Poslední jmenovaná reakce je finálním stupněm tzv. aktivační fáze reakčního cyklu cytochromu P450. Hydroxylační fáze není zatím zcela objasněna. V dalším kroku dochází ke štěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku je redukován, přijme dva protony a dojde k uvolnění vody (VI). Druhý atom zůstává vázán na hemovém železu a vzniká tak „ferri-oxenový“ komplex (VII). Dále dochází k odštěpení vodíkového atomu z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na ion železa hemu. Dochází k rekombinaci radikálů, při které se uvolňuje hydroxylovaná molekula substrátu (ROH) a regeneruje se tak původní forma cytochromu P450 [7].



Obr. 3: Reakční cyklus cytochromu P450. Převzato z [66].

1.1.4. Nomenklatura cytochromu P450

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (izoformách), které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry (stupně) homologie jejich primární struktury (pořadí aminokyselin) proteinových molekul [42]. Nebert a spolupracovníci navrhli nové systematické názvosloví genů a forem P450, ve kterém se formy P450 označují zkratkou CYP (cytochrom P450). Rodiny cytochromů P450 jsou označovány arabskou číslicí za zkratkou CYP (např. CYP1). Následuje velké písmeno označující podrodinu (např. CYP1A). Nakonec náleží opět arabská číslice, která udává konkrétní izoformu (např. CYP1A1). Do stejné rodiny náleží cytochromy P450, u kterých byla nalezena 40% homologie aminokyselinové sekvence jejich proteinů, do stejné podrodiny pak ty, které vykazují homologii více než 60% [41].

V roce 1999 bylo odhadováno, že člověk má ve svém genomu 50 druhů izoform CYP, v současné době je známo 57 isoform cytochromů P450, kdy 50 z těchto cytochromů je mikrosomálních. Geny pro CYP se nacházejí na všech lidských chromosomech s výjimkou chromosomu Y. Cytochromy P450 přítomné v lidském organismu jsou klasifikovány do 17 rodin. Metabolismu xenobiotik se účastní cytochromy P450 pouze tři z těchto rodin: CYP1, CYP2 a CYP3 (v menší míře též rodina CYP4). Ostatní rodiny participují na biosyntéze steroidů, cholesterolu či žlučových kyselin, na metabolismu mastných kyselin, kyseliny arachidonové apod. [32].

Mezi lidskými a potkaními cytochromy P450 existují jisté rozdíly. Některé lidské isoformy nejsou přítomné u potkana a naopak. Pokud se zaměříme na substrátovou specifitu u obou organismů, u obou platí, že substrátová specifita je u cytochromů P450 široká a u jednotlivých forem se často překrývá. Existují však substráty, které jsou metabolizovány stejnými izoformami u člověka i potkana. Takovým příkladem je CYP1A1/2 katalyzující *O*-deethylaci 7-ethoxyresorufinu nebo CYP2E1 katalyzující 6-hydroxylaci chlorzoxanu [40].

1.1.5. CYP1A podrodina

Podrodina CYP1A, která se skládá ze strukturně příbuzných forem enzymů CYP1A1 a CYP1A2. Oba zástupci patří mezi jedny z nejdůležitějších cytochromů P450, mohou aktivovat až 90% všech dosud známých karcinogenů, účastní se biotransformace

polycyklických aromatických uhlovodíků, aromatických aminů a heterocyklických aminů [14]. Oba tyto enzymy jsou si velmi podobné, vykazují téměř 70% identitu v aminokyselinové sekvenci, katalyzují i podobné či dokonce stejné reakce. Liší se však především v lokalizaci. CYP1A1 je ve velmi nízkých koncentracích zastoupen v játrech, primárně se vyskytuje především v plicích, mozku, GIT a srdci. Vysoká aktivita CYP1A1 je spojena s výskytem kolorektálních nádorů [70]. Naopak CYP1A2 je jaterním enzymem. Vykazuje širokou substrátovou specifitu, mezi významné substráty patří aromatické aminy, které vznikají jako pyrolytické produkty tepelné úpravy potravin. CYP1A2 metabolizuje také důležitá léčiva jako fenacetin, theophyllin, kafein, imipramin a propranolol [71].

1.1.6. Indukce a inhibice cytochromu P450

Při indukci dochází ke zvýšení hladin cytochromů P450. Nebert a kolegové se výrazně zasloužili o objasnění procesů podílejících se na indukci cytochromů P450 [43]. Podstatou indukce většiny CYP je zvýšení rychlosti transkripce. Ke zvýšení transkripce může dojít aktivací některého z jaderných nebo cytosolových receptorů, které následně ovlivní transkripci. Expres CYP1A genů je regulována přes specifický receptor nazývaný Ah receptor, který je aktivován v přítomnosti induktorů, mezi které patří polycyklické aromatické uhlovodíky, jako je 3-methylcholantren a halogenované aromatické uhlovodíky jako je 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin [45].

Neaktivovaný AhR jaderný translokátor je v cytosolu vázán v proteinovém komplexu spolu s dimerem proteinu teplotního šoku (Hsp90) a dalšími buněčnými ko-chaperony [44]. Po navázání ligandu vstupuje AhR do buněčného jádra, kde vytváří heterodimer, který se následně váže na specifickou oblast DNA (dioxin responsivní element = DRE s jadernou sekvencí 5'-TNGCGTG-3'). Za pomoci příslušných koaktivátorů a transkripčních faktorů, dochází ke spuštění transkripce a exprese CYP1A. Po splnění funkce v jádře je AhR transportován z jádra do cytosolu [47, 48].

AhR se neúčastní pouze regulace exprese genů účastnících se metabolismu xenobiotik, ale podílí se také na regulaci buněčného růstu a proliferaci. Dlouhodobá aktivace AhR tak může přispívat ke karcinogenezi [46].

Bylo identifikováno značné množství sloučenin, které inhibují cytochromy P450. Přestože jsou známé inhibitory s využitím pro různé cytochromy P450, velké množství je

selektivních jen pro jeden typ tohoto enzymu. Z kroků katalytického cyklu cytochromu P450 jsou označeny jen tři, které podléhají inhibici:

- 1.) navázání substrátu
- 2.) navázání molekuly kyslíku na „ferro“ formu tohoto enzymu
- 3.) katalytický krok, z kterého je aktivovaný kyslík přenesen z atomu hemového železa na substrát

Vývoj inhibitorů cytochromu P450 a také pochopení mechanismu účinku různých typů inhibitorů značně vzrostl za posledních několik let a přinesl tak důležité poznatky pro rozvoj vysoce selektivních inhibitorů cytochromu P450. Tyto inhibitory jsou důležité nejen pro studium struktury, mechanismu působení a biologické role specifických cytochromů P450, ale i díky jejich potenciálu působit jako modulátory aktivity cytochromů P450. Vzhledem k tomu, že tyto enzymy hrají hlavní roli v metabolické aktivaci a detoxikaci různých chemických karcinogenů a dalších toxinů, vývoj inhibitorů, které mohou být použity k selektivní inaktivaci cytochromů P450 s cílem posunout rovnováhu mezi různými metabolickými cestami tak, aby aktivace byla minimalizována a naopak aby docházelo ke zvýšení detoxikace, by bylo velmi přínosné.

1.2. Biotransformace xenobiotik

Lidský organismus je vystaven účinku velkého množství cizorodých chemických látek (xenobiotik). Do organismu se dostávají např. s přijímanou potravou, inhalací nebo pokožkou, pomocí krevního řečiště jsou rozváděny do jednotlivých orgánů, tkání až nakonec do buněk. Způsob, jakým se xenobiotika dostávají do těla, závisí také na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech, ke kterým například patří rozpustnost ve vodě a tucích, těkavost (u kapalin) a reaktivita [3].

Za biotransformaci cizorodých látek jsou označovány procesy, které by měly vést k jejich snadnému vyloučení z organismu nebo potlačení jejich působení [8]. Procesy biotransformace můžeme rozdělit na 2 základní cesty: detoxikační, kdy dochází k eliminaci a exkreci z organismu a aktivační, při níž vznikají látky toxičtější než jejich parentální molekuly.

U živočichů dochází k biotransformaci xenobiotik často ve dvou fázích. Během I. fáze, nazývané též derivatizační, dochází buď k zavádění nebo odkrytí skupin (-COOH, -OH, -NH₂), které jsou poté schopny konjugace s polárními endogenními sloučeninami.

V první fázi biotransformace jsou látky strukturně přeměňovány na látky více polární pomocí oxidace (epoxidace, aromatická a alifatická hydroxylace, dealkylace, N-oxidace, oxidativní deaminace), redukce (reduktivní dehalogenace, nitroredukce, azoredukce) a hydrolytickými reakcemi [36].

V I. fázi tedy dochází ke zvýšení polaritě xenobiotik, a tím i k jejich rozpustnosti ve vodě a možnosti dalších oxidačních reakcí. Rozpustnost polárních sloučenin ve vodě má velký význam při vylučování látek z organismu, exkrece nejčastěji probíhá močí a žlučí [33]. Nejvýznamnějším enzymem I. fáze je mikrosomální systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO) obsahující cytochrom P450 (viz kap. 1.1.2.). Mezi další enzymy první fáze patří flavinové monooxygenasy, alkoholdehydrogenasy, aldehyddehydrogenasy, karbonylreduktasy, peroxidasy, xanthinoxidasy, karboxylesterasy, aj. [3].

Ve II. fázi (konjugační) dochází ke konjugaci polarizovaných molekul s endogenními látkami (kyselina glukuronová, glycin, taurin, aktivní sulfát, glutation, cystein, aktivní acetát atd.) [32] za vzniku konjugátu, který je dostatečně polární a může být vyloučen z organismu. Většina konjugačních reakcí je katalyzována enzymy ze třídy transferas. Občas dochází vlivem bakteriální hydrolyzy konjugátu ke zpětné resorpci toxické látky enterohepatálním oběhem.

Přestože reakce fáze I a fáze II obvykle vedou k detoxikaci xenobiotik, mohou v těchto reakcích vznikat reaktivní intermediáty, které se díky své vysoké elektrofilitě váží jak na DNA, tak na proteiny, a mohou být silnými mutageny a karcinogeny [34]. Tak je tomu např. u konjugátů se sulfátem vznikajících z *N*-hydroxylovaných aromatických aminů účinkem sulfottransferas či *N*-acetyltransferas. Konjugát sulfátu (acetátu) s *N*-hydroxysloučeninami (z první fáze biotransformace) je v kyselém prostředí moči nestabilní a rozpadá se za vzniku nitreniového (event. karboniového) iontu; vzniká tedy elektrofil reagující s DNA a proteiny [32].

1.3. Karcinogeneze

Civilizační choroby se staly ve druhé polovině 20. století obávanou problematikou vyspělých zemí světa. Tyto choroby jsou úzce spjaty s životním stylem i životním prostředím, ale také s genetickou zátěží populace. Lidskou populaci nejvíce ohrožují kardiovaskulární onemocnění, na druhé místo se řadí rakovina.

Podle současných poznatků je karcinogeneze postupný mnohastupňový proces, při němž dochází ke kumulaci poruch (mutací aj.) určitých genů, vedoucích k porušení normální funkce jimi kódovaných proteinů podílejících se zejména na regulaci dělení a diferenciaci buňky a stabilitě genomu.

Při vzniku zhoubných nádorů se uplatňují různé vnitřní i vnější faktory. Mezi endogenní faktory patří kromě dědičné dispozice, věk, stav imunitního a hormonálního systému. Mezi hlavní fyzikální faktory zvětšující pravděpodobnost vzniku nádorů patří radioaktivní, kosmické, UV a rentgenové záření; některé druhy velmi jemných pevných částic, např. azbestu nebo sloučenin berylia. Infekční mikroorganismy jako *Helicobacter pylori* jsou zodpovědné za rakovinu žaludku, mezi viry způsobující rakovinu patří Rous sarcoma retrovirus [32, 63].

Proces chemické karcinogeneze sestává ze tří fází: (i) iniciace, procesu vedoucímu k mutaci, který je rychlý a irreverzibilní, ale sám o sobě obvykle nestačí k vývoji nádoru, (ii) promoce, kdy „iniciovaná“ buňka je vystavena působení další látky označované obecně jako promotor, dochází k proliferaci buněk s porušenou diferenciací a buněčnou komunikací, vzniká benigní nádor. Poslední fází je (iii) progres, která lze zjednodušeně přirovnat k fázi iniciační, procesy modifikace buněk jsou razantnější a dochází k naprosto nekontrolovatelnému buněčnému růstu, vzniká maligní nádor, který infiltruje i do sousedních tkání a likviduje je [32].

Možnost maligní přeměny existuje u každé tkáně, avšak frekvence této přeměny je u jednotlivých tkání velmi rozdílná. Každá tkáň má jiné histologické složení, různou intenzitu dělení buněk a metabolismu, odlišné regulační mechanismy, často jiné enzymové systémy nebo izoenzymy (např. u detoxikačních enzymů), a tím i různou schopnost aktivovat nebo vylučovat karcinogenní látky.

Většina exogenních chemických karcinogenů není aktivní ve své původní formě. Ve tkáních jsou přeměňovány oxidačními enzymy, zejména mikrosomálními cytochromy P450, na reaktivní elektrofilní formy schopné reakce s nukleofilními skupinami nukleových kyselin (zejména genomovou DNA) a vytvářet kovalentní adukty.

1.3.1. Karcinogeny

Mezi chemické produkty, které mohou vyvolat rakovinu, patří nejen látky organické, ale též anorganické, některá léčiva, pesticidy, kosmetické přípravky, přísady potravin, průmyslové produkty a odpady.

O karcinogenním potenciálu chemických látek rozhoduje do značné míry jejich chemická struktura.

Z hlediska působení chemických karcinogenů na substrát je možno karcinogeny rozdělit do tří základních skupin:

- 1.) přímo působící karcinogeny, které mohou reagovat se substrátem přímo, bez jakékoliv předchozí metabolické aktivace, a mohou tedy vyvolat rakovinu v její původní formě
- 2.) nepřímo působící karcinogeny, neboli prokarcinogeny, které jsou samy o sobě málo reaktivní, a musí být proto *in vivo* aktivovány, většinou působením enzymatických systémů
- 3.) anorganické karcinogeny, které působí v dýchatelné formě, jako aerosoly (prach, kapénky), převážně dlouhodobým drážděním sliznic.

S karcinogeny se setkáváme nejen u syntetických sloučenin, ale také v přírodě, a některé přírodní látky patří k nejúčinnějším známým karcinogenům. Jde zvláště o produkty některých plísní a bakterií, a dále o produkty rostlinné. Nebezpečné jsou především aflatoxiny, zvláště aflatoxin B₁ [37].

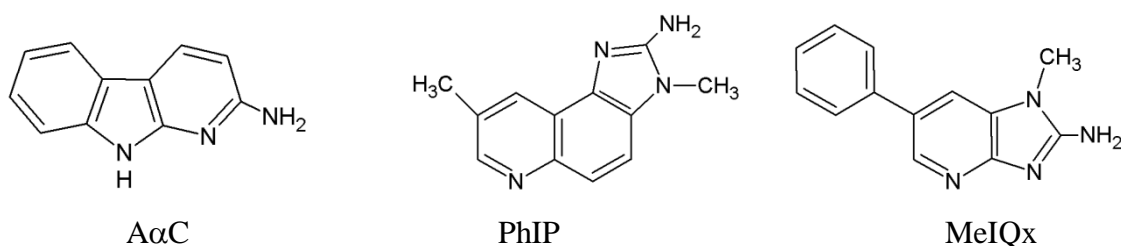
1.3.1.1. Heterocyklické aminy

Heterocyklické aminy jsou skupinou velmi škodlivých látek, které jsou genotoxické a mají karcinogenní a mutagenní schopnosti [21]. Jsou to látky vznikající v potravinách s obsahem dusíkatých komponent (bílkoviny, kreatin/kreatinin) a redukcí cukrů (hexózy) při tepelných úpravách v rozmezí 100 – 800 °C [20].

Tvorba těchto látek probíhá během smažení nebo grilování na povrchu pokrmu. Tyto škodlivé látky jsou přítomny převážně v kůrce a „výpeku“, zatímco vnitřní část vykazuje jen velmi malou mutagenní a karcinogenní aktivitu. Je důležité vědět, že mnoho z heterocyklických aminů je těkavých a jsou obsažena i v parách v průběhu vaření, v kuchyňských výparech byly zjištěny např. AαC, MeIQx a PhIP [16]. Heterocyklické

aminy jsou přítomny i v cigaretovém kouři, z čehož plyne, že jejich příjem se významně zvyšuje u kuřáků [21].

Významnou skupinou heterocyklických aminů jsou *N*-heterocyklické aromatické aminy se třemi cykly, jejichž zástupci, PhIP (2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin), MeIQx (2-amino-3,8 dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxalin a AαC (2-amino-9Hpyrido[2,3-*b*]indol) jsou uvedeny na (**Obr. 4**, str. 11). Jedná se o velmi silné mutageny a karcinogeny [21].



Obr. 4: Vzorce nejvýznamnějších *N*-heterocyklických aromatických aminů.

Důležitým orgánem pro transformaci heterocyklických aminů jsou především játra [14]. Genotoxicita heterocyklických aminů závisí na metabolické aktivaci detoxikačními enzymy, zejména jaterním cytochromem P450 1A2 [21]. Arylnitreniový ion se váže v pozici C8 na guanin DNA, čímž může způsobit mutaci a případně vést ke tvorbě tumoru [17,18].

Důkazem metabolické přeměny většiny těchto látek, je fakt, že vstřebávání heterocyklických aminů u experimentálních zvířat je velice účinná, močí se vyloučí pouze 1 – 2 % [21].

2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP)

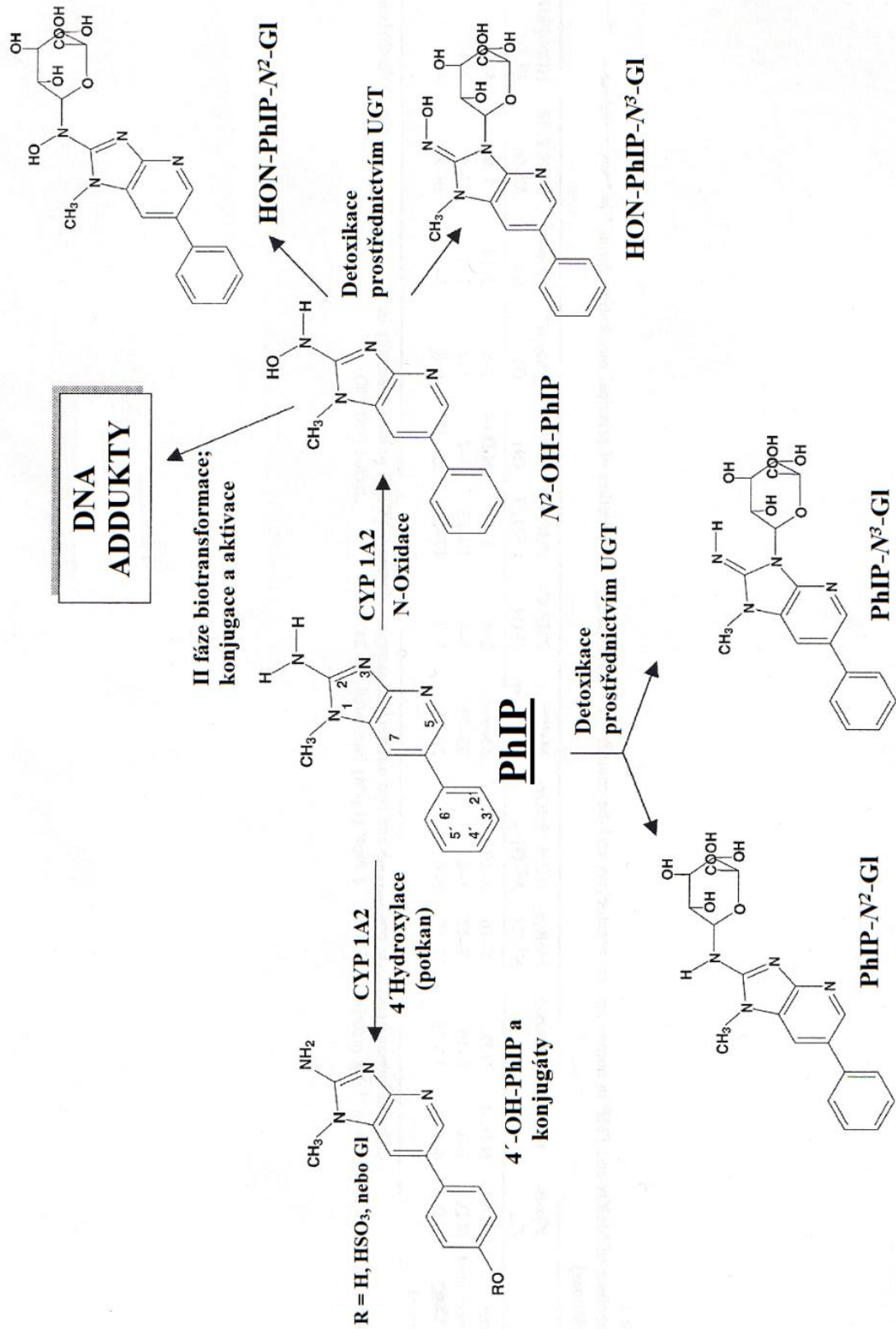
PhIP je nejhojnějším heterocyklickým aminem zjištěným v potravinách. Byl nalezen v tepelně upravených rybách, hovězím, vepřovém, kuřecím a jehněčím masu, ale i ve víně a pivu [18, 24, 25] a také v cigaretovém kouři [15, 18].

Největší koncentrace PhIP byly zjištěny v kuřecím masu, naopak vepřové maso vykazuje nejmenší obsah této nebezpečné látky [18].

V mnoha studiích prováděných na experimentálních zvířatech byla prokázána tvorba PhIP-DNA adduktů ve střevech, srdci a plicích u potkanů [26, 27], v játrech, střevech a v mléčných žlázách u myši [28].

PhIP je metabolizováno převážně cytochromem CYP1A2 na dva hlavní produkty: mutagenní 2-hydroxylamino-PhIP (N^2 -OH-PhIP) a neškodný 4'-hydroxylamino-PhIP (4'-OH-PhIP). Oba produkty mohou být konjugovány enzymy glukuronidasou a sulfotransferasou za produkce nemutagenních sloučenin, které jsou snadno vylučitelné. Na druhou stranu může *N*-hydroxylamino-PhIP být přeměněn *N*-acetyltransferasou nebo sulfotransferasou za vzniku aktivovaných esterů (N^2 -acetoxy-PhIP a N^2 -sulfonyloxy-PhIP). Produkty rozpadu těchto esterů se kovalentně váží na DNA za vzniku N^2 -(2-deoxyguanosin-8-yl)-PhIP, což je hlavní DNA addukt [26, 29].

V metabolismu PhIP byly zaznamenány rozdíly u lidí a potkanů. [30]. U potkanů převážně dochází k 4'-hydroxylaci následovanou konjugační II. fází. Tvorba mutagenního 2-hydroxylamino-PhIP (N^2 -OH-PhIP) se ukazuje být spíše minoritní metabolickou reakcí [31]. Avšak u lidí je tomu naopak, tvorba mutagenního 2-hydroxylamino-PhIP (N^2 -OH-PhIP) a následná glukuronidace je v tomto případě hlavní metabolickou cestou PhIP [30, 31].



Obr. 5: Hlavní biotransformační dráhy PhIP v lidských a potkaních hepatocytech. Převzato a upraveno z [31]

1.4. Chemoprevence

Chemoprevencí rozumíme použití farmakologických prostředků nebo přirozených látek k inhibici jak aktivace karcinogenů, tak již započatého karcinogenního procesu. Vznik mutací, které jsou příčinou karcinogeneze lze předpokládat u každého jedince, mohou vznikat jak z endogenních příčin (např. poškozením DNA účinkem kyslíkových radikálů produkovaných makrofágy či neutrofily), tak exogenními vlivy (virové infekce, záření, chemické karcinogeny). Organismus je schopen vlastními obrannými mechanismy tento proces zastavit a poškození opravit, ale v případě, že se tak nestane, vyvíjejí se postupně změny, které mohou být s různým časovým odstupem příčinou vzniku invazivního nádoru. Chemoprevence má tedy omezit rozvoj zmíněných poruch a zabránit vzniku zhoubných nádorů.

Chemoprevence může být rozdělena do tří strategií: *primární prevence* je cílena na zdravé jedince, kteří jsou však rizikovými skupinami, např. kuřáci. Tato prevence zahrnuje jak úpravu životního stylu (více pohybu, méně stresu, alkoholu a nikotinu), tak i úpravu stravovacích návyků (pravidelnost stravy, úprava stravy). *Sekundární prevenci* chápeme jako včasnou diagnostiku onemocnění ve stádiu, kdy je ještě léčitelné. *Terciární prevence* znamená sledování pacienta, který již tuto nemoc prodělal s cílem zamezit vývoji sekundárního vzniku tumoru nebo opětovnému výskytu [61, 62].

Velmi důležitá je prevence tj. snižování vzniku rakoviny v časných fázích tohoto procesu. Existuje mnoho studií pojednávajících o možném snížení rizika rakoviny souvisejících s konzumací určitého druhu ovoce a zeleniny, [63] kromě toho, i potrava s vysokým obsahem vlákniny, je dávana do souvislosti se sníženou incidencí rakoviny, především rakoviny tlustého střeva [64].

Chemopreventivní potenciál fytochemikálií je dán kombinací jejich účinků, jako jsou účinky antioxidantní, protizánětlivé, podporující imunitu a antihormonální. Na základě epidemiologických a experimentálních studií lze sestavit výčet látek, které mohou být chemopreventivní, patří mezi ně např.: vitaminy, fenolické a flavonoidní látky, isothiokyanáty, kurkuminy, mastné kyseliny a terpenoidy [65].

1.4.1. Flavonoidy

Flavonoidy jsou součástí rodiny přírodních fenolických sloučenin. Reprezentují jednu z nejrozšířenějších tříd látek vyskytujících se v zelenině, ořechách, ovoci a nápojích jako je káva, čaj a červené víno [49], stejně tak jsou obsaženy v bylinách (*Silybum marianum*, *Alpina officinarum*, *Hypericum perforatum*) [50]. Bylo identifikováno více než 8000 látek flavonoidní struktury [51].

Přírodní flavonoidy se vyskytují většinou v podobě glykosidů (rhamnoglukosidy, rutinosidy), ale jejich struktura může být mnohem komplexnější (flavonolignany – silybin). Na základě jejich struktury jsou flavonoidy klasifikovány do 8 skupin: flavonoly, flavany, flavanony, katechiny, anthokyany, isoflavony, dihydroxyflavonoly a chalkony.

Sloučeniny flavonoidní struktury patří mezi rostlinné pigmenty a vůně, kromě toho, hrají také důležitou roli v růstu a vývoji rostlin, v obraně proti mikroorganismům a škůdcům. Jejich antioxidační aktivita může plnit ochranou funkci proti oxidativnímu stresu.

Flavonoidy jsou navrženy jako chemopreventivní látky pro snižování výskytu srdečních a jaterních onemocnění, jakož i některých typů rakoviny. Vedle přímého antioxidačního efektu a vylučování reaktivních intermediátů, jsou některé flavonoidy schopné chelatovat bivalentní kovy (Fe, Cu), které jsou nedostupné pro redoxní reakce. Ve vztahu k člověku jsou flavonoidy všeobecně považovány za prospěšné látky. Studie prováděné v podmínkách *in vitro* a *in vivo* prokázaly širokou škálu fyziologických a biologických účinků těchto látek, jako antioxidační, antibakteriální, antizánětlivé, antialergenní, antimutagenní, antikarcinogenní, antivirové vlastnosti [58]. Nicméně, ne všechny flavonoidy působí vždy prospěšně. Některé flavonoidy mají mutagenní a prooxidační efekty a mohou také zasahovat do metabolismu endogenních sloučenin.

Protinádorová aktivita flavonoidů je připisována jejich schopnosti inhibovat topoisomerasu I a II [52, 53]. Dále jsou schopny zpomalit buněčnou proliferaci jako následek jejich vazby na estrogenní receptor. Flavonoidy blokuje nebo potlačují vícestupňovou karcinogenezi, která je iniciována přeměnou normální buňky na mutagenní. Tyto buňky podstupují promoci a začínají se měnit na nádorové buňky, které se vyvíjí v buňky maligní. Flavonoidy mohou zasahovat různými kroky do tohoto procesu. Některé flavonoidy (například kaemferol, diosmetin, theaflavin a biochanin A) mohou inhibovat metabolickou aktivaci prekarcinogenů prostřednictvím enzymů I. fáze (především

cytochromů P450), nebo jejich následnou interakcí s DNA. Z tohoto důvodu tyto látky blokují iniciaci karcinogeneze. Nebo potravní flavonoidy (například naringenin, quercetin, biochanin A a prenylchalkon) mohou stimulovat detoxifikaci karcinogenů a prostřednictvím enzymů II. fáze, vedoucí k jejich eliminaci ven z těla.

1.4.1.1. **Metabolismus flavonoidů**

Metabolismus flavonoidů u lidí, stejně jako u experimentálních zvířat není zcela objasněn. U flavonoidů získaných požitím ovoce nebo zeleniny se očekává, že jsou nejprve metabolizovány ve střevě střevní mikroflórou, kde jsou flavonoidní glykosidy často štěpeny na volné flavonoidy (aglycony) a oba typy, jak glykosidy tak aglykony jsou absorbovány [49]. Druhým důležitým místem transformace flavonoidů jsou játra, tkáň bohaté na enzymy I a II fáze. Flavonoidy jsou postupně hydroxylovány a *O*-demetylovány cytochromy P450, poté jsou konjugovány enzymy II fáze [54].

1.4.1.2. **Flavonoidy a cytochromy P450**

Mezi proteiny interagujících s flavonoidy patří cytochromy P450. Některé flavonoidy jsou schopné regulovat systém cytochromů P450. Druh aktivity, stimulační či inhibiční závisí na struktuře těchto flavonoidních látek. Inhibice genové exprese enzymy CYP1A blokováním AhR hraje důležitou roli v jejich chemopreventivních vlastnostech. Např. quercetin, jeden z nejběžněji se vyskytujících flavonoidů, se váže jako antagonist na AhR a následně inhibuje CYP1A1 mRNA transkripci a proteinovou expresi indukovanou B(a)P [55].

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo studovat důsledky podání flavonoidního induktoru, β -naftoflavonu, a karcinogenu PhIP na systém cytochromu P450 a aktivaci tohoto karcinogenu v systémech *in vivo* a *in vitro*.

Při řešení uvedené problematiky bylo nutné splnit následující úkoly:

- vyhodnotit příslušné účinky chemopreventivní látky na expresi a specifické aktivity cytochromů P450 v různých časových intervalech
- provést sekvenční podání nejprve chemopreventivní látky a po uplynutí určité doby také karcinogenu gaváží do žaludku laboratorních potkanů
- charakterizovat povahu účinku karcinogenu PhIP na cytochromy P450 *in vitro* a posoudit jeho vliv v různých časových intervalech
- provést studium přídavku NADPH na metabolickou aktivaci karcinogenu cytochromy P450

3. MATERIÁLY A METODY

3.1. Materiály

3.1.1. Chemikálie

Fluka, Švýcarsko

dodecylsulfát sodný (SDS), 2-merkptoethanol, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), tris(hydroxymethyl) aminomethan (TRIS), methanol, α -tocoferol

Linde, Česká republika

suchý led

Millipore Corp., USA

Immobilon-P přenosová membrána

Perkin Elmer, USA

96-jamková destička pro fluorescenční měření

PML a.s., Česká republika

Laktino – odtučněné sušené mléko

Serva, Německo

akrylamid, N,N'-methylenbisakrylamid (BIS), N,N,N',N-tetramethylethylendiamin (TEMED), Triton X-100, sodium dodecyl sulfát (SDS)

Setuza a.s., Česká republika

Vegetol-slunečnicový olej

Sevapharma, a.s, Česká republika

hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma-Aldrich, USA

β -naftoflavon, 7-ethoxyresorufin, resorufin, dimethyl sulfoxid (DMSO), nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH), 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), sekundární králičí IgY protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatasou, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát/nitro blue tetrazoliové tablety (BCIP/NBT)

Toronto Research Chemicals, Inc., Canada

2-amino-1-methyl-6-fenyl-imidazo[4,5-b]pyridin (PhIP)

Velaz s.r.o., Koleč u Kladna, Česká republika

samčí potkani Wistar (140-150 g)

Whatman, USA

Whatman papír, No.3

Protilátky proti CYP1A1 a CYP1A2 byly připraveny prof. RNDr. Petrem Hodkem, CSc., Přírodovědecká fakulta, Karlova Univerzita v Praze, Česká republika

Všechny ostatní chemikálie byly nakoupeny od firmy Lachema Brno, Česká republika

3.1.2. Přístroje**Analytické váhy**

PESA 40SM-200, Švýcarsko

Automatické mikropipety

BioHit, Finsko; Nichiryo, Japonsko

Blotovací systém

Whatman Biometra ® Fastblot B 43, USA

Centrifugy

Sanyo Microcentur MSE, Velká Británie; Janetzki K23, Německo; Janetzki K24, Německo; Beckman Coulter – Optima™ LE-80K Ultracentrifuga, USA

Elektroforetická aparatura

Amersham Biosciences Hoefer™ miniVE, USA

Laboratorní váhy

KERN EW600-2M, Německo

Luminiscenční spektrofotometr

PerkinElmer LS55, USA

Prosávací aparatura pro vyvolání proteinů

SNAP i.d. Millipore Corp., USA

Spektrofotometr

SpektroMOM 195 D, Maďarsko

Vodní purifikační systém

Simplicity 185 Millipore Corp., USA

3.1.3. Programy

FL WinLab: PerkinElmer, USA

Microsoft Office Excel 2007: Microsoft (Redmond, USA)

3.1.4. Ostatní

pH metr ATI Orion 370, USA; sonikátor Elma E 30H-P-LAB, Německo; vortex MS 1 Minishaker, Německo; vodní lázeň Julabo TW 8, Německo; třepačka Yellowline, Německo; magnetické míchačky HM 2A, Laboratorní přístroje Praha

3.2. Metody

3.2.1. Premedikace

Pokusy byly prováděny na mladých samcích laboratorního potkana kmene Wistar (~150 g, Velaz, Česká republika), kteří byli umístěni v Centru pro experimentální biomodely v Praze, v souladu s vyhláškou č. 39/2009 Sb. Potkani byli nejdříve aklimatizováni po dobu 5 dnů, chováni v drátěných klecích při 22°C a za 12 hodinovém střídání světla a tmy. Potkanům byla podávána *ad libitum* ST-1 - kompletní krmná směs od firmy Velaz, měli též přístup k pitné vodě.

- **I. Režim:** β -naphthoflavon byl podáván *p.o.* v jedné dávce 60 mg/kg tělesné hmotnosti rozpuštěný ve slunečnicovém oleji (1 ml). Premedikovaní potkani byli usmrceni 24, 48 a 72 h po podání výše uvedené flavonoidní látky. Kontrolní skupina byla premedikována pouze slunečnicovým olejem (1 ml).
- **II. Režim:** β -naphthoflavon byl podáván *p.o.* v dávce 60 mg/kg tělesné hmotnosti a po uplynutí 72h od podání byla potkanům podána další látka, a to PhIP ve dvou koncentracích (50 a 150 mg/kg tělesné hmotnosti). PhIP v těchto koncentracích bylo též podáno samostatně bez β -naphthoflavonu. Potkani byli usmrceni 24h po premedikaci.

3.2.2. Izolace tkáně

Roztoky:

pufr P ₁ :	0,15 M KCl
	0,05 M Tris/HCl (pH 7,4)
	50 μ M tokoferol (přidáno těsně před použitím)
pufr P ₂ :	0,1 M Na ₄ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O (pH 7,2)

pufir P₃: 0,15 M KCl
 0,05 M Tris (pH 7,4)
 20% (v/v) glycerol

Postup:

Mikrosomální frakce byly připravené z potkaních jater použitím diferenční centrifugace podle způsobu van der Hoevena a Coona [67].

Před použitím byly pufrы umístěny do chladu a následující postupy byly prováděny při teplotě 4°C.

Zmražená jaterní tkáň vyjmutá z 80°C mrazicího boxu byla nejdříve zvážena, následně opláchnuta a pomocí nůžek rozstříhána na co nejmenší kousky. Takto připravená tkáň byla homogenizována v pufru P₁ o objemu odpovídajícím čtyřnásobku hmotnosti jaterní tkáně ve skleněném Potter-Elvehjem homogenizátoru. Výsledný homogenát byl přelit do kyvet a centrifugován po dobu 10 minut při teplotě 0-5°C (centrifuga Janetzki K-23, výkyvný rotor 4x70 ml, 2000 RPM).

Získané supernatanty byly odděleny do kádinky a sedimenty byly rehomogenizovány v pufru P₁ v objemu rovnajícím se 1/4 hmotnosti původní tkáně. Rehomogenáty byly centrifugovány za stejných podmínek jako v předchozím případě. Oba supernatanty byly následně sloučeny a centrifugovány 20 minut při teplotě 0-5°C (centrifuga Janetzki K-24, úhlový rotor 6x35 ml, 13 500 RPM). Výsledné supernatanty byly opatrně separovány od pelety a ultracentrifugovány po dobu 90 minut při 4°C (ultracentrifuga Beckman, úhlový rotor Ti45, 6x64 ml, 35 000 RPM).

V následujícím kroku byly pelety resuspendovány, dále homogenizovány v pufru P₂ v dvojnásobku objemu hmotnosti původní tkáně a ultracentrifugovány 90 minut při teplotě 4°C (ultracentrifuga Beckman, úhlový rotor Ti70, 8x64 ml, 60 000 RPM).

Získané supernatanty byly odstraněny a pelety resuspendovány v pufru P₃ o objemu odpovídajícímu 1/5 hmotnosti původní tkáně. Mikrosomální vzorky byly rozpipetovány do mikrozkušavek dle Eppendorfa, okamžitě umístěny na led a následně skladovány při -80°C v hlubokomrazicím boxu.

3.2.3. Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů v mikrosomech byla určována metodou podle Smithe a spol. [68]. V této metodě je využívána schopnost postranních skupin některých aminokyselin

(cystein, tryptofan a tyrosin) redukovat Cu^{2+} na Cu^+ . Měďné ionty jsou následně chelátovány 4,4'-dikaboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou (BCA) za vzniku modrofialového komplexu, který se dá stanovit spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci proteinu v roztoku.

Roztoky:

Činidlo A: 2% (w/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 0,95% (w/v) NaHCO_3
 0,16% (w/v) vínan sodný
 0,4% (w/v) NaOH
 1% (w/v) sodná sůl BCA

Činidlo B: 4% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Postup:

Činidlo potřebné pro stanovení proteinů bylo připraveno smícháním činidla A a činidla B v poměru 49:1. Pro měření vzorků a pro sestavení kalibrační křivky byly použity sterilní mikrozkuřavky dle Eppendorfa (1,5 ml). Standardy pro sestavení kalibrační křivky byly připraveny naředěním roztoku hovězího sériového albuminu (1 mg/ml) na koncentrace 2, 4, 6, 8, 10 a 20 $\mu\text{g/ml}$ na celkový objem 0,5 ml. Referentní vzorek byl připraven smícháním 20 μl destilované vody s 480 μl činidla.

Jaterní mikrosomy byly naředěny destilovanou vodou v poměru 1:49 a 10 μl tohoto roztoku bylo přidáno k 490 μl činidla. Standardy byly stanovovány v dubletech a vzorky s neznámými koncentracemi v tripletech. Všechny připravené standardy, vzorky a referentní vzorky byly promíchány na vortexu a inkubovány 60 min při teplotě 60 °C ve vodní lázni (inkubátoru Julambo TW8). Po inkubaci byla změřena absorbance standardů a vzorků při 562 nm proti referentnímu vzorku (spektrofotometr SpectroMOM 195 D, optická dráha 1 cm). Kalibrační křivka byla sestavena na základě naměřených hodnot standardů. Z regresní rovnice kalibrační křivky byly vypočítány koncentrace proteinů a vynásobeny použitým ředěním.

3.2.4. Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Roztoky:

Pufir A:	0,375 M Tris/HCl (pH 8,8) 0,1% (w/v) SDS
Polymerizační roztok A:	30% (w/v) akrylamid 0,8% (w/v) BIS
Pufir B:	0,125 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,1% (w/v) SDS 0,0006% (w/v) bromfenolová modř
Polymerizační roztok B:	30% (w/v) akrylamid 0,8% (w/v) BIS
Vzorkový pufir	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8) 8% (w/v) SDS 20% (v/v) 2-merkptoethanol 40% (v/v) glycerol 0,004% (w/v) bromfenolová modř
Elektrodový pufir:	0,192 M glycin 0,025 M Tris/HCl (pH 8,3) 0,1% (w/v) SDS
Pro 2 gely:	
Separáční gel (8%):	11 ml pufir A 4 ml polymerizační roztok A 15 µl TEMED 150 µl 10% (w/v) APS

Zaostřovací gel (3%): 4,5 ml pufr B
 0,5 ml polymerizační roztok B
 5 µl TEMED
 100 µl 10% (w/v) APS

Sigma Colour Burst™ Electrophoresis Marker (M.W. 8.000 – 220.000) (**Obr.7**, str.25)



Obr. 7: Sigma Colour Burst™ Electrophoresis Marker

Postup:

Roztok pro přípravu separačního gelu byl aplikován mezi sestavená skla (10 x 10,5 cm), gel byl okamžitě převrztven destilovanou vodou a ponechán tuhnout po dobu 30 minut. Po ztuhnutí gelu byla destilovaná voda vylita, volný prostor následně vysušen kouskem filtračního papíru. Následně byl až po okraj skel nalit zaostřovací gel, do kterého byl vnořen hřeben pro vzorkové jamky. Po zpolymerování (15 minut) byl hřeben vyjmut a horní elektrodový prostor byl vyplněn elektrodovým pufrům.

Vzorky byly naředěny milliporovanou vodou na konečnou koncentraci 1mg/ml a následně smíchány se vzorkovým pufrům v poměru 3:1, denaturovány asi pětiminutovým varem na vodní lázni.

Vzorky (25 µl) a standard (5 µl) byly naneseny na gel za použití Hamiltonovy stříkačky.

Skleněné desky s gelem byly umístěny do elektroforetické vany a spodní prostor byl vyplněn elektrodovým pufrům. Elektroforesa probíhala ve vertikálním uspořádání nejdříve

30 min při napětí 80 V, které bylo pak změněno na hodnotu 150 V. Elektroforesa byla ukončena, když čelo s bromfenolovou modří dorazilo ke spodnímu okraji separačního gelu. Detekce proteinů byla provedena přenosem na PVDF membránu a následnou imunodetekcí.

3.2.5. Metoda elektropřenosu proteinů na PVDF membránu (Western blot)

Roztoky:

Přenosový pufr:	0,192 M glycin 0,025 M Tris-HCl upraveno na pH 8,3
PBS Triton X-100:	0,134 M NaCl 2,7 mM KCl 1,8 mM Na ₂ HPO ₄ ·10H ₂ O 1 mM NaH ₂ PO ₄ upraveno na pH 7,2 0,3% (w/v) Triton X-100

Blokovací roztok: 5% (w/v) odtučněné sušené mléko v PBS Triton X-100

Postup:

Gel z ukončené elektroforézy byl za 30 minut inkubován s přenosovým pufrem. Mezitím byla nastříhána PVDF membrána na velikost získaného gelu, poté byla ponořena do methanolu 10 sekund z každé strany, následně přenesena do destilované vody a nakonec do přenosového pufru.

První tři filtračními papíry Whatman, byly ponořeny do přenosového pufru a položeny na anodu blotovacího přístroje, následovala PVDF membrána, gel a opět tři filtrační papíry Whatman. Případné vzduchové bubliny byly odstraněny válcováním skleněnou tyčinkou a poté byla přiložena katoda blotovacího přístroje. Celkový proud byl nastaven na základě plochy membrán, 3.5 mA/cm² po dobu 45 minut.

Po ukončení přenosu byla PVDF membrána přemístěna do 5% roztoku odtučněného sušeného mléka, kde byla blokována přes noc při 4°C, aby se zabránilo pozdější nespecifické vazbě proteinů.

Další den byla membrána inkubována 2 hodiny za třepání se specifickou primární slepičí protilátkou proti CYP1A1 a CYP1A2 o koncentraci 30 µg/ml v blokovacím roztoku. Následovalo důkladné promývání v blotovacím roztoku opakované celkem 3x. Inkubace se sekundární protilátkou byla prováděna na přístroji SNAP i.d.. Membrána byla přiložena proteiny na jamky, uválcována a následně byl přiložen spacer, aparatura byla promývána 3x PBS Triton X-100 při zapnuté vývěvě. Poté byla membrána inkubována se sekundární králičí IgY protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfátasou (ředěna 1: 1 500 blokovacím roztokem), bez vývěvy po dobu 10 minut. Poté byl do jamky nalit PBS Triton X-100 a následovalo promývání při zapnuté vývěvě, opět 3x.

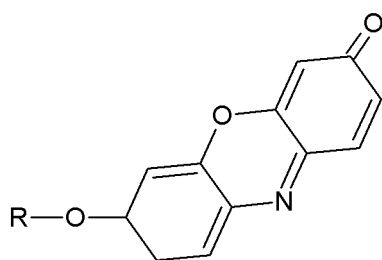
Membrána byla umístěna do destilované vody. Posledním krokem bylo vyvolání, proteinové zóny rozpoznané primární protilátkou byly vizualizovány pomocí BCIP / NTB tablety obsahující 10 mg substrátu pro alkalickou fosfátasu. Reakce byla zastavena přenesením membrány do destilované vody. Membrána byla poté vysušena mezi filtračními papíry.

3.2.6. Stanovení enzymové aktivity 7-ethoxyresorufin-O-deethylasy (EROD)

Cytochromy P450 rodiny CYP1 především 1A1 jsou hlavními enzymy, které katalyzují *O*-deethylaci

7-ethoxyresorufinu na resorufin, který vykazuje fluorescenci.

Fluorescence byla měřena na luminiscenčním spektrometru PerkinElmer LS-55 vybaveným 96 jamkovou mikrotitrační destičkou, excitační a emisní vlnové délky odpovídaly hodnotám 530 a 585 nm. Měření bylo prováděno na základě modifikace metody popsané Burekm a Mayerem (1974) [69].



Sloučenina	R
Resorufin	H
7-ethoxyresorufin	C ₂ H ₅

Obr. 8: Struktura resorufinu a 7-ethoxyresorufinu

Roztoky:

Ředící pufr:	0,1 M KH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
Roztok resorufinu:	10 μM resorufin v methanolu
Substrát:	0,2 mM 7-ethoxyresorufin DMSO
Kofaktor:	5 mM NADPH

Postup:

Standardy pro kalibrační křivku byly připraveny ředěním zásobního roztoku resorufinu ředícím pufrém na konečné koncentrace 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 and 0,4 μM. Referentní vzorek obsahoval jen ředící pufr, všechny standardy a referentní vzorek byly promíchány na vortexu.

Vzorky byly připraveny naředěním mikrosomální frakce pufrém na finální koncentraci proteinů 0,05 mg/ml. Specifický substrát (7-ethoxyresorufin) byl přidán k roztokům vzorků, tak aby jeho konečná koncentrace byla 2,2 μM. Takto připravené směsi byly preinkubovány po dobu 3 minut. Poté bylo z každé směsi odebráno 150 μl a přeneseno do jamek mikrotitrační destičky, reakce byla iniciována přidáním 17 μl NADPH.

Fluorescence byla měřena okamžitě po přidání NADPH v deseti 60 sekundových cyklech. Enzymové aktivity byly stanoveny porovnáním se standardy resorufinu a vztaheny na obsah mikrosomálních proteinů ve vzorku.

3.2.7. Vliv PhIP na aktivitu cytochromů P450

3.2.7.1. Studium inhibičního vlivu PhIP na cytochromy P450

Roztoky:

Roztok PhIP: 0,01; 0,1; 1; 10 μ M PhIP v DMSO

Postup:

Do mikrozkušavek dle Eppendorfa bylo odměřeno 495 μ l pufru, dále bylo přidáno za použití Hamiltonovy stříkačky 0,4 μ l mikrosomální jaterní frakce premedikované 48h β -naftoflavonem (0,05 mg/ml), nakonec bylo odměřeno 5 μ l zásobního roztoku 0,01; 0,1; 1 a 10 μ M PhIP. Jako kontrola byl použit roztok stejného složení, s tím rozdílem, že obsahoval místo 5 μ l zásobního roztoku PhIP 5 μ l DMSO. Následně byla změřena deethylační aktivita (viz kap. 3.2.6.).

3.2.7.2. Studium vlivu PhIP na cytochromy P450 v různých časových intervalech

Roztoky:

Roztok PhIP: 1 μ M PhIP v DMSO

Postup:

Do každé ze 2 skleněných lékovek (5 ml) bylo odměřeno 1943 μ l pufru, dále 31 μ l mikrosomální jaterní frakce premedikované 48h β -naftoflavonem (1mg/ml), nakonec bylo přidáno do jedné z lékovek 20 μ l 1 μ M PhIP, do druhé 20 μ l DMSO, tak aby celkový objem reakční směsi činil 2000 μ l. Takto připravené směsi se byly inkubovány 10, 25, 40 a 55 minut při laboratorní teplotě ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) za stálého třepání. Po uplynutí této doby bylo odebráno z reakční směsi 400 μ l pro imunodetekci CYP1A. Pro měření EROD aktivity bylo odebráno do mikrozkušavky dle Eppendorfa 25 μ l a doplněno pufrům do 500 μ l, tak aby výsledná koncentrace proteinů byla 0,05 mg/ml. Následně byla změřena deethylační aktivita (viz kap. 3.2.6.).

3.2.7.3. Studium přídavku NADPH na metabolickou aktivaci PhIP cytochromy P450

Roztoky:

Roztok PhIP: 1 μ M PhIP v DMSO

Systém regenerující NADPH: 10 mM MgCl₂.6H₂O

10 mM glukosa-6-fosfát

1 mM NADP

0,5 U.ml⁻¹ glukosa-6-fosfát dehydrogenasa

Postup:

Do každé ze 2 skleněných lékovek (5 ml) bylo napipetováno 1750 μ l pufru, dále 31 μ l mikrosomální jaterní frakce premedikované 48h β -naftoflavonem (1mg/ml), do jedné z lékovek bylo napipetováno 20 μ l 1 μ M PhIP, do druhé 20 μ l DMSO, nakonec bylo přidáno 200 μ l regenerujícího systému, tak aby celkový objem reakční směsi činil 2000 μ l. Z takto připravené směsi bylo v časech 0, 15, 30 a 45 minut odebráno 400 μ l pro imunodetekci CYP1A. Pro měření EROD aktivity bylo odebráno do mikrozkušavky dle Eppendorfa 25 μ l a doplněno pufrům do 500 μ l, tak aby výsledná koncentrace proteinů byla 0,05 mg/ml. Specifický substrát 7-ethoxyresorufin (5,72 μ l zásobního roztoku) byl přidán k zředěnému vzorku a poté bylo bez inkubace 3 x 150 μ l do jamek mikrotitrační destičky, do dvou ze tří jamek bylo ještě přidáno 2 μ l zásobního roztoku NADPH. Fluorescence byla měřena okamžitě po přidání NADPH v šesti 100 sekundových cyklech.

4. VÝSLEDKY

4.1. Izolace a stanovení proteinů

Mikrosomální frakce (MS) byly izolovány z jater potkanů Wistar po premedikaci chemopreventivní látky β -naftoflavonu nebo karcinogenu PhIP. Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno použitím BCA metody (viz kap. 3.2.3). Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 1 a 2.

Tab. 1:

Jaterní MS frakce	c_{proteinu} [mg/ml]
β -naftoflavon 24h	33,8
β -naftoflavon 48h	65,1
β -naftoflavon 72h	60,5

c_{proteinu} – koncentrace proteinů

Tab. 2:

Jaterní MS frakce	c_{proteinu} [mg/ml]
PhIP1	38,8
PhIP2	48,3
β NF+PhIP1	39,1
β NF+PhIP2	28,1

c_{proteinu} – koncentrace proteinů, β NF - β -naftoflavon,

PhIP1 = 50 mg/kg, PhIP2 = 150 mg/kg

4.2. Vyhodnocení indukce cytochromu P450

Indukční efekt testovaných látek byl zjišťován pomocí imunochemické detekce cytochromů P450 na proteinové úrovni, dále bylo prováděno měření specifické aktivity cytochromu P450.

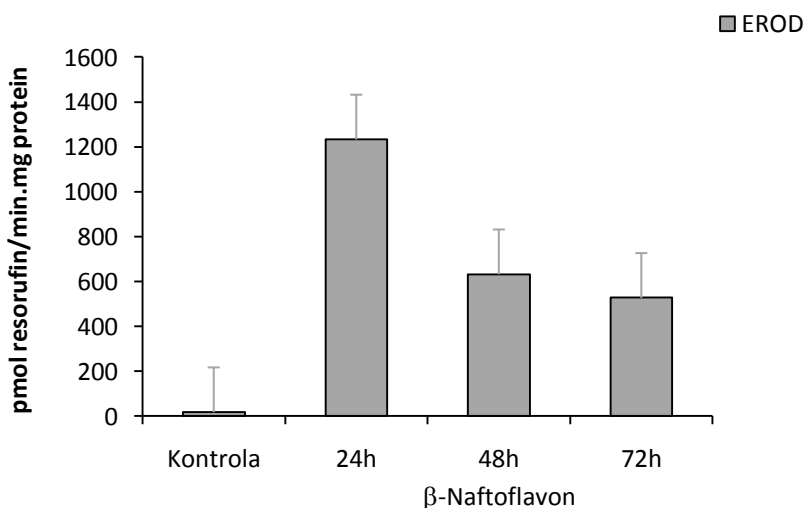
Imunochemická analýza byla provedena za účelem zjištění CYP1A1/2 proteinové exprese. Výskyt izoform CYP1A1 a CYP1A2 v jaterních mikrosomálních frakcích byl prováděn za použití Western Blotu (viz kap. 3.2.5.).

Stanovení aktivity 7-ethoxyresorufin-O-deethylasa (EROD) bylo použito pro získání údajů o indukci CYP1A. Tyto enzymy katalyzují deethylaci substrátu 7-ethoxyresorufinu na fluorescenční produkt, resorufin. Enzymové aktivity byly stanoveny porovnáním se standardy resorufinu a přepočítány na obsah mikrosomálních proteinů ve vzorku (viz kap. 3.2.6).

4.2.1. Indukční efekt jednorázového podání chemopreventivní látky

Pro přiblížení, co možná nejreálnější situaci běžného života, kdy přijímáme v potravě i chemopreventivní látky, byl proveden pokus jednorázového podání β -naftoflavonu *p.o.* za účelem zjištění indukční schopnosti. Příslušné specifické aktivity CYP byly hodnoceny v játrech potkana 24, 48 a 72 hodin od *p.o.* podání β -naftoflavonu.

Výsledkem tohoto pokusu bylo zjištění silné indukce CYP1A1 po 24h premedikaci β -naftoflavonu (**Obr. 9**, str. 32). Výsledek byl získán ve spolupráci s RNDr. Jitkou Koblihovou, Ph.D.

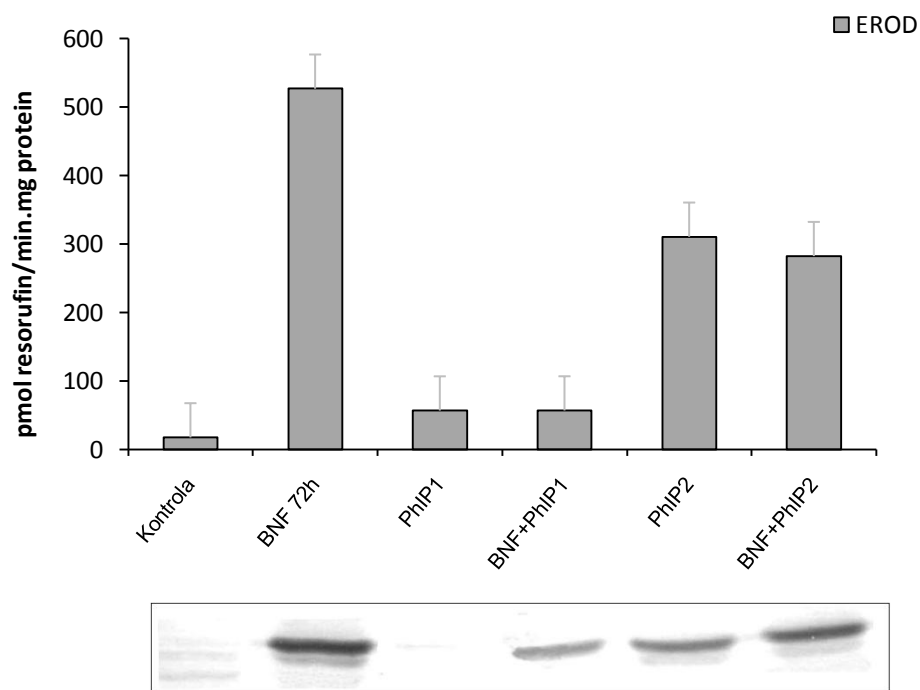


Obr. 9: Vliv β -naftoflavonu v játrech v různých časových intervalech po podání. EROD aktivita byla stanovena v jaterních mikrosomech z potkana 24, 48 a 72 hodin od jednorázového *p.o.* podání β -naftoflavonu. Graf reprezentuje průměrné hodnoty ze tří nezávislých měření, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

4.2.2. Sekvenční podání

V tomto experimentu byl induktor, tedy β -naftoflavon a karcinogen podávány postupně. Jako karcinogenní látky bylo použito PhIP, který reprezentuje potravní karcinogen. PhIP byl podáván ve dvou dávkách, nižší představovala 50 mg/kg tělesné hmotnosti, vyšší 150 mg/kg tělesné hmotnosti, byl podáván buď samostatně nebo po 72h od podání induktora β -naftoflavonu.

Obr. 10 (str. 33) znázorňuje, že v játrech nemá β -naftoflavon žádný účinek na změnu EROD aktivity v kombinaci s oběma koncentracemi PhIP – PhIP1 (50 mg/kg tělesné hmotnosti) a PhIP2 (150 mg/kg tělesné hmotnosti). Na druhou stranu imunodetekce CYP1A1/2 ukazuje, že podání β -naftoflavonu způsobuje slabý nárůst CYP1A1/2 exprese v obou případech podání PhIP (50mg/kg i 150mg/kg tělesné hmotnosti). Výsledky byly získány ve spolupráci s RNDr. Jitkou Koblihovou, Ph.D.



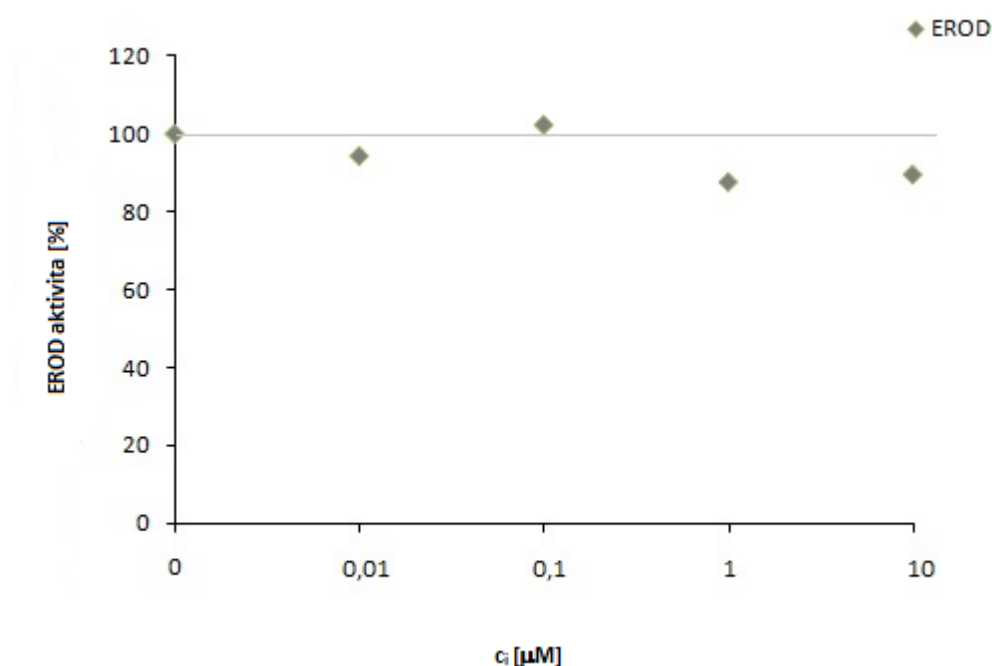
Obr. 10: EROD aktivita v játrech. Mikrosomy byly izolovány z potkaních jater po vystavení β -naftoflavonu (BNF 72h) a/nebo karcinogenu PhIP (PhIP1 – 50 mg/kg tělesné hmotnosti; PhIP2 – 150 mg/kg tělesné hmotnosti). Graf reprezentuje průměrné hodnoty ze tří nezávislých měření, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Imunodetekce CYP1A1/2 byla provedena v jaterních mikrosomech.

4.3. Interakce PhIP s cytochromy P450 *in vitro*

Použitím pokusů *in vitro* byl studován možný mechanismus působení PhIP a jeho metabolitů na cytochrom P450. Ke studiu bylo použito izolovaných mikrosomových frakcí z potkaních jater premedikovaných β -naftoflavonem. Nejprve byl proveden pokus ke zjištění chování PhIP, zda se jedná o inhibitor, či nikoliv. Přímý účinek PhIP byl sledován během inkubace mikrosomů s touto látkou. Případný vliv metabolitů PhIP byl hledán po současném přidání NADPH regenerujícího systému, který umožňuje reakce katalyzované právě cytochromy P450. Tyto dílčí pokusy byly prováděny ve dvojím provedení: 1. inkubační systém sloužil jako kontrolní, představoval inkubační stabilizaci (viz kap. 4.3.1.), v dalším pokuse neobsahoval karcinogen (viz kap. 4.3.2) a v poslední studii představoval systém obsahující PhIP, ale bez kofaktoru (viz kap. 4.3.3). 2. systém byl detekční. Bylo prováděno měření EROD aktivity a imunodetekce pomocí metody Western blot.

4.3.1. Studium inhibičního vlivu PhIP na cytochromy P450

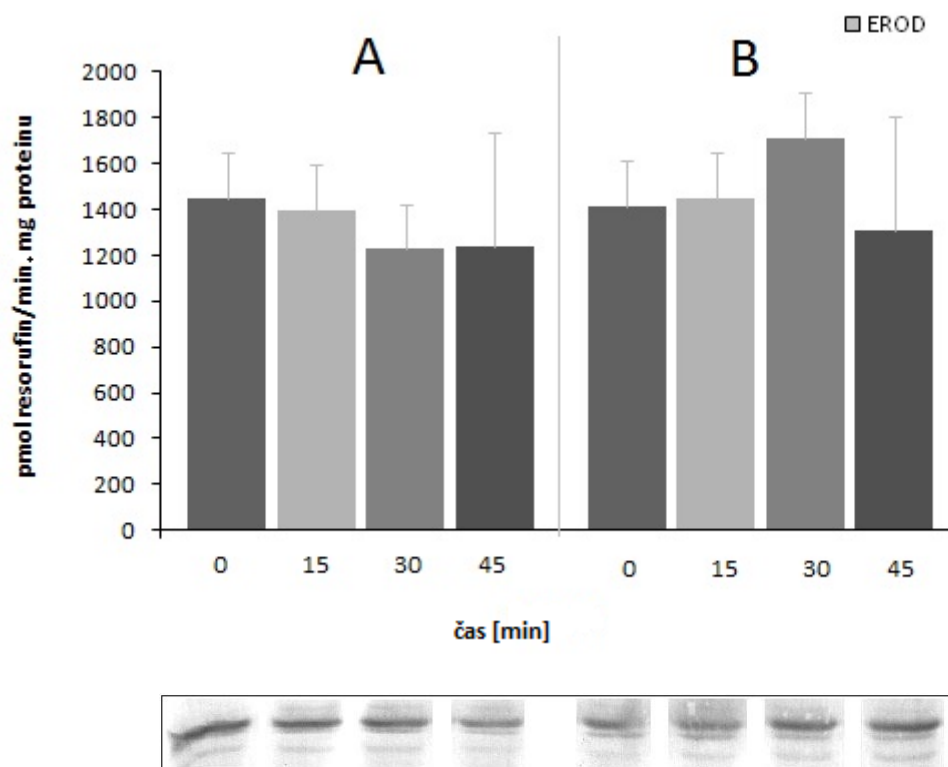
Pro určení inhibičních účinků PhIP na cytochromy P450 byla proměřena EROD aktivita (viz kapitola 3.2.6.) různě koncentrovaných roztoků PhIP (0,01; 0,1; 1 a 10 μM). Roztok obsahoval též mikrosomální frakce potkanních jater premedikovaných 48h β -naftoflavon (0,05 mg/ml). Naměřené hodnoty aktivit byly vyneseny do grafu (**Obr. 11**, str. 35) a byly vztaženy ke kontrole (kontrola = 100%).



Obr. 11: Vliv PhIP na aktivitu cytochromů P450 1A. Naměřené hodnoty EROD aktivit jsou vztaženy na EROD aktivitu kontroly, která je považována za 100%.

4.3.2. Studium vlivu PhIP na cytochromy P450 v různých časových intervalech

Reakční směs obsahovala jaterní mikrosomální frakce premedikované 48h β -naftoflavonem (1 mg/ml), dále fosfátový pufr a PhIP (1 μM), kontrolní vzorky obsahovaly místo PhIP DMSO. Byla proměřována EROD aktivita (viz kapitola 3.2.6.) v časových intervalech 0, 15, 30 a 45 minut. (**Obr. 12**, str.36). Také imunochemická analýza CYP1A1/2 nezaznamenává výrazné změny v expresi CYP1A1/2 v průběhu inkubace.

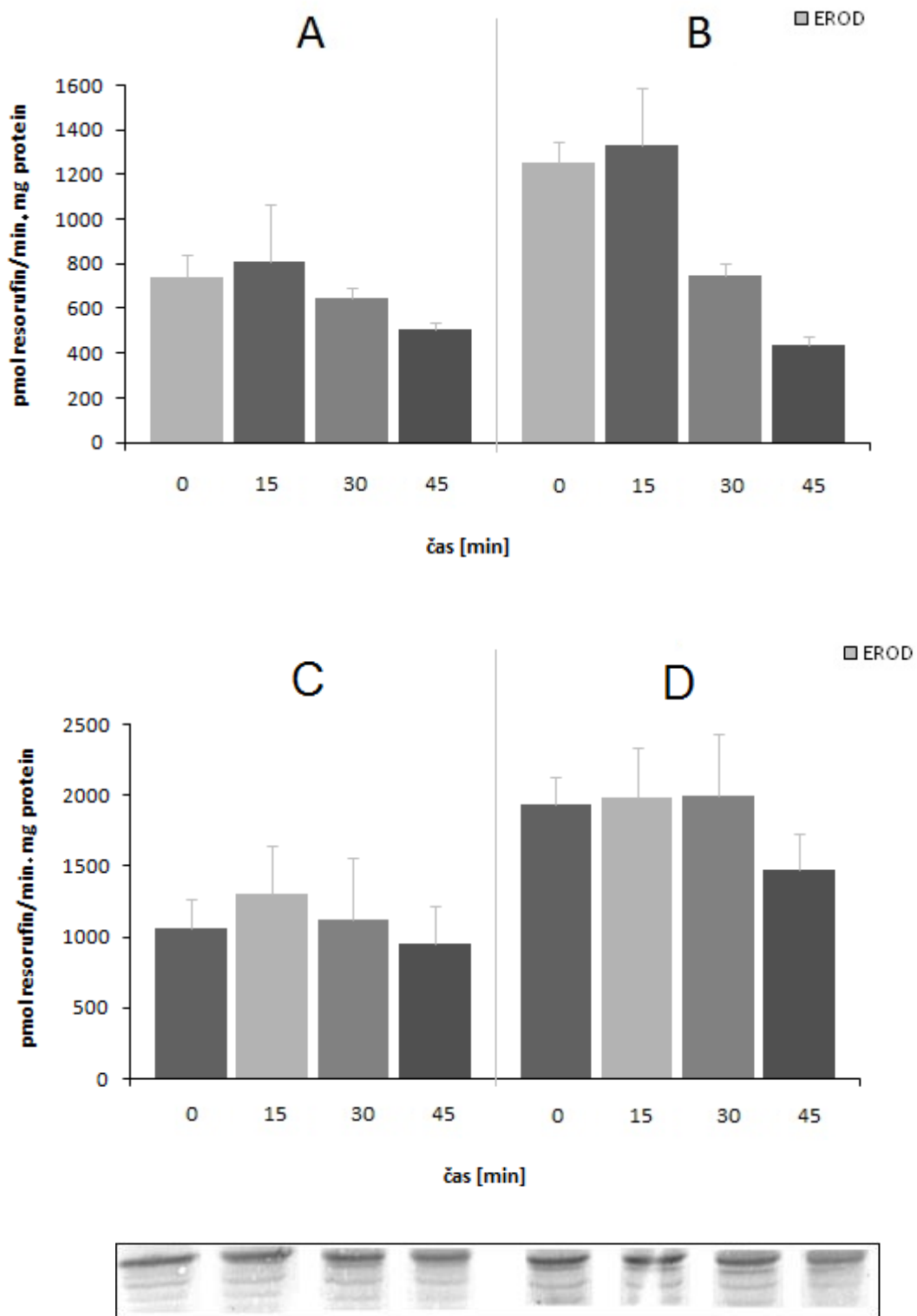


Obr. 12: EROD aktivita v různých časových intervalech inkubační směsi bez PhIP (A) a s obsahem PhIP (B). Graf reprezentuje průměrné hodnoty ze dvou měření, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Imunostanovení cytochromu P450 1A1/2.

4.3.3. Studium přídavku NADPH na metabolickou aktivaci PhIP cytochromy P450

Inkubace byla opět prováděna ve dvou provedeních, a to za přítomnosti 1 μ M PhIP, nebo jako kontrolní bez PhIP. Stanovení EROD aktivity bylo též prováděno dvojím způsobem, s přídavkem nebo bez přidání NADPH.

Reakční směs obsahovala jaterní mikrosomální frakce premedikované 48h β -naftoflavonem (1 mg/ml), dále fosfátový pufr, PhIP bylo přidáno DMSO, poslední součástí reakční směsi byl NADPH regenerující systém.



Obr. 13: EROD aktivity v různých časových intervalech inkubační směsi bez PhIP (A, C) a s obsahem PhIP (B, D) s přidavkem NADPH (C,D). Graf reprezentuje průměrné hodnoty ze dvou měření, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Imunostanovení cytochromu P450 1A1/2.

5. DISKUZE

Chemopreventivní látky, mezi něž řadíme především flavonoidy, jsou všeobecně považovány za látky zdraví prospěšné. Pokud se na ně podíváme i z druhého pohledu, jsou to látky, které mohou inhibovat či stimulovat aktivity většiny cytochromů P450, rovněž jsou ale schopny indukovat expresi určitých cytochromů P450. Takováto indukce CYP může stimulovat metabolickou aktivaci prekarcinogenů, a tím zvýšit riziko vzniku rakoviny [50].

První studie byla zaměřena na sledování indukčního efektu jednorázového podání nízké dávky chemopreventivní látky, jmenovitě β -naftoflavonu, na cytochromy P450. Byla stanovena proteinová exprese pomocí metody Western blot a aktivita CYP1A1/2 za použití specifického substrátu 7-ethoxyresorufinu. β -naftoflavon byl potkanům podán p.o. gaváží do žaludku v časovém rozmezí 24, 48 a 72h. Z výsledků (**Obr. 9**, str. 32) je patrné, že k nejsilnější indukci CYP1A dochází po 24h premedikaci β -naftoflavonu.

V dalším experimentu byl induktor, β -naftoflavon a potravní karcinogen PhIP podávány postupně. Pokud jsou totiž látky, jak karcinogen, tak chemopreventivní látka podány najednou, chemopreventivní látka může inhibovat karcinogen a dokázat tak svůj pozitivní vliv. Hlavním cílem této části pokusu bylo zjištění, zda opravdu závisí na pořadí podání chemopreventivní látky a karcinogenu a zda může v případě postupného podání mít naopak negativní vliv a zvyšovat aktivitu karcinogenu. Toto postupné podání se též dá přirovnat k reálné situaci běžného života. Chemopreventivní látky se užívají za účelem snížení efektu karcinogeních látek, kterým je člověk exponován. Na základě výsledků z předchozího experimentu byl vybrán interval 72h mezi jednotlivými podáními. Časový interval byl zvolen tak, aby byl indukční efekt zachován a aby se zabránilo možné inhibici aktivačních enzymů způsobené přítomností chemopreventivní látky. Výsledky v případě tohoto sekvenčního podání β -naftoflavonu a následně karcinogenního PhIP nejsou jednoznačné. Podání β -naftoflavonu v kombinaci s oběma dávkami PhIP (50 mg/kg a 150 mg/kg tělesné hmotnosti) nemělo výrazný vliv na EROD aktivitu, naopak imunodetekcí bylo zjištěno zvýšení exprese CYP1A1/2 vlivem podání β -naftoflavonu i PhIP (**Obr. 10**, str. 33). Z těchto výsledků můžeme vyvodit, že po podání β -naftoflavonu dochází ke zvýšení exprese CYP1A, nedochází však ke zvyšování aktivity těchto enzymů. A tudíž nedochází ke zvýšení metabolické aktivity PhIP.

K objasnění nejednoznačných výsledků z předchozí studie, byly provedeny pokusy *in vitro*. V první řadě byl sledován charakter účinku PhIP na cytochromy P450. Z výsledků (**Obr. 11**, str. 35) vyplývá, že účinek PhIP není výrazně inhibiční či stimulační, proto byla provedena další studie *in vitro*, ve které jsme se snažili objasnit vliv PhIP na cytochromy P450 v různých časových intervalech. V reakční směsi byly inkubovány jaterní mikrosomální frakce premedikované β -naftoflavonem, a PhIP. V průběhu inkubace byla proměřována v určitých časových intervalech EROD aktivita, u které nebyly v průběhu experimentu zaznamenány výrazné změny, spíše docházelo ke stabilizaci systému. Také imunochemickou analýzou nebyly nezaznamenány výrazné změny v expresi CYP1A1/2.

Posledním pokusem byla studie přídavku NADPH na metabolickou aktivaci PhIP cytochromy P450. Při této inkubaci reakční směs již obsahovala NADPH dodané regenerujícím systémem, přeměna substrátu 7-ethoxyresorufinu na výsledný produkt resorufin vykazující fluorescenci, nemusela být tudíž iniciována přidáním dalšího NADPH, tak jak je u této metody pravidlem. Pro případ, že by se NADPH dodané regenerujícím systémem spotřebovalo při případné metabolické aktivaci PhIP, bylo systému v paralelním měření dodáno navíc NADPH a byla změřena EROD aktivita. Z (**Obr. 13**, str. 37) lze vyčíst, že v případě inkubace reakční směsi s PhIP bez přídavku dalšího NADPH dochází ke snížení deethylasové aktivity.

Nejasné výsledky experimentů *in vitro* mohou být dány krátkými časovými úseky inkubace, při kterých se vliv PhIP na cytochromy P450 nestihl projevit. Dalším markerem pro posuzování rizika vzniku rakoviny je množství aduktů karcinogenu s DNA. Tvorba aduktů karcinogenu s DNA se obecně považuje za důležitý genotoxický krok v procesu iniciace karcinogeneze. Karcinogeny, jako PhIP, jsou enzymově biotransformovány *in vivo*, což může vést jak k aktivaci, tak detoxikaci těchto látek. Potenciální vliv flavonoidů indukovat adukty karcinogenu s DNA byl stanoven podle Singh a spol. (2010) [72] technikou kapalinové chromatografie s přepínáním kolon ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc. v Německém centru pro výzkum rakoviny v Heidelbergu. **Tab. 3** (str. 40) ukazuje množství aduktů PhIP s DNA [73].

Hodnoty získané touto metodou velmi dobře odpovídají výsledkům získaných z imunochemické analýzy a měření specifických aktivit, ve kterých premedikace β -naftoflavonem významně nezvýšila žádné sledované hodnoty oproti samotnému podání PhIP.

Tab. 4: Množství adduktů PhIP s DNA

Vzorek DNA (játra)	RAL
PhIP1	64,90
PhIP2	163,35
β NF+PhIP1	81,25
β NF+PhIP2	187,05

RAL – „relative adduct labelling per 10^8 nucleosides“ [73]

Výsledkem této studie je zjištění, že sekvenční podání chemopreventivní látky a karcinogenu nemusí mít výrazný negativní vliv na vývoj nádorového onemocnění. V budoucnu budou provedeny další studie pro upřesnění správného podávání chemopreventivních látek.

6. ZÁVĚR

- Laboratorní potkani byly premedikovány *p.o.* chemopreventivní látkou a/nebo karcinogenem v různých časových intervalech a mikrosomální frakce byly izolovány z jater těchto zvířat
- Indukce cytochromů P450 1A1/2 v jaterních mikrosomech po podání chemopreventivní látky byla nejsilnější 24h po premedikaci
- Imunochemická analýza metodou Western blot prokázala slabý nárůst CYP1A1/2 exprese v sekvenčním podání chemopreventivní látky a karcinogenu
- Experimenty *in vitro* neprokázaly výrazný inhibiční či stimulační účinek karcinogenu na cytochromy P450
- Nepodařilo se objasnit vliv karcinogenu na cytochromy P450 v různých časových intervalech
- Zvolenými metodami nebylo prokázáno, že by měl přírůstek NADPH vliv na metabolickou aktivaci karcinogenu cytochromy P450

7. SEZNAM ZKRATEK

AαC	2-amino-9Hpyrido[2,3-b]indol
AhR	aryl uhlovodíkový receptor
BaP	benzo[a]pyren
BCA	hovězí sérový albumin
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát/nitro blue tetrazolium
BIS	N,N'-methylenbisakrylamid
βNF	β-naftoflavone
CYP	cytochrom P450
DMSO	dimethyl sulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EROD	7-ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylace
HCA	heterocyklické aminy
2-ME	2-merkptoethanol
MeIQx	2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxalin
MFO	oxidasa se smíšenou funkcí
MS	mikrosomální frakce
NADPH	redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PBS	fosfátový pufr
PhIP	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin
p.o.	perorální podání
PVDF	polyvinyliden fluorid
R	substrát
RAL	relative adduct labelling
ROH	hydroxylovaný substrát
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialové

v/v

objem kapalné látky v konečném objemu roztoku

w/v

hmotnost rozpuštěné látky v konečném objemu roztoku

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Devlin M. Thomas (ed.) (2010): Textbook of biochemistry with clinical correlations (Seventh Edition), John Wiley & Sons, Hoboken, USA
- [2] Omura, T., and Sato, R. (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature, *J Biol Chem*, 239, 2370-2378
- [3] Knejzlík Z., Káš J., Ruml T. (2000): Mechanismus vstupu xenobiotika do organismu a jejich detoxikace, *Chem Listy*, 94, 913-918
- [4] Jurgenman K., Katz N. (1989): Functional specialization of different hepatocyte populations, *Physiol Rev*, 69, 708
- [5] Oinonen T., Lindros K. O. (1998): Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation, *Biochem J*, 329, 17
- [6] Pulos T. L., Cupp J. V., Li H. (1995): Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry, sv. 2. Case Bound, New York
- [7] Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999): Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví, *Chem Listy*, 93, 229
- [8] Stiborová M., Hudeček J., Páca J. (2000): Enzymové systémy biotransformující fenolické látky, *Bull Čs Spol Biochem Mol Biol*, 28, 57
- [9] Stiborová M., Mikšanová M., Martínek V., Frei E. (2000): Heme Peroxidases: Structure, Function, Mechanism and Involvement in Activation of Carcinogens. A Review *Collect Czech Chem Commun*, 65, 297
- [10] Stiborová M., Hudeček J., Páca J. jr., Martínek V., Páca J. (2004): Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí, *Chem Listy*, 98, 876-890
- [11] Anzenbacher P., Dawson J. H., Kitagawa T. (1989): New developments in Raman spectroscopy of biological systems, *J Mol Struct*, 214, 149
- [12] Hudeček J., Baumruk V., Anzenbacher P., Munro A.W. (1998): Catalytically self-sufficient P450 CYP102(Cytochrome P-450 BM-3), *Biochem Biophys Res Commun*. 243, 811
- [13] Coon M. J., Ding X., Pernecky S. J., Vaz A. D. N. (1992) : Cytochrome P450; progress and predictions, *Faseb J*, 6, 669
- [14] Guengerich F.P. (1997): Role of cytochrome P450 in drug-drug interactions, *Adv Pharmacol*, 43, 7-35.

- [15] Eisenbrand S., Tang W. (1993): Food-borne heterocyclic amines. Chemistry, formation, occurrence and biological activities. A literature review, *Toxikology*, 84, 1-82
- [16] Hrubý S., Turek B., Černá M. (1994), *Nutriční toxikologie*, Praha
- [17] Komprda T. (2004): *Obecná hygiena potravin*, MZLU v Brně
- [18] National Toxicology Program (2002): : PhIP, MeIQ, and MeIQx, dostupné na <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/newhomeroc/roc11/HCAasPub.pdf>
- [19] Skog K.I., Johansson M.A.E., Jagerstad M.I. (1998): Carcinogenic Heterocyclic Amines in Model Systems and Cooked Foods: A Review on Formation, Occurrence and Intake, *Food Chem Toxicol*, 36, 879-896
- [20] Komprda T. (2009): Heterocyklické aromatické aminy: analýza alimentárního rizika, *Veterinářství*, 59, 39-43
- [21] Strtil P., Kubáň V. (2005): Exogenní karcinogeny v potravinách a karcinogeny vznikající při jejich technologickém zpracování, *Chem Listy*, 99, 3-12
- [22] Turesky R.J. (2007): Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats, *Toxicol Lett*, 168, 219-227
- [23] Velíšek J. (2002): *Chemie potravin 1*, Tábor
- [24] Stavric B. (1994): Biological significance of trace levels of mutagenic heterocyclic aromatic amines in human diet: A critical review, *Fd Chem Toxic*, 32, 977-994
- [25] Friederiksen H. (2005): Two food-borne heterocyclic amines: Metabolism and DNA adduct formation of amino- α -carbolines, *Mol Nutr Food Res*, 49, 263-273
- [26] Lin D., Kaderlik K.R., Turesky R.J., Miller D.W., Lay J.O.Jr., Kadlubar F.F. (1992): Identification of N-(Deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1 methyl-6-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridine as the major adduct formed by the food-borne carcinogen, 2-amino-1 methyl-6-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridine, with DNA. *Chem Res Toxicol*. 5, 691-697
- [27] Lin D.X., Lang N.P., Kadlubar F.F.(1995): Species differences in the biotransformation of the food-borne karcinogen 2-amino-1 methyl-6-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridine) by hepatic microsomes and cytosols from humus, rats, and mice. *Drug Metab Dispos*, 23, 518-524
- [28] Snyderwine E.G, Yu M., Schut H.A., Knight-Jones L., Kimura S. (2002): Effect of CYP1A2 deficiency on heterocyclic amine DNA adduct level in mice. *Food Chem Toxicol* 40, 1529-1533
- [29] Turesky R.J. (2007): Foramtion and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked mens, *Toxicol Lett*, 168, 219-227.

- [30] Turteltaub K.W., Dingley K.H., Curtis K.D., Malfatti M.A., Turesky R.J., Garner R.C., Felton J.S., Lang N.P. (1999): Macromolecular adduct formation and metabolism of heterocyclic amines in humus and rodents at low doses, *Cancer Lett*, 143, 149-155
- [31] Turesky R.J., Guengerich F.P., Guillouzo A., Langouët S. (2002): Metabolism of heterocyclic aromatic amines by human hepatocytes and cytochromes P450A2, *Mutat Res*, 506-507, 187-195
- [32] Stiborová M. (2005): Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace, *Sborník multioborového semináře „Otevřená věda“ z 22. – 29.10.* Praha
- [33] Hunt S. M., Groff J. L. (1990): *The Digestive System: Mechanism for Nourishing the Body*, Wadsworth, New York
- [34] Nebert D.W., Dalton T.P., 2006. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 6, 947-960.
- [35] Nakata K., Tanaka Y., Nakano T., Adachi T., Tanaka H., Kaminuma T.I., Shikawa T., 2006. Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metab Pharmacokinet*, 21, 437-57
- [36] Vrzal R., Ulrichová J., Dvořák Z. (2004) Aromatic Hydrocarbon Receptor Status in the Metabolism of Xenobiotics under Normal and Pathophysiological Conditions. *Biomed P*, 148, 3-10
- [37] Vavruch I. (1993): Rakovina a chemické karcinogeny, *Chem Listy*, 87, 504-508
- [38] Omura, T., Sato, R. (1962) A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* 237, 1375-1376
- [39] Joseph P.D., Mannervik B., (2006) *Molecular Toxicology*. Oxford University Press, Oxford.
- [40] Nedelcheva V., Gut I. (1994): P450 in the rat and man: Methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer, *Xenobiotica*, 24, 1151-1175
- [41] Spatzenegger M., Jaeger W. (1995): Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism, *Drug Metab Rev*, 27, 397-417
- [42] Nebert DW, Nelson DR, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Lewin V., Phillips J.R., Sato R., Waterman M.R., (1989): The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci, *DNA* 8, 1-13

- [43] Sheweita S.A., (2000): Drug-Metabolizing Enzymes: Mechanisms and Functions, *Curr Drug Metab*, 1, 107-132
- [44] Gu Y.Z., Hogenesch J.B., Bradfield C.A. (2000): The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40, 519-561.
- [45] Schmidt J.V., Bradfield C.A. (1996): Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12, 55-89
- [46] Marlowe J.L., Puga A. (2005): Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *J Cel Biochem*, 96, 1174-1184.
- [47] Mimuraa J., Kuriyama YF (2003) Functional Role of AhR in the Expression of Toxic Effects by TCDD. *J Biochem Mol Biol*, 1619, 263-268
- [48] Pávek P., Dvořák Z. (2008) Xenobiotic-Induced Transcriptional of Xenobiotic Metabolizing Enzymes of the Cytochrome P450 Superfamily in Human Extrahepatic Tissues. *Curr Drug Metab*, 9, 129-143
- [49] Hollman P.C., Katan M.B. (1997): Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man., *Biomed Pharmacother*, 51, 305-310.
- [50] Moon Y.J., Wang X., Morris M.E. (2006): Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism, *Toxicol in Vitro*, 20, 187-210
- [51] Pietta P.G. (2000): Flavonoids as antioxidants, *J Nat Prod*, 63, 1035-1042
- [52] Primiano t., Yu R., Kong A.N.T. (2001): Signal transduction events elicited by natural products that function as cancer chemopreventive agents, *Pharma Biol*, 39, 83-107
- [53] Knowles L.M., Zigrossi D.A., Tauber R.A., Hightower C., Milner J.A. (2000): Flavonoids suppress androgen-dependent human prostatic tumor proliferation, *Nutr Cancer* 38, 116-122
- [54] Rice-Evans C. (2001): Flavonoid antioxidants, *Curr Med Chem*, 8, 797-807
- [55] Kang Z.C., Tsai S.J., Lee H. (1999): Quercetin inhibic benzo[a]pyrene-induced DNA adducts in human Hep G2 cells by altering cytochrome P450 1A1 expression, *Nutr Cancer*, 35, 175-179
- [56] Zhai S., Dai R., Friedman F.K., Vestal R.E. (1998): Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids, *Drug Metab Dispos*, 26, 989-992.
- [57] Buening M.K., Chang R.L., Huang M.T., Fortner J.G., Wood A.W., Conney A.H. (1981): Activation and inhibition of benzo[a]pyrene and aflatoxin B1 metabolism in human liver microsomes by naturely occuring flavonoids., *Cancer Res*, 41, 67-72

- [58] Huang M.T., Chang R.L., Fortner J.G., Conney A.H. (1981): Studies on the mechanism of activation of microsomal benzo[a]pyrene hydroxylation by flavonoids. *J Biol Chem*, 256, 1111-1117
- [59] Harborne J.B., Williams C.A. 2000: Advances in flavonoids research since 1992, *Phytochemistry* 55, 481-504
- [60] Kühnau J. (1976): The Flavonoids: A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24, 117-191
- [61] Soria J.C., Kim E.S., Fayette J. Lantuejoul S. Deutsch E., Hong W.K. (2003): Chemoprevention of lung cancer, *Lancet Oncol*, 4, 659-669.
- [62] Shukla Y., Pal S.K., (2004): Dietary Cancer Chemoprevention: An Overview, *Int J Hum Genet*, 4, 265-276
- [63] Hodek P., Křížková J., Burdová K., Šulc M., Kizek R., Hudeček J., Stiborová M. 2009: Chemopreventive compounds-View from the other side, *Chemico-Biological Interactions*, 180, 1-9
- [64] Trock B., Lanza E., Greenwald P., 1990: Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland *N Engl J Med*, 343, 78-85
- [65] Tsuda T., Ohshima Y., Nomoto H., Fujita K., Matsuda E., Iigo M., Takusuka N., Moore M.A. 2004: Cancer prevention by natural compounds, *Drug Metab Pharmacokinet* 19, 245-263
- [66] <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/P450.html>
- [67] van der Hoeven T.A., Coon M.J. (1974): Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes, *J Biol Chem*, 249, 6302-6310
- [68] Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem*, 150, 76-85
- [69] Burke M.D., Mayer R.T. (1974): Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene, *Drug Metab Dispos*, 2, 583-588
- [70] Sivaraman L., Leatham M.P., Yee J., Wilkens L.R., Lau A.F., Le Marchand L. (1994): CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer, *Cancer Res*, 54, 3692-3695

- [71] Brosen K. (1995): Drug interactions and the cytochrome P450 systém. The role of cytochrome P450 1A2., *Clin Pharmacokinet*, 29, 20-25
- [72] Singh R., Arlt V.M., Henderson C.J., Phillips D.H., Farmer P.B., Gamboa da Costa G. (2010): Detection and quantitation of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine adducts in DNA using online columnswitching liquid chromatography tandem mass spectrometry *J.Chromatogr. B, Analyt Technol Biomed Life Sci*, 878, 2155-2162.
- [73] Hodek P., Křížková J., Volker M., Stiborová M. (2011): Impact of beta-naphtolavone on genotoxicity of food-derived carcinogens., *Neuroendocrinol Lett*, Článek je ve fázi přípravy k tisku.

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka