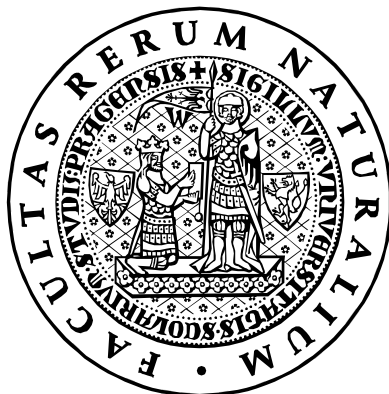


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



RNDr. Michaela Moserová

METABOLISMUS KARCINOGENŮ A LÉČIV
MONOOXYGENASOVÝM SYSTÉMEM

METABOLISM OF CARCINOGENS AND DRUGS BY
MONOOXYGENASE SYSTEM

Disertační práce

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2011

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval 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

.....

RNDr. Michaela Moserová

PROHLÁŠENÍ SPOLUAUTORŮ

Prohlašuji, že RNDr. Michaela Moserová rozhodujícím způsobem (30-90 %) přispěla ke vzniku všech 7 článků, které jsou přílohami této disertační práce. Sama provedla většinu experimentů a významně se podílela i na jejich plánování, na interpretaci výsledků a na sepsání publikací.

V Praze dne

.....

Prof. RNDr. Marie Stiborová DrSc.

Ráda bych poděkovala své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání zajímavého tématu, odborné vedení, všestrannou pomoc a laskavý přístup při vypracování této práce.

Děkuji RNDr. Věře Černé, PhD. za objasnění experimentálních přístupů, odborné rady a trpělivost. Doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, PhD. za provedení hmotnostní spektrometrie , a také RNDr. Martinu Dračínskému, PhD. za provedení nukleární magnetické rezonance. Dále děkuji celému kolektivu laboratoře za potřebné rady, pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí. A nakonec můj dík patří i mé rodině, která mě podporovala během celého mého studia.

Práce byla podporována grantovou agenturou České republiky (grant 305/09/H008, P301/10/0356), grantovou agenturou Ministerstva školství a tělovýchovy České republiky (granty MSM0021620808 a 1M0505) a grantovou agenturou Univerzity Karlovy (grant 127208).

Abstrakt

Ellipticin, alkaloid z rostlin čeledi Apocynaceae, vykazuje významný protinádorový a anti-HIV účinek. Je pro-léčivem, jehož farmakologická účinnost a vedlejší genotoxické účinky závisí na metabolické aktivaci cytochromy P450 (CYP) a peroxidasami (Px). Z toho důvodu bylo cílem disertační práce poznání příspěvku jednotlivých CYP a Px k oxidaci ellipticinu v různých tkáních (játra, plíce a ledviny) laboratorního potkana, který byl vybrán jako vhodný model ilustrující osud ellipticinu v lidském organismu. Dále byly využity mikrosomální systémy myši s „deletovanou“ reduktasou v játrech (HRNTM) a myši kontrolní linie (WT) a purifikované enzymy CYP1A1 a 3A4. Sledován byl i vliv cytochromu b₅ na produkci jednotlivých metabolitů (aktivačních a detoxikačních) ellipticinu a tvorba aduktů aktivovaného ellipticinu s DNA.

Karcinogenní benzo[a]pyren (BaP) je po své aktivaci cytochromy P450 (CYPs) schopný kovalentní vazby na DNA. Sledovali jsme jeho schopnost tvorby aduktů s DNA a indukce enzymů CYP a NADPH:CYP reduktasy (RED) v myších játrech, hlavním orgánu tvorby aduktů BaP s DNA. CYP1A1 je označován za nejdůležitější enzym v metabolické aktivaci BaP. V práci jsme sledovali vliv jednotlivých složek systému monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO systému) na metabolismus BaP. V disertační práci byly využity mikrosomální systémy potkanů kontrolních a premedikovaných induktorem CYP1A1/2, Sudanem I, a purifikovanými enzymy, CYP1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou. Sledována byla produkce jednotlivých metabolitů BaP (aktivačních a detoxikačních) a tvorba aduktů aktivovaného BaP s DNA.

V obou případech jsme pro separaci metabolitů vzniklých oxidací ellipticinu a/nebo BaP využili HPLC. Aduktů vzniklé aktivací těchto dvou sloučenin byly kvantifikovány metodou „³²P-postlabeling“

Z výsledků získaných při studii osudu ellipticinu v organismu vyplývá, že cytochrom b₅ ovlivňuje oxidaci ellipticinu CYP1A1 a 1A2 ve prospěch aktivačních metabolitů, v případě CYP3A4 je stimulována tvorba 9-hydroxyellipticinu a aktivačního metabolitu, 13-hydroxyellipticinu. V játrech potkanů premedikovaných ellipticinem dochází k nárůstu jak aktivačních metabolitů, tak i aduktů s DNA. Za tuto skutečnost je odpovědný CYP1A1 v komplexu s cytochromem b₅, které jsou ellipticinem indukovány. V plicní a ledvinné tkáni dochází vlivem CYP1A1 k detoxikaci ellipticinu a zároveň k aktivaci ellipticinu katalyzovaném peroxidasami.

Ze studie sledující metabolismus BaP vyplývá, že BaP je oxidován mikrosomálním systémem potkana i myši na šest metabolitů (9,10-diOH-; 4,5-diOH-; ?; 3,6-chinon-; 1,6-chinon a 3-OH-BaP). V rekonstituovaném systému CYP1A1 s NADPH:CYP reduktasou však vznikají metabolity pouze tři (3,6-chinon-; 1,6-chinon a 3-OH-BaP). K nejúčinnější oxidaci BaP dochází při nízké koncentraci NADPH:CYP reduktasy v rekonstituovaném systému s CYP1A1, a to v poměru CYP:RED 1:0.05. Cytochrom b₅ stimuluje oxidaci BaP cytochromem P450 1A1 v rekonstituovaném systému s NADPH:CYP reduktasou. Epoxidhydrolasa je esenciálním enzymem pro tvorbu aduktu BaP č. 2, tvořeného ze 7,8,-dihydroxy-9,10-epoxy-BaP. Tento adukt není tvořen v systému, který obsahuje pouze CYP1A1 a NADPH:CYP reduktasu. V systému bez epoxidhydrolasy je tvořen pouze adukt č. 1, generovaný z jiného metabolitu BaP, 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP. Cytochrom b₅ výrazně ovlivňuje tvorbu obou kovalentních aduktů BaP s DNA.

Abstract

Ellipticine, an alkaloid isolated from Apocynaceae plants, exhibits significant antitumor and HIV activities. Ellipticine is a pro-drug, whose pharmacological and genotoxic effects depend on activation by cytochromes P450 (CYP) and peroxidases (Px) to a reactive species generating DNA adducts. To elucidate contribution of CYPs (and which of them) and Px to ellipticine activation, we used rat and mouse models, mice with deleted gene of NADPH:CYP reductase in the liver, thus absenting this enzyme in the liver (HRNTM) and a control mouse line (WT), rats treated with ellipticine, and microsomal systems isolated from the liver of mouse lines and from the liver, kidney and lung of rats. The purified enzymes, CYP1A1 and 3A4, reconstituted with NADPH:CYP reductase were also used. The effect of cytochrome b₅, a facultative component of the mixed function monooxygenase system, on ellipticine oxidation by CYP1A1 and 3A4 was also investigated. Carcinogenic benzo(a)pyrene (BaP), known to covalently bind to DNA after its activation with CYPs, was investigated for its potential to generate DNA adducts and to induce CYP and NADPH:CYP reductase enzymes in mouse livers. We investigated an influence of each of components of the mixed function oxidases (MFO) system on metabolism of BaP. CYP1A1 is widely accepted to be the most important enzyme activating BaP. In the present study, microsomal systems of rats and mice and purified enzymes CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase were used. We investigated a production of BaP metabolites and BaP-DNA adducts. HPLC separation of metabolites formed by oxidation of ellipticine and/or BaP was performed. For quantification of DNA adducts generated by these compounds, the ³²P-postlabeling method was used. The results found in the study investigating ellipticine metabolism shows that cytochrome b₅ affects oxidation of ellipticine by CYP1A1/2, favoring formation of 12-hydroxy- and 13-hydroxyellipticine metabolites implicated in ellipticine–DNA adduct formation, at the expense of 9-hydroxy- and 7-hydroxyellipticine that are detoxication products. In the case of CYP3A4, cytochrome b₅ stimulates formation of 9-hydroxyellipticine and one of the activation metabolites, 13-hydroxyellipticine. We found an increase in activation metabolites of ellipticine and DNA adduct formation in liver microsomes of rats treated with ellipticine. CYP1A1 is induced by ellipticine in the liver, and this feature leads to “switching” of the main activation enzyme activating ellipticine from CYP3A4 to CYP1A1. In contrast to situation in the liver, ellipticine is detoxicated by CYP1A1 in lung and kidney, whereas is activated by Px in these extrahepatic tissues. The study investigating BaP metabolism shows that BaP is oxidized by hepatic microsomal system of rats and mice; six metabolites (9,10-diOH-; 4,5-diOH-; ?; 3,6-quinone-; 1,6-quinone and 3-OH-BaP) are formed by these microsomes. However, only three of them, 3,6-quinone-; 1,6-quinone and 3-OH-BaP, are generated by purified CYP1A1 reconstituted with NADPH:CYP reductase. A low concentration of NADPH:CYP reductase in the reconstituted system is sufficient for BaP oxidation, being stimulated by cytochrome b₅. Two BaP-derived DNA adducts (1 and 2, formed from 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP and 7,8-diol-9,10-epoxy-BaP, respectively) are generated by hepatic microsomes. Epoxide hydrolase is essential for formation of adduct 2, whereas adduct 1 is generated in the system containing only CYP1A1 with reductase. Cytochrome b₅ influences formation of both DNA adducts.

[IN CZECH]

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	10
1 ÚVOD	13
1.1 KANCEROGENEZE.....	14
1.1.1 Nádorová onemocnění.....	15
1.1.2 Mechanismus kancerogeneze	15
1.1.3 Kancerogenní faktory	17
1.1.4 Chemické kancerogeny.....	18
1.1.5 Polycyklické aromatické uhlovodíky.....	19
1.1.5.1 Benzo[a]pyren	20
1.1.5.1.1 <i>Metabolismus benzo[a]pyrenu a tvorba kovalentních aduktů s DNA.....</i>	<i>21</i>
1.2 LÉČBA NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ.....	22
1.2.1 Chemoterapie	22
1.2.2 Mechanismus účinku cytostatik.....	23
1.2.3 Farmakokinetika cytostatik	24
1.3 ELLIPTICIN	25
1.3.1 Mechanismus účinku ellipticinu	26
1.3.2 Biotransformace ellipticinu.....	27
1.3.3 Tvorba aduktů ellipticinu s DNA	27
1.4 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK	30
1.5 MIKROSOMÁLNÍ MONOOXYGENASOVÝ SYSTÉM (MFO SYSTÉM).....	33
1.5.1 NADPH:cytochrom P450 reduktasa.....	34
1.5.2 Cytochrom P450.....	36
1.5.2.1 Spinové formy cytochromu P450	37
1.5.2.2 Enzymové funkce cytochromu P450	38
1.5.2.2.1 <i>Reakční mechanismus monooxygenasové reakce.....</i>	<i>38</i>
1.5.2.3 Nomenklatura cytochromů P450	40
1.5.2.4 Substrátová specifita cytochromů P450	41
1.5.2.5 Regulace hladiny cytochromů P450 indukci enzymu	41
1.5.2.5.1 <i>Regulace exprese cytochromu P450 pomocí intracelulárních receptorů.....</i>	<i>42</i>
1.5.3 Membránové lipidy.....	42
1.6 CYTOCHROM b ₅	43
1.6.1 Struktura cytochromu b ₅	43
1.6.2 Mechanismy působení cytochromu b ₅	45
2 CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE.....	47

3 MATERIÁL A METODY	50
3.1 POUŽITÝ MATERIÁL.....	50
3.2 ENZYMOVÉ PREPARÁTY.....	52
3.2.1 Izolace mikrosomů a purifikace mikrosomálních enzymů.....	52
3.3 METODY STANOVENÍ KONCENTRACÍ A AKTIVIT VYBRANÝCH ENZYMŮ	54
3.4 ELEKTROMIGRAČNÍ METODY.....	55
3.4.1 SDS elektroforéza	55
3.4.2 Metoda „Western blotting“	56
3.5 STUDIUM METABOLISMU ELLIPTICINU CYTOCHROMY P450	57
3.5.1 Metabolismus ellipticinu cytochromy P450.....	57
3.5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácené fázi (HPLC)	58
3.5.3 Izolace 13-hydroxyellipticinu pomocí HPLC.....	58
3.5.4 Příprava aduktu 13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosinu pro analýsu metodou HPLC	59
3.5.5 Separace aduktu 13-hydroxyellipticinu metodou HPLC.....	59
3.6 STUDIUM METABOLISMU BENZO[a]PYRENU	60
3.6.1 Metabolismus benzo[a]pyrenu cytochromy P450.....	60
3.6.2 Metabolismus benzo[a]pyrenu cytochromy P450 v rekonstituovaném systému.....	61
3.6.3 Separace metabolitů benzo[a]pyrenu pomocí HPLC	62
3.6.4 Hmotností spektrometrie.....	62
3.6.5 Nukleární magnetická rezonance (NMR).....	62
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	64
4.1 METABOLISMUS ELLIPTICINU CYTOCHROMY P450.....	64
4.1.1 Oxidace ellipticinu cytochromy P450 1A1 a 1A2 za přítomnosti cytochromu b ₅	65
4.1.2 Oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4 za přítomnosti cytochromu b ₅	68
4.2 AKTIVACE ELLIPTICINU JATERNÍMI, PLICNÍMI A LEDVINNÝMI MIKROSOMÁLNÍMI SYSTÉMY POTKANŮ <i>IN VITRO</i>	70
4.2.1 Aktivace ellipticinu hepatálním a extrahepatálním mikrosomálním systémem potkana.....	71
4.2.2 Oxidace elipticinu hepatálními a extrahepatálními systémy potkana.....	77
4.3 AKTIVACE ELLIPTICINU ZA TVORBY ADUKTŮ S DNA <i>IN VITRO</i> A <i>IN VIVO</i>	80
4.3.1 Izolace a částečná charakterizace aduktu tvořeného 13-hydroxyellipticinem s deoxyguanosinem v DNA	82
4.4 METABOLISMUS ELLIPTICINU JATERNÍMI MIKROSOMÁLNÍMI SYSTÉMY MYŠÍ <i>IN VITRO</i>	85
4.4.1 Oxidace ellipticinu jaterními mikrosomálními systémy myši.....	86

4.5 METABOLISMUS BENZO[A]PYRENU MIKROSOMÁLNÍM SYSTÉMEM OXYGENAS SE SMÍŠENOU FUNKCÍ.....	89
4.5.1 Metabolismus benzo[a]pyrenu	89
4.5.2 Oxidace benzo[a]pyrenu jaterním mikrosomálním systémem potkana	90
4.5.3 Oxidace benzo[a]pyrenu jaterním mikrosomálním systémem myši.....	91
4.5.4 Metabolismus BaP purifikovaným cytochromem P450 1A1 rekonstituovaným s NADPH: cytochrom P450 reduktasou.....	93
4.5.5 Vliv cytochromu b ₅ na oxidaci BaP cytochromem P450 1A1	94
4.5.6 Vliv epoxidhydrolasy na oxidaci BaP cytochromem P450 1A1	96
4.6 EXPRESE ENZYMŮ ZAPOJENÝCH DO METABOLISMU ELLIPTICINU A BENZO[A]PYRENU V JATERNÍCH MIKROSOMECH MYŠÍ WT A HRN	97
4.6.1 Imunostanovení cytochromů P450 podrodiny 1A v myších mikrosomech	97
4.6.2 Imunostanovení cytochromu b ₅ v myších jaterních mikrosomech.....	98
4.6.3 Imunostanovení epoxidhydrolasy v myších jaterních mikrosomech	99
4.7 AKTIVACE BENZO[A]PYRENU ZA TVORBY ADUKTŮ BENZO[A]PYRENU S DNA.....	100
4.7.1 Aktivace benzo[a]pyrenu mikrosomálním systémem jater myší <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i>	100
4.7.2 Vliv NADPH: cytochrom P450 reduktasy a cytochromu b ₅ na aktivaci benzo[a]pyrenu cytochromem P450 1A1 <i>in vitro</i>	103
4.7.3 Vliv epoxidhydrolasy na aktivaci benzo[a]pyrenu <i>in vitro</i>	105
5 SOUHRN A ZÁVĚR	109
SEZNAM PŘÍLOH.....	123

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

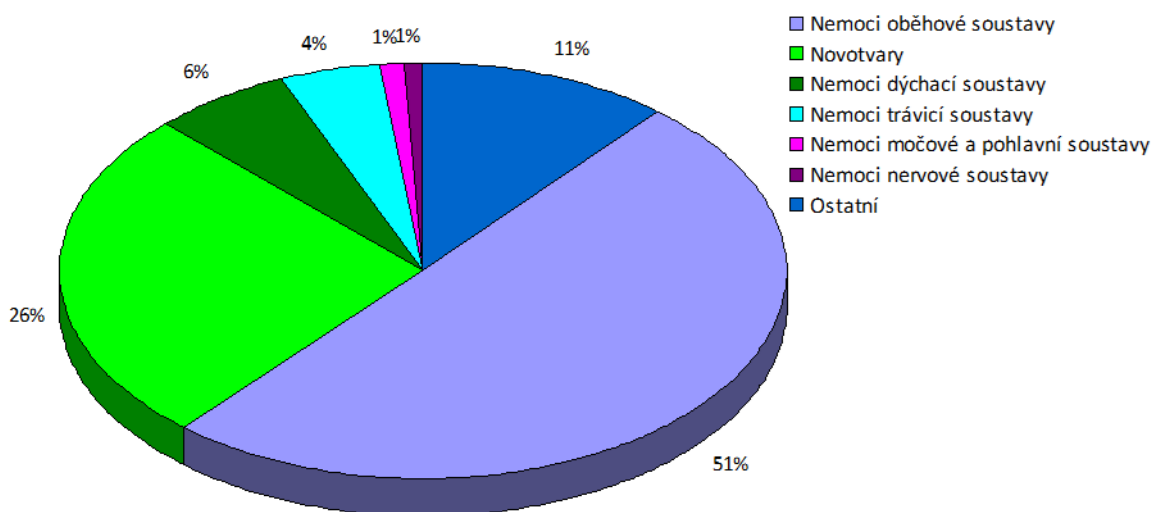
~	asi přibližně
AC	aceton
AcCoA	acetylkoenzym A
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor)
AIDS	syndrom získané imunodeficiency (acquired immune deficiency syndrom)
ATP	adenosintrifosfát
A_x	absorbance při vlnové délce x nm
BaP	benzo[a]pyren
BSA	hovězí sérový albumin
c (c_p)	koncentrace (koncentrace proteinu)
CAR	constitutive androstane receptor
CYP	cytochrom P450
cyt c	cytochrom c
Da	dalton
DLPC	dilauroylfosfatidylchlorid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	číselný kód enzymu
EDTA Na₂	ethylen diamintetraoctová kyselina ve formě dvojsodné soli
EH	epoxidhydróláza
ELFO	elektroforéza
ELISA	enzymová imunoanalýza (enzyme-linked immunosorbent assay)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
EtOH	ethanol
FAD	flavinadenindinukleotid (chinoidní forma)
FAD/FADH/FADH₂	/semichinoidní radikál/hydrochinon
FMN	flavinadeninmononukleotid (chinoidní forma)
FMN /FMNH/FMNH₂	/semichinoidní radikál/hydrochinon

GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
GIT	gastrointestinální trakt
HIV	human imunodeficiency virus
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography)
HRN	Hepatic reductase null, myší zvířecí model bez jaterní NADPH:CYP reduktasy
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát
IARC	mezinárodní institut pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
K	mikrosomy izolované z nepremedikovaných zvířat
M	mol/l
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionization-time of flight
MFO	system monooxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxygenases)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NaAc	octan sodný
NAD⁺ (NADH)	nikotinamidadeninukleotid oxidovaný (redukovaný)
NADP⁺ (NADPH)	nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidovaný (redukovaný)
NADPH-GS	NADPH-generující systém
NAT	N-acetyltransferasa
NMR	nukleární magnetická rezonance
ODS	oktadecylsilan
P450	pigment a maximem absorbance při 450 nm (cytochrom P450)
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PB	fenobarbital
PCN	pregnenolon 16 α -karbonitril (5-pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -karbonitril)
PEI	polyethylenimin
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor

PXR	pregnane X receptor
R*OOH	organický peroxid
RAL	poměr počtu aduktů v DNA k celkovému počtu nukleotidů (relative adduct labeling)
RED	NADPH:cytochrom P450 reductasa
RH	substrát
RIF	rifampicin
ROH	hydroxylovaný produkt
RPM	počet otáček za minutu (revolution per minute)
SDS-ELFO	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
SULT	sulfotransferasa
SXR	steroid xenobiotic receptor
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)
U	standardní jednotka enzymové aktivity
UDP	uridindifosfát
UV	ultrafialové záření
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem
WB	metoda Western blot
WT	Wild-Type, myší zvířecí model s obsahem jaterní NADPH:CYP reductasy
WT/HRN - BaP	myší modely zvířat premedikované BaP
β-NF	β-naftoflavon
Δt	změna času
λ	vlnová délka

1 ÚVOD

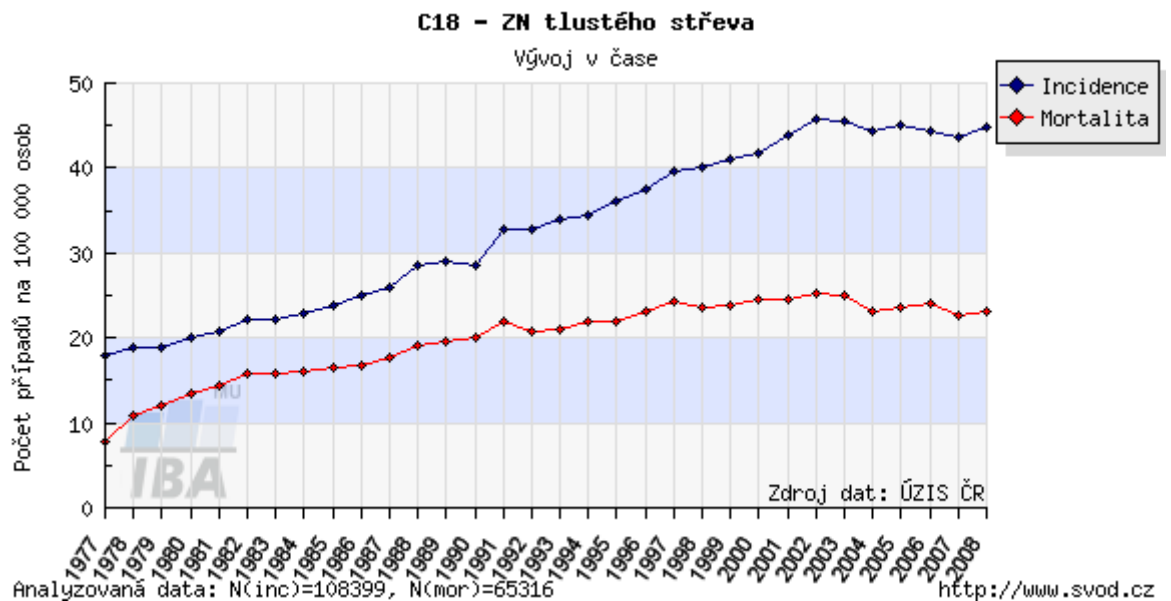
Nádorová onemocnění jsou stále jednou z hlavních příčin úmrtí obyvatelstva České republiky. Jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí, hned po onemocnění oběhové soustavy (**Obrázek 1**, ČSÚ, 2011). V roce 2008 bylo do Národního onkologického registru ČR nově nahlášeno celkem 77 541 případů zhoubných novotvarů a z toho 27 571 onemocněných na následky nemoci umírá. Počet nově zjištěných nádorů v absolutním počtu stoupl u obou pohlaví oproti roku 2007 o 2 % u mužů, respektive o 1,5 % u žen (ÚZIS ČR, 2011). Zatímco úroveň incidence např. novotvarů tlustého střeva v České republice v dlouhodobém pohledu roste, trend úmrtnosti je sestupný (**Obrázek 2**, SVOD, 2011). Zlepšující se kvalita lékařské péče, lepší organizace protinádorové léčby a časnější diagnostika nádorových onemocnění přispívá ke snižující se tendenci mortality, ale zároveň přispívá i k nárůstu počtu hlášených zhoubných nádorů (ÚZIS ČR, 2011).



Obrázek 1 Nejčastější příčiny úmrtí v České republice za rok 2009.
Upraveno podle údajů Českého statistického úřadu (ČSÚ, 2010)

Hlavní příčinou vzniku zhoubného bujení bývá kombinace vnitřních faktorů (genetická výbava a funkce imunitního systému) a faktorů vnějších, mezi které řadíme častější expozici člověka fyzikálním a chemickým kancerogenům, jejichž zvýšený výskyt je důsledkem znečištění životního prostředí. Jedním z dalších faktorů je věk, kdy ve vyšším věku dochází k hromadění spontánních mutací a genetické

nestabilitě, čímž dochází ke zvýšení rizika vzniku spontánních a indukovaných mutací.



Obrázek 2 Časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100000 osob) pro zvolenou diagnózu v celé populaci. Převzato z <http://www.svod.cz>

Léčba nádorových onemocnění je komplikována zejména skutečností, že terapií potřebujeme zcela zničit buňky nikoli cizorodé, jako je tomu například u bakteriálních infekcí, ale tělu vlastní. Nádorové buňky jsou buď natolik podobné zdravým buňkám, že nejsou imunitním systémem rozeznávány, nebo využívají právě mechanismy, jimiž paralyzují některé „zbraně“ imunitního systému (Hořejší & Bartůňková, 2002).

1.1 KANCEROGENEZE

Za kancerogenezi (někdy též karcinogenezi) je považován proces transformace nenádorové buňky v nádorovou, následné dělení buněčného klonu, včetně další dediferenciace a zvyšování maligního potenciálu dělících se buněk. Jako **nádor** (tumor, novotvar, neoplasma) je obecně označován patologický útvar tvořený tkání, jejíž růst se vymkl kontrole organismu a roste na něm nezávisle (Vokurka, 1994).

1.1.1 Nádorová onemocnění

Existuje mnoho typů nádorového bujení, ale jedno je všem společné. Na počátku každého nádorového onemocnění stojí změna na úrovni buněčného jádra, změna v genetické informaci, která způsobuje, že se buňka postupně vymaňuje z regulačních mechanismů růstu a diferenciaci a začíná se nekontrolovatelně množit (Foretová et al., 2001).

Rakovina může zasáhnout kterýkoliv orgán nebo tkáň. Většina případů rakoviny se týká epitelálních tkání. Jejich buňky jsou totiž v první linii obrany organismu proti nepříznivým faktorům prostředí, k nimž patří i faktory kancerogenní. Nejčastěji bývají zasaženy plíce, kůže, střevo aj. (Rosypal, 2002).

Nejpoužívanější způsob klasifikace nádorů je založen na jejich tkáňovém původu a buněčném typu. Podle schopnosti nádoru proniknout do jiné tkáně a proliferovat v ní za tvorby nového nádoru, tedy podle schopnosti metastázovat, jsou nádory označovány za **benigní a maligní**. Benigní (nezhoubné) nádory jsou charakteristické ohraničeným okrajem, snadno chirurgicky odstranitelné a nešíří se do jiných tkání. Naproti tomu **maligní** (zhoubné) nádory se šíří metastázou mohou (Stiborová & Mikšanová, 1999). Původní maligní nádor se označuje jako **primární**, jeho implantát v nové tkáni pak jako **sekundární** (Rosypal, 2002).

1.1.2 Mechanismus kancerogeneze

Dnes je pohlíženo na zhoubné nádory jako na genetické onemocnění. Již koncem šedesátých let formulovali Haubner a Todaro hypotézu o existenci specifických genů zodpovědných za změny, které vyústí v maligní transformaci buňky. Vznik těchto genů (onkogenů) je podmíněn mutací genů přirozených (protoonkogenů) (Weinberg, 2003).

Je známo, že mutace genů vznikají spontánně, ale jejich frekvence je tak nízká (asi 10^{-6} na jedno buněčné dělení), že vzhledem k odhadovanému celkovému počtu buněčných dělení během života (u člověka asi 10^{16}) by riziko možného vzniku nádoru na podkladě spontánních mutací bylo zanedbatelné. Za vznik mutací jsou však zodpovědné četné vnější faktory (mutageny). Při expozici mutagenům během života by naopak incidence nádorů musela být mimořádně vysoká, pokud by v organismu neexistovaly

žádné mechanismy, kterými lze poškozené geny eliminovat nebo opravit. Kancerogeneze je značně složitý proces, který do všech podrobností ještě není znám (Klener, 2002).

Geny kódující proteiny, které se zapojují do regulace buněčného růstu a diferenciaci (růstové faktory, receptory, proteinkinasy, transkripční faktory, cyklin dependentní kinasy), se nazývají **protoonkogeny**; produkty těchto genů jsou pak označovány jako protoonkoproteiny (Stiborová & Mikšanová, 1999). Vedle protoonkoproteinů se na regulaci buněčného cyklu podílí také **tumor supresorové geny** (antionkogeny), jejichž produkty potlačují proliferaci normálních somatických buněk a udržují je ve stadiu klidu. Zjednodušeně lze říci, že k maligní transformaci buňky dochází v důsledku **změny** (mutace) v **protoonkogenech a tumor supresorových genech** (Stiborová & Mikšanová, 1999).

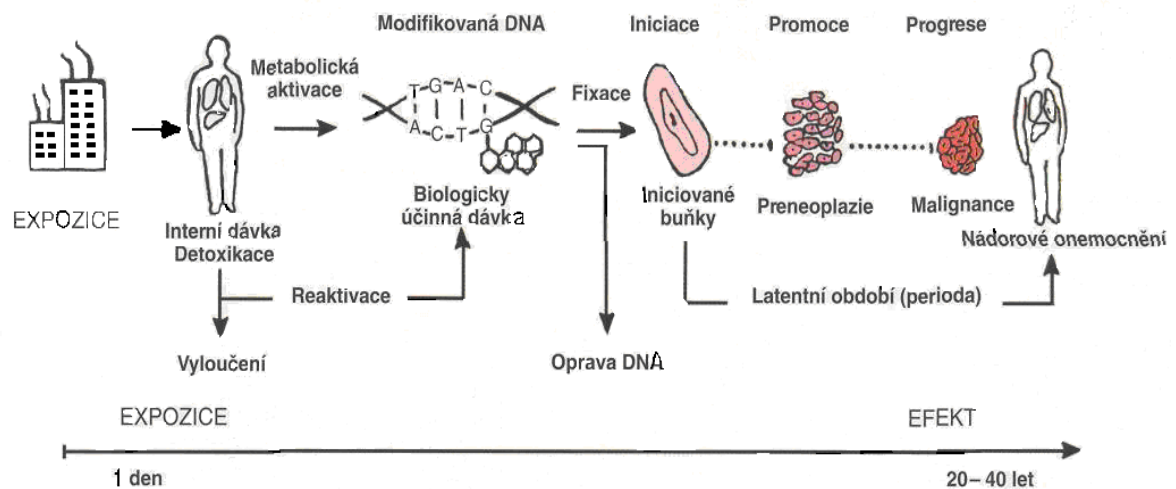
Proces kancerogeneze je možno rozdělit do tří fází: iniciační, promoční a progresní (**Obrázek 3**, str. 17).

V **iniciační fázi** dochází ke změně genetické informace normální buňky, která vede ke vzniku modifikace v DNA. Mutace v určitém kritickém genu přináší iniciovaným buňkám růstovou selekční výhodu (Masopust, 2002). Tato mutace může zůstat bez funkčních důsledků řadu let nebo být eliminována opravnými mechanismy (Klener, 2002). Pokud iniciovanou buňku nezlikviduje ani imunitní systém, může se v dalších stádiích vyvinout až v nádor.

Ve stádiu **promoce**, které trvá léta až desetiletí, se ještě více zvyšuje proliferace primárně pozměněných buněk pod vlivem látek - promotorů. Většina z nich má pouze epigenetické vlastnosti, jejich účinek se proto může projevit až po působení genotoxických iniciátorů. Většina promotorů je tkáňově specifická (např. forbolester - specifický promotor pro vznik nádorů kůže) (Stiborová & Mikšanová, 1999). Při jejich metabolismu často dochází ke vzniku aktivních forem kyslíku, které mohou vyvolat oxidační změny v DNA a tak aktivovat protoonkogen. Častým mechanismem účinku promotorů je rovněž aktivace protein kinasy c (Stiborová & Mikšanová, 1999).

Poslední stádium kancerogeneze se nazývá **progrese**. Působením progresorů, látek s genotoxickým účinkem, se pak mění dosud částečně kontrolovaný růst benigního nádoru na růst nekontrolovaný. Vzniká maligní nádor, z něhož se odštěpené buňky mohou dostat krevními nebo lymfatickými cestami do jiných tkání nebo orgánů, a vznikají tak metastáze. Velmi důležitou podmínkou pro růst nádoru je dostatečný přísuv živin a kyslíku. Ten musí

být zajištěn vytvořením cévního zásobení (nádorová neoangiogeneze) (Stiborová & Mikšanová, 1999).



Obrázek 3 Schéma vícestupňového procesu kancerogeneze (Stiborová & Mikšanová, 1999).

1.1.3 Kancerogenní faktory

Faktory vnějšího prostředí, které se podílejí na vzniku nádorů, jsou značně rozdílné. Mohou vyvolat různá poškození **DNA**. Rizikové faktory můžeme podle jejich povahy rozdělit do skupin na **biologické faktory**, do kterých řadíme genetické předpoklady a některé viry. Odhaduje se, že až 15 až 20 % případů rakoviny je způsobeno onkoviry (Stiborová & Mikšanová, 1999). Dalšími faktory jsou faktory **fyzikální**, za nejvýznamnější z těchto faktorů je považováno záření, a to jak ionizující, tak UV. Dále některé druhy velmi jemných pevných částic, např. azbestu nebo sloučenin berylia, posledními jsou faktory chemické, do nichž můžeme zařadit kancerogeny.

V současné době je **chemickým faktorům** věnována velká pozornost. Mezinárodní institut pro výzkum rakoviny (IARC, International Agency for Research on Cancer, <http://www.iarc.fr/>) uvádí 107 prokazatelných kancerogenů vyvolávajících nádorová onemocnění u člověka. Podle mechanismu působení je můžeme rozdělit na **genotoxické kancerogeny**, které se váží na DNA kovalentní vazbou za vzniku aduktů, **epigenetické kancerogeny** - modifikují DNA nekovalentními vazbami, např. interkalací do její

dvoušroubovicové struktury a **kancerogeny vyvolávající změny struktury DNA** - jako jsou jedno a dvouřetězové zlomy, cross-linking atd. (Stiborová & Mikšanová, 1999).

1.1.4 Chemické kancerogeny

Kancerogeny jsou chemická agens, způsobující rozvoj nádorového onemocnění, mohou být rozděleny do dvou hlavních skupin na základě jejich mutagenního účinku, a to na: **genotoxické kancerogeny**, které poškozují DNA a jsou považovány za mutageny a **epigenetické kancerogeny**, které za mutageny považovány nejsou (Hodgson, 2004).

Seznam chemikálií, které jsou schopny vyvolat rozvoj rakoviny je rozsáhlý. Tyto látky vykazují značnou tkáňovou specifitu pro vznik novotvaru.

Mezi chemické kancerogeny řadíme jak organické látky, které zaujímají velké procento v této skupině, anorganické sloučeniny a stejně tak i biologické aktivní látky jako jsou hormony (Alison, 2004).

Rozdělení kancerogenů v České republice podle Nařízení vlády č. 258/2001Sb. je následující:

Kategorie 1 lidské kancerogeny; za tyto kancerogeny lze považovat látky, u nichž jsou dostatečné důkazy z epidemiologických studií, které podporují příčinnou souvislost mezi expozicí látky a vzniku rakoviny.

Kategorie 2 předpokládané lidské kancerogeny; látky, na něž je třeba pohlížet, jako by byly kancerogenní pro člověka. U této skupiny existují dostatečné důkazy dovolující závažný předpoklad, že expozice člověka látce může mít za následek rozvoj nádorového onemocnění. Tato tvrzení jsou obvykle na základě příslušných dlouhodobých studií na zvířecích modelech a jiných závažných informací.

Kategorie 3; látky, které mohou vyvolat obavy vzhledem k možným kancerogenním účinkům, u kterých však jsou dostupné informace o kancerogenitě nedostačující pro uspokojivé posouzení. Existují však některé důkazy na základě příslušných studií na zvířecích modelech, nejsou však dostačující pro zařazení látky do kategorie 2.

Zařazení látky do kategorie 1 se provádí na základě epidemiologických údajů, zařazení do kategorie 2 a 3 je založeno především na pokusech na zvířecích modelech.

Pro klasifikaci látky jako kancerogenu zařazeného do kategorie 2 je zapotřebí buď pozitivních důkazů na dvou živočišných druzích, nebo zcela pozitivní nález u jednoho živočišného druhu, společně s doplňujícími nálezy, jako jsou údaje o genotoxicitě, výsledky metabolických nebo biochemických studií, vznik benigních nádorů, strukturní vztah k jiným známým kancerogenům, nebo údaje z epidemiologických studií svědčících o spojitostech.

Kategorie 3 ve skutečnosti obsahuje ještě 2 subkategorie:

a) Látky, které jsou dobře prozkoumány, ale u nichž nejsou postačující důkazy o vyvolání nádoru pro zařazení do kategorie 2. Neočekává se, že by další pokusy poskytly další informace vztahující se ke klasifikaci.

b) látky, které nejsou dostatečně prozkoumány. Dostupné údaje jsou nedostačující, ale jsou znepokojující pro lidi. Tato klasifikace je dočasná, před provedením konečného rozhodnutí je zapotřebí provést další pokusy (převzato z Sbírkou zákonů ČR, 2001).

1.1.5 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou velké planární sloučeniny, které obsahují dvě a více kondenzovaných aromatických jader. Vznikají při různých procesech nedokonalého spalování nebo hoření organické hmoty a dále při průmyslových procesech. PAU jsou uvolňovány do atmosféry jako směs sloučenin, které jsou považovány za potenciální kancerogeny pro člověka a jako polutanty pro životní prostředí. Lidská populace je vystavena PAU několika různými cestami. Pro nekuřáky je nejčastější cestou vstupu perorálně potravinami obsahující PAU, pro kuřáky je touto cestou spíše inhalace kouře (Alexander et al., 2008). Na základě důkazů z experimentů mutagenicity a genotoxicity na zvířecích modelech (IARC 1973, 1983, 1987), je 15 PAU (viz *Tabulka 1*) považováno za lidské kancerogeny.

Potraviny mohou být kontaminovány již při pěstování, vlivem znečištěného životního prostředí, nebo následně při tepelné úpravě. Ke kontaminaci PAU může dojít během uzení, zahřívání nebo sušení, kdy může dojít k přímému kontaktu potravin s produkty spalování. Znečištění životního prostředí může rovněž způsobit kontaminaci

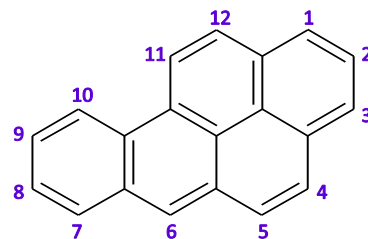
polycyklickými aromatickými uhlovodíky, zvláště v případě ryb a produktů rybolovu (Nařízení komise ES, 2006).

Tabulka 1 Polycyklické aromatické uhlovodíky považované za lidské kancerogeny

benz[a]anthracen	7H-dibenzo[c,g]karbazol	indeno[1,2,3-cd]pyren
benzo[b]fluoranthen	dibenzo[a,e]pyren	5-methylchrysen
benzo[j]fluoranthen	dibenz[a,h]akridin	dibenzo[a,h]pyren
benzo[k]fluoranthen	dibenz[a,j]akridin	dibenzo[a,i]pyren
benzo[a]pyren	dibenz[a,h]anthracen	dibenzo[a,l]pyren

1.1.5.1 Benzo[a]pyren

Benzo[a]pyren ($C_{20}H_{12}$), polycyklický uhlovodík s pěti aromatickými kruhy (**Obrázek 4**) Jedná se jak o přirozenou složku prostředí (sopečné výbuchy, požáry lesů apod.), tak i uměle vytvořenou (hoření fosilních paliv, tepelná úprava jídel, apod). BaP je označován za jednu z hlavních složek cigaretového kouře (Alam et al., 2008, Roffo et al., 1940) a proto je označován za jednoho z nejvýznamnějších viníků vzniku rakoviny plic u kuřáků. (Cornfield et al., 2009). Je prokázaným kancerogenem jak pro hlodavce, tak i pro člověka (Cancer IARC Classification 2010). Benzo[a]pyren, respektive jeho reaktivní metabolit 7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) vytváří kovalentní adukty s DNA v *in vivo* i *in vitro* experimentech (Phillips, 2005).

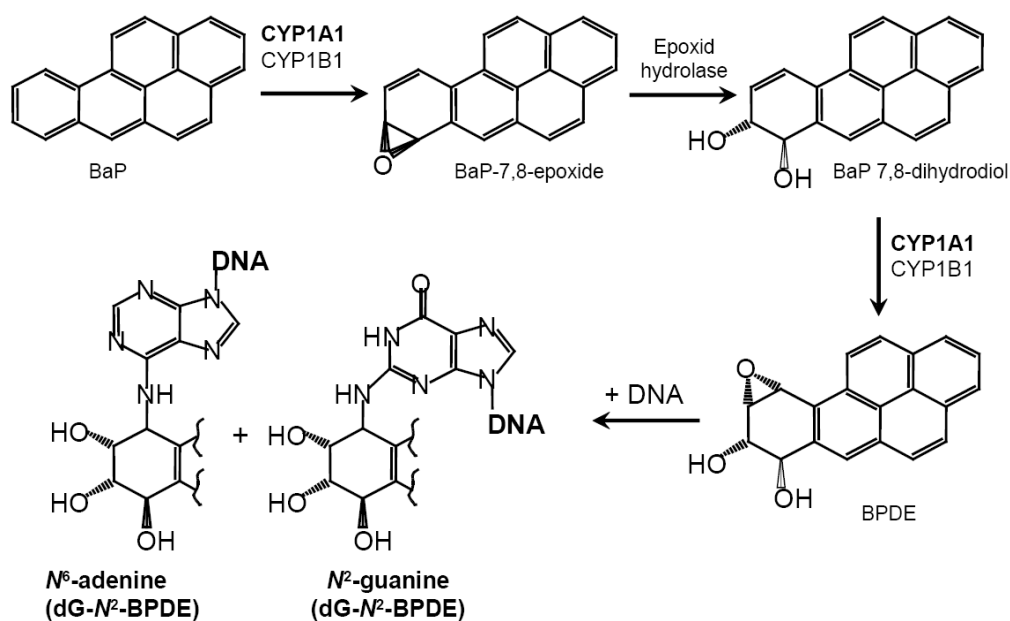


Obrázek 4 Struktura benzo[a]pyrenu

Benzo[a]pyren je jedním z PAU, který je po své metabolické aktivaci cytochromy P450 přeměněn na „ultimální“ mutagen, benzo[a]pyren diol epoxid, který se po interkalaci do dvoušroubovicové struktury DNA kovalentně váže na nukleofilní skupinu deoxyguaninu v poloze N2. Benzo[a]pyren je schopen zvyšovat hladinu exprese enzymů MFO systému; cytochromu P450 1A1 a 1A2 (Arlt, 2008). Působí především přes Ah receptor (aryl hydrocarbon receptor), tímto mechanismem stimuluje expresi mnoha proteinů I. i II. fáze biotransformace.

1.1.5.1.1 Metabolismus benzo[a]pyrenu a tvorba kovalentních aduktů s DNA

Benzo[a]pyren je aktivován oxidačními reakcemi, katalysovanými hemovými enzymy, cytochromy P450 (CYP). V prvním kroku je benzo[a]pyren oxidován cytochromy P450 1A1 a 1B1 na 7,8-epoxid benzo[a]pyren, který je záhy přeměněn epoxid hydrolasou na 7,8-dihydroxybenzo[a]pyren. Další reakcí katalyzovanou CYP1A1/1B1 je oxidován na 7,8-dihydroxy-9,10-epoxybenzo[a]pyren, který vytváří kovalentní adukty s DNA (**Obrázek 5**). Genotoxický účinek benzo[a]pyrenu je závislý na několika faktorech, i) metabolické aktivaci benzo[a]pyrenu cytochromy P450 a dalšími enzymy I. fáze biotransformace, ii) detoxikaci reaktivních intermediátů vzniklých právě metabolickou aktivací, iii) rychlosti reparace poškozených úseků DNA, způsobených kovalentní modifikací a iv) indukci exprese genů kódujících proteiny odpovědných za aktivaci, detoxikaci xenobiotik a proteinů schopných reparovat DNA.



Obrázek 5 Schéma metabolické aktivace a tvorba aduktů benzo[a]pyrenu s DNA.

1.2 LÉČBA NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Ve většině případů nestačí k vyléčení nádorového onemocnění jediná, byť velmi účinná léčebná metoda. Větší naději na úspěch má komplexní přístup, kombinující základní terapeutické metody: chirurgickou léčbu, radioterapii a chemoterapii (včetně terapie hormonální).

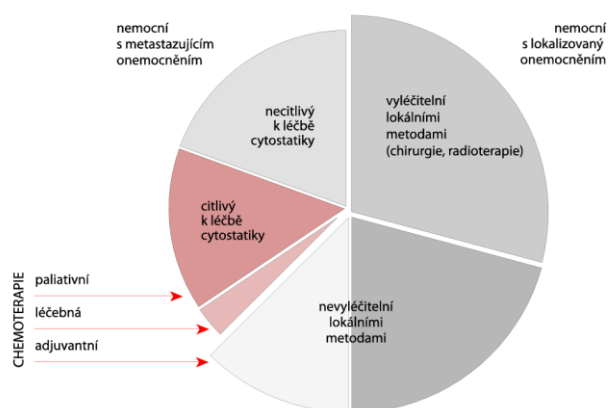
Chirurgicky lze odstranit objemný nádor, pokud neprorůstá do vitálně důležitých struktur a je lokalizovaný, ozářením lze pak do jisté míry eliminovat nádor residuální. Diseminovaný nádorový proces však může ovlivnit jedině chemoterapie. U některých typů nádorů, spíše však ve speciálních případech, se uplatňuje i imunoterapie. Léčbou budoucnosti by se mohla stát terapie genová (Klener, 1996, 2002).

1.2.1 Chemoterapie

Chemoterapie je metoda, která využívá k léčbě nádorových onemocnění účinek chemických sloučenin (cytostatik). Přes významné pokroky, kterých bylo v léčbě nádorů chemoterapií dosaženo, nejsou dnešní možnosti protinádorové terapie zcela uspokojivé. Nádorová onemocnění se vyznačují značnou heterogenitou a nelze tedy nalézt žádné universální léčivo, které by fungovalo proti všem typům nádorů. Citlivost nádorů k chemoterapii je pro různá nádorová onemocnění značně rozdílná. Podle toho může být chemoterapie rozdělena do několika kategorií (Klener, 1999, 2002) (**Obrázek 6**).

Kurativní chemoterapie, což je cytostatická léčba podávaná s cílem úplného vyléčení nádorového onemocnění. Jejím předpokladem je vysoká citlivost daného nádoru k chemoterapii. **Paliativní chemoterapie**, kdy je naděje na vyléčení málo pravděpodobná, ale léčbou je možno zlepšit kvalitu života nemocného a prodloužit dobu přežití. **Adjuvantní chemoterapie**, která doplňuje nebo zvyšuje účinnost jiné základní léčebné metody (chirurgická léčba, radioterapie). Jejím cílem je likvidace zbytkové populace nádorových buněk. **Neoadjuvantní chemoterapie**, podání cytostatické léčby před chirurgickým výkonem nebo před radioterapií. Zlepšuje operabilitu nádorů.

Podstatou protinádorového účinku chemoterapie je inhibice buněčné proliferace, popřípadě stimulace apoptosy. Chemoterapie uplatňuje svůj účinek téměř výhradně na buňkách nacházejících se v aktivních fázích buněčného cyklu. Antiproliferační účinky chemoterapie nejsou selektivní, týkají se jak buněk nádorových, tak i buněk normálních (zejména krvetvorných), což vysvětluje četné nežádoucí účinky. Cílem je tyto vedlejší účinky maximálně omezit a co nejvíce snížit počet nádorových buněk nebo je zcela odstranit (Klener, 1996, 1999).



Obrázek 6 Grafické znázornění uplatnění chemoterapie ve vztahu k pokročilosti onemocnění (Klener, 1996)

Není to lehký úkol, protože nádor se klinicky projeví až tehdy, obsahuje-li více než 10^9 buněk. V této době se růst nádoru začíná zpomalovat, neboť přibývá buněk nacházejících se v klidové fázi buněčného cyklu, jejichž citlivost k chemoterapii je omezená. Jednou léčebnou kúrou je možno zničit až 99 % nádorových buněk, což ale znamená například pokles jen z 10^{12} na 10^{10} buněk. Současně je ovšem zničeno i 99 % normálních proliferujících buněk. Ty mají kratší generační čas a mohou rychleji regenerovat. Aby byla regenerace umožněna, je nutno léčbu vždy na určitou dobu přerušit.

V tomto období však dochází i k doplnění nádorové populace. S rostoucí velikostí nádoru se původně homogenní klon vlivem mutací stává heterogenní populací, v níž některé klony ztrácejí citlivost k chemoterapii (Klener, 1999).

1.2.2 Mechanismus účinku cytostatik

Cytotoxický účinek chemoterapeutik používaných v současné době v onkologické praxi lze vysvětlit několika hlavními mechanismy (Klener, 1996,2002).

Přímé poškození struktury nukleových kyselin, což má za následek alteraci jejich biologických funkcí, hlavně inhibici replikace a transkripce. Ke strukturnímu poškození nukleových kyselin může dojít různými mechanismy. Mezi nejčastější mechanismy účinku

cytostatik patří *alkylace* (deriváty platiny, cyklofosfamid, deriváty nitrosomočoviny, mitomyciny), *interkalace* (antracykliny), *inhibice topoisomeras*, *rozštěpení molekuly DNA*.

Alterace mikrotubulárního proteinu. Látky poškozující strukturu a funkci mikrotubulů jsou někdy nazývány jako „mitotické jedy“, protože svůj cytotoxický účinek uplatňují převážně v průběhu mitosy. Alterace mikrotubulů poškodí funkci dělicího vřeténka, které zajišťuje správnou migraci chromosomů k pólům dělicí se buňky (kolchicin, vinkristin, vinblastin, taxany).

Inhibice klíčových enzymů metabolismu, která vede k poruše biosyntézy nukleových kyselin s následnou inhibicí buněčného dělení. Látky působící tímto mechanismem se zpravidla označují jako antimetabolity (př. analoga kyseliny listové a nukleotidů). Jedním z příkladů je methotrexát, který je účinným inhibitorem enzymu dihydrofolátreduktasy. Inhibuje redukci kyseliny dihydrolistové na tetrahydrolistovou. Antifolika (methotrexát) mají k dihydrofolátreduktase vyšší afinitu než její přirozený substrát, a tím účinně blokuji tento enzym.

Inhibice proteosyntézy se s výjimkou použití L-asparaginasy v onkologii příliš neuplatnila, zejména pro svou značnou toxicitu.

Poškození buněčné membrány. Tohoto mechanismu se využívá velmi sporadicky.

1.2.3 Farmakokinetika cytostatik

Farmakokinetika cytostatik zahrnuje řadu dílčích pochodů, které spolu velmi úzce souvisejí a vzájemně na sebe navazují (Klener, 1999).

Resorpce - rychlost a stupeň resorpce je závislá na řadě faktorů, z nichž nejvýznamnější jsou aplikační cesty, aplikační formy (rozpustnost) a průnik cytostatik membránami (pasivní či usnadněná difuze, aktivní transport, filtrace membránovými póry, pinocytosa).

Distribuce je komplexním procesem, v němž se uplatňuje celá řada faktorů. Koncentrace cytostatika v jednotlivých orgánech i v cílové tkáni je dána mimo jiné prokrvením příslušné tkáně či nádoru. V intravaskulárním prostoru může docházet v různé míře k vazbě na krevní elementy nebo na bílkoviny krevní plasmy (převážně nespecificky na albuminovou frakci), což může být příčinou snížené dostupnosti léčiva pro cílové tkáně. Z extracelulárního prostoru může docházet k vazbě cytostatika na necílové tkáně.

Po průniku membránou se jen část váže přímo na cílový receptor. Zbývající část vazbou na intracelulární bílkoviny a lipidy tvoří jakousi rezervu.

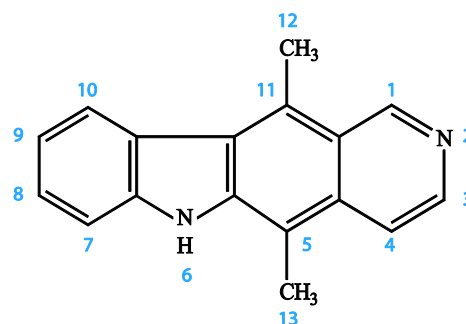
Biotransformace (kap. 1.4) mění účinnost a fyzikální vlastnosti látky (metabolity jsou polárnější). Metabolické přeměny léčiv se účastní jednak enzymy intermediálního metabolismu, jednak enzymy přítomné v tzv. mikrosomální frakci buněk. Aktivita biotransformačních enzymů může být ovlivněna např. současně podávanými léky.

Vylučování ledvinami závisí na faktorech extrarenálních (povaha látky, vazba na bílkovinu, biotransformace) a renálních (glomerulární filtrace, tubulární sekrece). Snadno jsou exkretovány polární metabolity, naopak lipofilní látky jsou často v tubulech zpětně resorbovány. Vylučování játry je časté u cytostatik s velkými molekulami (antibiotika).

1.3 ELLIPTICIN

Ellipticin (5, 11-dimethyl-6*H*-pyrido[4, 3-*b*] karbazol, **Obrázek 7**) a některé jeho deriváty jsou alkaloidy izolované z rostlin čeledi *Apocynaceae* (*Ochrosia elliptica*, *Ochrosia borbonica*, *Excavatia coccinea*) vykazující významnou protinádorovou aktivitu (Dalton et al., 1967; Le Pecq et al., 1974; Röuesse et al., 1985; Mathé et al., 1998). Byla zjištěna i jejich anti-HIV aktivita. Zkoumáno je proto i použití ellipticinu při inhibici reversní transkriptasy při léčbě AIDS (Mathé, 1998; Sharples, 2001).

Ellipticin samotný a jeho polárnější deriváty 9-hydroxyellipticin a 2-methyl-9-hydroxyellipticin jsou ve formě acetátu užívány zejména k léčbě pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázemi, akutní myeloblastické leukémie, sarkomů ledvin a karcinomu štítné žlázy (Klener, 1996; Acton et al., 1994). Výhodou ellipticinu je jednak jeho vysoká účinnost proti nádorovým onemocněním, a také jeho nízké vedlejší účinky. Až na nefrotoxicitu, která je svým mechanismem vzniku podobná nefrotoxicitě cis-platiny, jsou další vedlejší toxické účinky ellipticinu minimální. Hematologická toxicita je dokonce prakticky nulová (Klener, 1996; Juret et al., 1979).



Obrázek 7 Struktura ellipticinu

1.3.1 Mechanismus účinku ellipticinu

Ellipticin vykazuje několik mechanismů účinku jako je:

Interkalace do dvoušroubovicové struktury DNA (Ashby et al., 1980; Bertrand & Giacomoni, 1985; DeMartini et al., 1992; Klener, 1996), která vyplývá z velikosti a tvaru molekuly ellipticinu. Interkalace ellipticinu je způsobena slabými reversibilními interakcemi mezi spárovanými bázemi molekuly DNA (Auclair, 1987). Vzájemné působení mezi methylovou skupinou ellipticinu a thyminem v interkalačním místě je rozhodující pro orientaci této sloučeniny v DNA (Singh et al., 1994). Díky své fluorescenci je ellipticin používán i jako modelová interkalační sloučenina (Singh et al., 1994; Chu & Hsu, 1992).

Inhibice topoisomerasy II. Ellipticin interaguje buď s molekulou DNA nebo s proteinem topoisomerasy II za tvorby ternárního komplexu, který je katalyticky neaktivní a vede ke stimulaci tvorby řetězových zlomů v DNA (Froelich-Ammon et al., 1995).

Selektivní inhibice fosforylace proteinu p53 (Ohashi et al., 1995; Sugikawa et al., 1999), která je pravděpodobně způsobena inhibicí specifické cyklin-dependentní kinasy. Nahromadění defosforylovaného proteinu p53 může vyústit v indukci apoptosy.

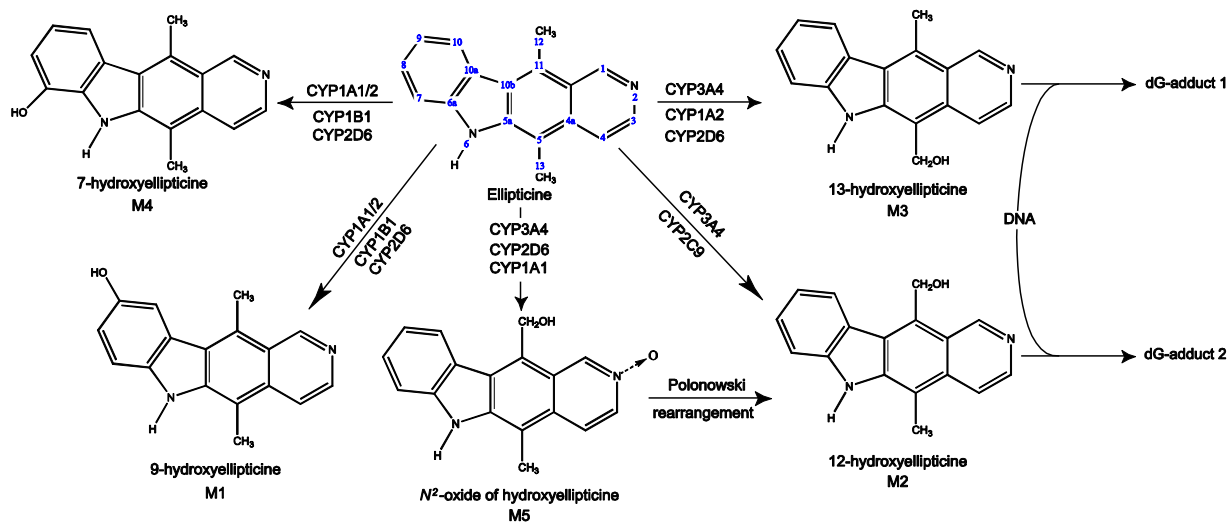
Inhibice oxidační fosforylace, jež vede k drastickému snížení obsahu ATP v buňkách, což vede k jejich zániku (Schwaller et al., 1995).

Inhibice telomerasy (Auclair, 1987).

Tvorba kovalentních aduktů s DNA. Ellipticin je v průběhu metabolismu v organismu aktivován na farmakologicky účinnější metabolity, které se kovalentně váží na DNA (Stiborová et al., 2001a, 2003a, 2004a; Bořek-Dohalská et al., 2004), může tedy působit jako alkylační činidlo. Tento mechanismus by mohl vysvětlovat jeho vysokou účinnost v protinádorové terapii. Cytostatika kovalentně modifikující DNA jsou jedněmi z nejsilnějších protinádorových agens.

1.3.2 Biotransformace ellipticinu

Ellipticin je cytochromy P450 (CYP) oxidován na pět metabolitů (**Obrázek 8**).

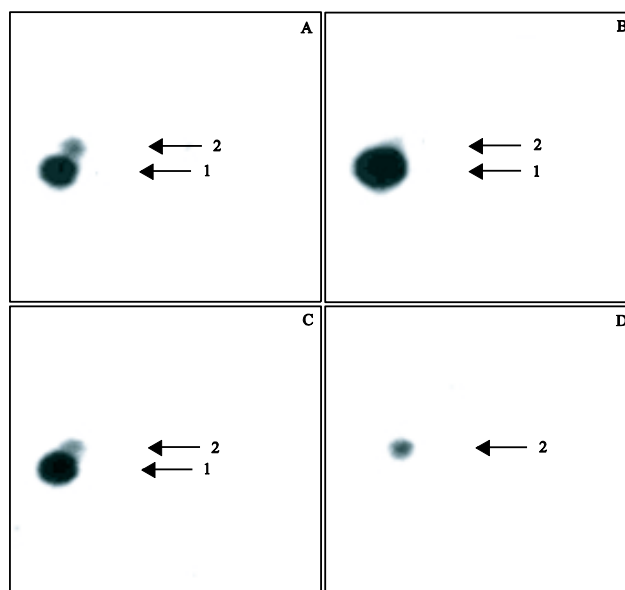


Obrázek 8 Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 (Stiborová et al., 2004a, 2007a).

Metabolity 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin, 7-hydroxyellipticin a N(2)-oxid ellipticinu jsou tvořeny nejen lidskými jaterními mikrosomy, ale rovněž i mikrosomy modelových organismů (potkan a králík).

1.3.3 Tvorba aduktů ellipticinu s DNA

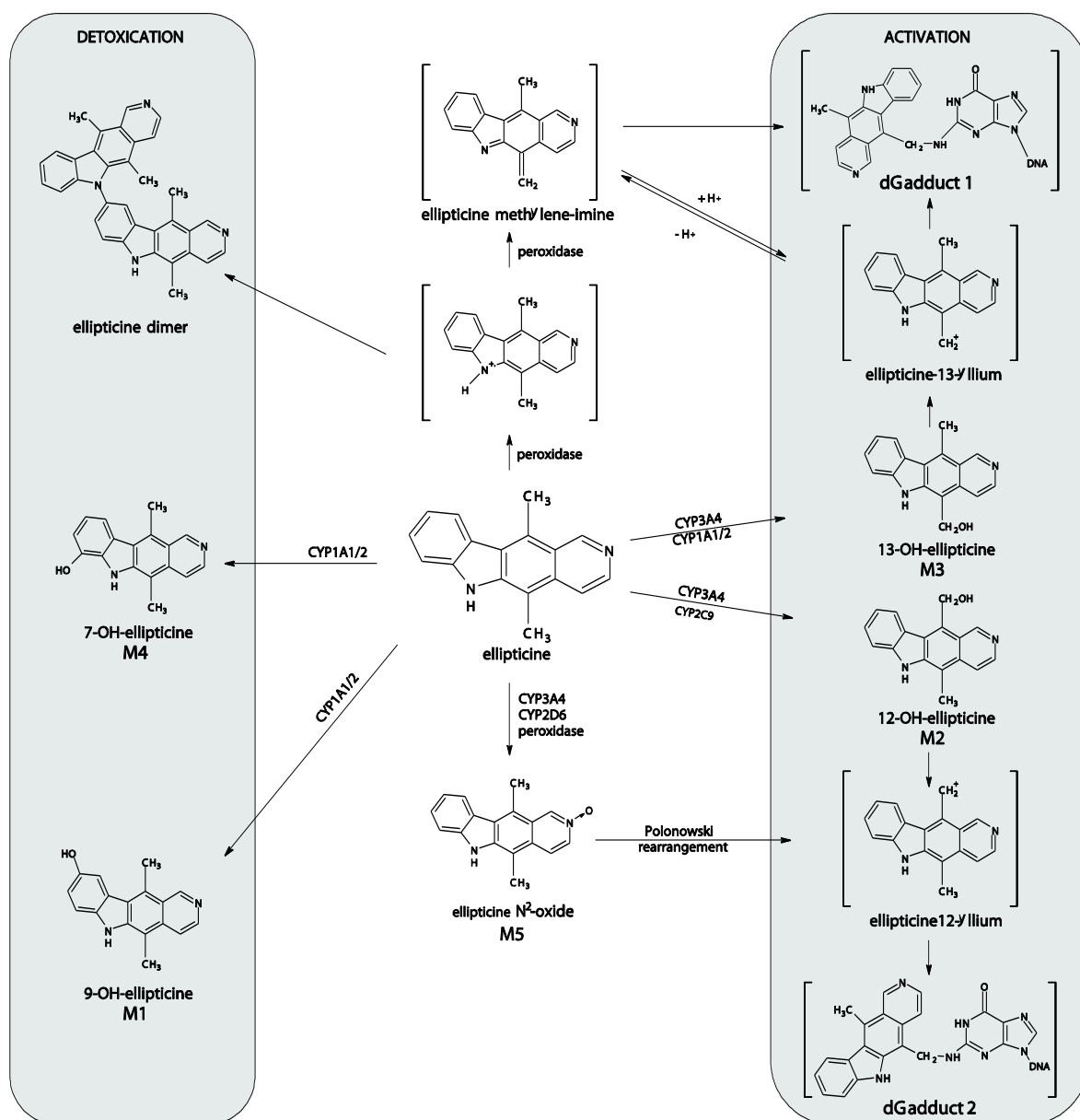
V průběhu biotransformace ellipticinu vznikají metabolity schopné kovalentní vazby s DNA. Tento fakt byl potvrzen pomocí dvou nezávislých metod, použitím [³H]ellipticinu a „³²P-postlabelingu“ (Stiborová et al., 2001a, 2004b). Detekovány byly minimálně dva adukty ellipticinu s DNA, které vznikaly ve všech testovaných systémech *in vitro* (Stiborová et al., 2001a) (**Obrázek 9**). Majoritní adukt (adukt 1), jehož vznik je závislý na přítomnosti aktivačních enzymů, a minoritní adukt (adukt 2), který vznikal i bez přítomnosti enzymového systému, pravděpodobně aktivací ellipticinu autooxidací (Stiborová et al., 2001a, 2003b).



Obrázek 9 Autoradiografie aduktů tvořených aktivovaným ellipticinem s DNA. K aktivaci byly použity mikrosomy potkana (A), králíka (B), lidské (C) a kontrolní vzorek bez mikrosomů (D) (Stiborová et al., 2003b).

Ellipticin generuje kovalentní adukty také v plicích fibroblastických buňkách křečka (V-79) transfekovaných lidskými CYP (Frei et al., 2002), *in vivo* v některých orgánech (játra, slezina, plíce, ledviny, srdce, mozek) potkana exponovaného touto protinádorovým léčivem (Stiborová et al., 2003a) a i v buněčných liniích lidského prsního adenokarcinomu (buňky MCF-7) (Bořek-Dohalská et al., 2004), leukemických buňkách (Poljaková et al., 2007), v buňkách neuroblastomu (Poljaková et al., 2009) a glioblastomu (Martínková et al., 2009). V těchto případech vznikají i další minoritní adukty. Kochromatografií tvořených aduktů pomocí TLC a rovněž HPLC bylo zjištěno, že se ve všech případech jedná o tytéž adukty 1 a 2 (Stiborová et al., 2003a,b; Bořek-Dohalská et al., 2004). Cílovým deoxynukleotidem modifikovaným aktivovaným ellipticinem v DNA je deoxyguanosin (Stiborová et al., 2003b). Jako metabolity zodpovědné za tvorbu kovalentních aduktů byly určeny 13-hydroxyellipticin (M3), který tvoří majoritní adukt 1 vazbou s deoxyguanosinem v DNA (Stiborová et al., 2004a) (**Obrázek 9**) a N(2)-oxid ellipticinu (M5), který je schopen Polonowskiho přesmykem přecházet na 12-hydroxyellipticin (M2), jehož vazbou na DNA vzniká adukt minoritní (Stiborová et al., 2004a, 2007a).

Ellipticin je aktivován oxidačními reakcemi, katalyzovanými dvěma typy hemových enzymů: cytochromy P450 (Stiborová et al., 2001a, 2003a,b; Frei et al., 2002) a peroxidasami (Stiborová et al., 2007) (**Obrázek 10**, str. 30). Oba typy enzymů jsou exprimovány i v cílových nádorových tkáních, pro jejichž léčbu je ellipticin určen (Murray et al., 1993; Williams & Phillips, 2000; El-Rayes et al., 2003), některé dokonce v množství vyšším než ve tkáni zdravé. K určení, které isoformy CYP jsou za aktivaci ellipticinu zodpovědné, bylo použito několika přístupů: selektivní inhibitory nebo induktory jednotlivých cytochromů P450, purifikované cytochromy P450 rekonstituované s NADPH:CYP reduktasou, dále mikrosomy hmyzích buněk transfekované Bakulovirem exprimující lidské cytochromy P450 a reduktasu (SupersomyTM) či korelace aktivity jednotlivých cytochromů P450 s množstvím vznikajících metabolitů. Bylo zjištěno, že hlavními enzymy odpovídajícími za aktivaci ellipticinu na metabolity schopné vazby s DNA jsou lidské isoformy CYP3A4, následované CYP1A1/2 a CYP1B1 (Stiborová et al., 2001a, 2003b). V organismu potkana dochází k aktivaci ellipticinu orthologními formami cytochromů, a to CYP3A1 a CYP1A1/2 (Stiborová et al., 2001a, 2003a,b). Králičí jaterní mikrosomy jsou v aktivaci ellipticinu velice účinné, ale orthologní CYP3A6 v této aktivaci nehraje hlavní roli. Více se na aktivaci podílí CYP2C3 (Stiborová et al., 2001a, 2003b).



Obrázek 10 Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 a peroxidasami. Tvorba kovalentních aduktů (Poljaková et al., 2011)

1.4 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK

Způsob přeměny a odstraňování nízkomolekulárních i vysokomolekulárních cizorodých látek (xenobiotik) se uskutečňuje mechanismy označovanými jako **biotransformace** (Němečková, 1991). Látky lipofilního charakteru, které procházejí membránami, se mohou v organismu kumulovat. Nemohou být z těla vyloučeny přímo, ale

musí být nejdříve přeměněny na polárnější metabolity, které budou z organismu vyloučeny snáze (Menn, 1978). Tyto hydrofilnější metabolity nemusí být jen netoxické, biologicky inertní látky, ale v závislosti na chemické struktuře daného xenobiotika a na enzymovém systému, který ho v organismu přeměňuje, se naopak může jednat o látky značného biologického významu. Místo **detoxikace** dané látky tedy dochází k její **aktivaci**. Takovou metabolickou aktivaci vyžaduje řada léčiv např. ellipticin, ale aktivováno je též 98 % genotoxických kancerogenů např. benzo[a]pyren, nitrosaminy, Sudan I (**Obrázek 11**, str. 33) (Stiborová et al., 2002a).

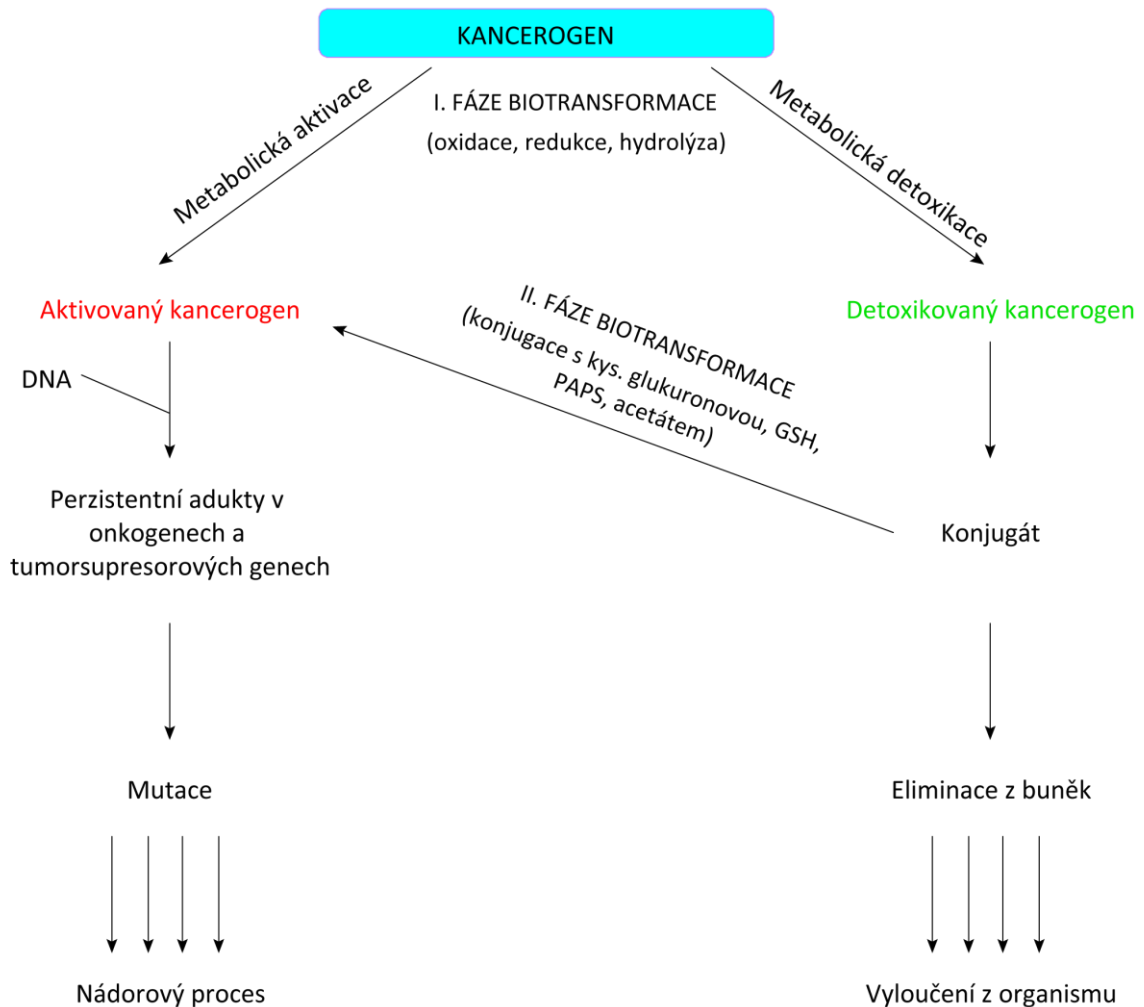
Biotransformace xenobiotik u různých organismů není totožná. Pro daný organismus jsou důležité integrita a směr metabolismu xenobiotika, které určují stupeň jeho toxicity (Škárka & Ferenčík, 1987). Průběh biotransformace je ovlivněn řadou faktorů. Na jedné straně je to samotná struktura cizorodé látky, na straně druhé řada rysů podmíněná organismem, do kterého bylo xenobiotikum vpraveno, např. biologický druh, dieta, způsob aplikace a další. K odchýlkám biotransformace dochází rovněž i v rámci jednoho biologického druhu v závislosti na stáří, pohlaví, individuální enzymové aktivitě, geneticky podmíněné variabilitě nebo farmakologicky navozené aktivitě enzymových systémů (Večerková, 1997).

U živočichů dochází k biotransformaci xenobiotik ve dvou fázích (Stiborová, 2002a). V první fázi, nazývané **derivatizační**, dochází ke zvýšení polariry především reakcemi oxidačními, ale i redukčními, které jsou důležité především pro nitro-, azo- a chinoidní sloučeniny. U některých sloučenin (například esterů a amidů) se pro zvýšení polariry uplatňují také hydrolytické reakce. Ve druhé fázi dochází ke **konjugaci** těchto polarizovaných molekul s endogenními látkami (kyselina glukuronová, glycin, taurin, aktivní sulfát, glutathion, cystein, aktivní acetát atd.) (Stiborová, 2002a).

I. fáze biotransformace: derivatizační fáze. V této fázi dochází ke zvýšení polariry xenobiotika zabudováním funkčních skupin do jeho molekuly nebo k demaskování funkčních skupin v molekule již přítomných (Kasper et al., 1980). To se děje nejčastěji oxidační cestou (C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace, dealkylace, deaminace, epoxidace, oxidace alkoholů, aldehydů a podobně), některé reakce probíhají hydrolyticky (hydrolyza esterů, amidů), nebo případně také redukčním mechanismem (nitro- a azoredukce). Příkladem kancerogenů aktivovaných redukční cestou jsou 2-nitroanisol (Stiborová et al., 1997), 1-nitropyren (Howard et al., 1982) či aristolochové kyseliny (Stiborová et al., 2001b, 2002c).

Hlavními enzymy katalyzující derivatizační reakce xenobiotik jsou především enzymy *mikrosomální frakce* (subcelulární systém získaný destrukcí endoplasmatického retikula při homogenisaci buněk), tak *cytosolu* (tímto pojmem je označován roztok cytoplasmu a izolačního pufru). Klíčovým enzymovým systémem I. fáze biotransformace je mikrosomální **systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO) s cytochromem P450 jako terminální oxidasou** (*kap. 1.5.2*), který provádí zejména většinu oxidačních reakcí. Dalšími enzymovými systémy participujícími na derivatizační fázi jsou **DT-diaforasa, hemové peroxidasy**, mikrosomální monooxygenasa obsahující flavin (Zieglerův enzym), alkohol- a aldehyddehydrogenasy a reduktasy (cytosolární xanthinoxidasa).

II. fáze biotransformace: konjugační fáze. Ve druhé fázi biotransformace jsou na reaktivní funkční skupiny vytvořené v derivatizační fázi vázány malé endogenní hydrofilní molekuly. Tímto krokem se ještě zvýší polarita původně hydrofobní molekuly a usnadní se tím její vyloučení z organismu. Exkrece nejčastěji probíhá močí a žlučí. Výkaly jsou vylučovány například konjugáty látek fenolické povahy s aktivním sulfátem nebo konjugáty karboxylových kyselin s glycinem nebo taurinem. Touto cestou také dochází k vyloučení endogenní sloučeniny, kyseliny cholové, která je finálním produktem degradace endogenních steroidních látek. Také v této fázi však může dojít k aktivaci xenobiotika na toxičtější sloučeninu (**Obrázek 11, str. 33**). Tak je tomu např. u konjugátů se sulfátem vznikajících z N-hydroxylovaných aromatických aminů účinkem **sulfotransferas** (sulfát musí být pro konjugační reakci nejprve aktivován na 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát = PAPS). Konjugát sulfátu s N-hydroxysloučeninami je v kyselém prostředí močových cest nestabilní a rozpadá se za vzniku nitréniového (event. karbéniového) iontu, vzniká tedy elektrofil reagující s DNA a proteiny (Stiborová et al., 2001b). K sekundární dekonjugaci může dojít i enzymovými systémy střevní mikroflóry (Turek et al., 1994).



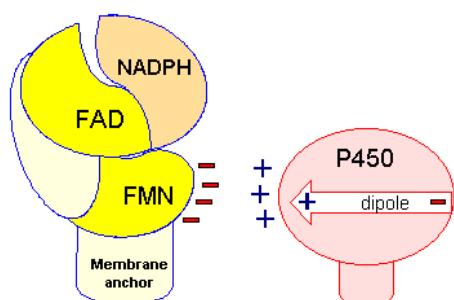
Obrázek 11 *Metabolická aktivace a detoxikace kancerogenu*
(převzato ze Stiborov et al., 2002c).

1.5 MIKROSOMÁLNÍ MONOOXYGENASOVÝ SYSTÉM (MFO SYSTÉM)

Mikrosomální monooxygenasový systém je soubor enzymů lokalizovaných na vnější straně endoplasmatického retikula (ev. mitochondrií). Tento systém katalyzuje celou řadu oxidačních, oxygenačních, popř. redukčních reakcí, přičemž využívá především molekulární kyslík (Coon, 1978). Je též označován jako systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases - MFO systém). Má tři základní složky: flavoproteinový enzym **NADPH:cytochrom P450 reduktasu** (kapitola 1.5.1), která slouží jako dělič elektronového páru, hemthiolátový enzym **cytochrom P450** (kap. 1.5.2) jako

terminální oxidasu a neméně důležitou součástí je též **membrána** endoplasmatického retikula (*kap. 1.5.3*). Fakultativně může MFO systém obsahovat také **cytochrom b₅** a **NADH:cytochrom b₅ reduktasu**.

MFO systém může být lokalizován i **na mitochondriální membráně**, jak je tomu zejména v kůře nadledvin, kde participuje na metabolismu endogenních látek (například steroidů a mastných kyselin). Systém lokalizovaný **Na vnější straně membrány hladkého**



i hrubého endoplasmatického retikula (Obrázek 12) v orgánech exponovaných látkám cizorodé povahy (játra, ledviny, plíce, GIT, kůže, mozek) se účastní první fáze biotransformace xenobiotik.

Obrázek 12 *Uspořádání MFO systému v membráně endoplasmatického retikula (převzato z www.uky.edu)*

1.5.1 NADPH:cytochrom P450 reduktasa

Enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasa (EC 1.6.2.4) je membránově vázaný „žlutý protein“, který katalyzuje přenos elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromu P450 (Schacter et al., 1972). V daném organismu je jedna forma NADPH:cytochrom P450 reduktasy schopna spolupracovat s více formami cytochromu P450. Přenos elektronů byl popsán také na cytochrom c, cytochrom b₅, hem oxygenasu, ferrikyanid, elongasu mastných kyselin a další (Gut et al., 1992). NADPH:cytochrom P450 reduktasa může být za určitých okolností zastoupena NADH:cytochrom b₅ reduktasou (Gut et al., 1992), které jako donor vodíku slouží NADH.

NADPH:cytochrom P450 reduktasa má dvě funkční domény, hydrofobní N-terminální (6 kDa), kterou je zakotvena v membráně (Kasper, 1971), a hydrofilní C-terminální katalytickou doménu (72 kDa) (Wang et al., 1997).

C-terminální funkční doména se skládá z FMN- a FAD-vazebné strukturní domény, „spojovací“ struktura umístěná mezi FMN- a FAD-vazebnou doménou pak zodpovídá za správnou prostorovou orientaci obou strukturních domén. FAD a FMN se vzájemně nepřekrývají, jsou v kontaktu prostřednictvím 7- a 8-methylových skupin

isoalloxazinových kruhů, které leží těsně u sebe a svírají úhel zhruba 150°. Přenos elektronů mezi flaviny je tedy patrně přímý, není zprostředkovaný zbytkem aminokyseliny, a proto je tento přenos rychlý (Wang et al., 1997).

FAD-vazebná doména je zodpovědná za nekovalentní vazbu NADPH; pozitivně nabitě aminokyseliny (arginin, lysin) v místě vazby NADPH interagují s negativně nabitou fosfátovou skupinou v poloze 2' ribosy, kterou se tento koenzym liší od NADH, a způsobují tak neobvykle vysokou selektivitu NADPH:cytochrom P450 reduktasy vůči NADPH.

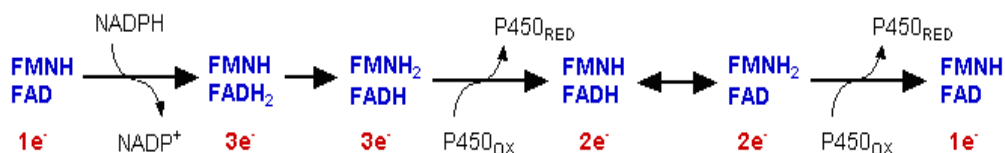
FMN-vazebná doména je zodpovědná za přenos elektronů na akceptorovou molekulu (cytochrom P450, cytochrom c). Pyrimidinová strana isoalloxazinového kruhu FMN se nachází blízko povrchu enzymu a je tak pro akceptorovou molekulu snadno dostupná (Stiborová et al., 2004c).

Interakce mezi NADPH:cytochrom P450 reduktasou a cytochromem P450 jsou hlavně elektrostatické povahy. Kladně nabitý povrch cytochromu P450 (lysiny, argininy) interaguje se záporně nabitým povrchem NADPH:cytochrom P450 reduktasy (aspartát, glutamát).

Dále se uplatňují také hydrofobní interakce mezi nepolárními aminokyselinami (leucin, tryptofan, valin) v oblasti membránových domén NADPH:cytochrom P450 reduktasy a cytochromu P450 (Wang et al., 1997; Nadler & Strobel, 1988; Tambutrini & Schenkman, 1986).

Funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy jako děliče elektronového páru byla vysvětlena na základě rozdílných redoxních potenciálů obou flavinových prosthetických skupin (Vermilion et al., 1981; Oprian & Coon, 1982). Akceptorem elektronů (respektive atomů vodíku) od NADPH je FAD, který elektrony následně předává FMN.

Za jednoelektronovou redukci akceptorové molekuly - cytochromu P450 - je (v případě savců NADPH:cytochrom P450 reduktasy) zodpovědný zcela redukovaný hydrochinon FMNH₂ (**Obrázek 13**).



Obrázek 13 Schéma přenosu elektronů mezi flaviny NADPH:cytochrom P450 reduktasy (www.uky.edu).

1.5.2 Cytochrom P450

Cytochrom P450 (EC 1.14.14.1) je terminální oxidasou MFO systému, zprostředkovává vazbu molekulárního kyslíku, jeho aktivaci a zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu (Reid et al., 1984), přičemž druhý atom kyslíku je redukován na vodu (Coon & Persoon, 1980). Elektrony potřebné k redukci dodává NADPH:cytochrom P450 reduktasa (Heineman & Ozols, 1983), případně NADH:cytochrom b₅ reduktasa (Taniguchi et al., 1984).

Garfinkel s Klingenbergem objevili v roce 1958 v jaterních mikrosomech pigment, který po redukci vykazuje v komplexu s oxidem uhelnatým absorpční maximum při 450 nm (Garfinkel, 1958; Klinberg, 1958). Hemoproteinový charakter tohoto pigmentu dokázali roku 1964 Omura a Sato. Na základě podobnosti povahy vazby hemu cytochromů b a podle netypického maxima Soretova pásu jej nazvali cytochromem P450 (Omura & Sato, 1964).

Z evolučního hlediska je cytochrom P450 považován za velmi starý hemoprotein, který se objevil mnohem dříve než hemoglobin (Nelson et al., 1996; Nebert et al., 1989). Je příkladem enzymu, který se vyvíjel cestou divergentní evoluce. Z jediného genu cytochromu P450 archebakterií se do současnosti vyvinulo ohromné množství odlišných genů kódujících cytochromy prokaryotních i eukaryotních organismů (Stiborová et al., 1999). Systém cytochromu P450 je v eukaryotických buňkách vázán v membráně endoplasmatického retikula nebo mitochondrií prostřednictvím transmembránového N-terminálního α -helixu (Edwards et al., 1991), zatímco bakteriální cytochromy P450 jsou enzymy rozpustné. I přes značné rozdíly v substrátové specifitě a struktuře všechny obsahují konzervované sekvence oblastí v blízkosti vazebného místa pro hem.

Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je v proteinové molekule enzymu vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu, která je proximálním (pátým) ligandem železa v hemu (Gut et al., 1992). Nejedná se tedy o klasický cytochrom (protoporfyrin IX vázán prostřednictvím imidazolového zbytku histidinu), ale o **hemthiolátový protein**. Toto uspořádání umožňuje výjimečné chování těchto hemoproteinů a odlišuje je od hemoproteinů ostatních. Šestáým ligandem je atom kyslíku molekuly vody (Felsted et al., 1973).

1.5.2.1 Spinové formy cytochromu P450

Cytochromy P450 díky přechodnému charakteru hemového železa existují ve dvou spinových formách (Gut et al., 1992).

Vysokospinová forma vzniká v případě, že ion železa je v **pentakoordinovaném** stavu a všechny jeho valenční elektrony jsou nespárované (spin 5/2). Ion železa je „vytahován“ thiolátovou skupinou nad rovinu porfyrinového skeletu (**Obrázek 14**). Tato forma vykazuje maximum pásu při **390 nm**.

Nízko-spinová forma (spin 1/2) je charakteristická maximem absorpce **při 418 nm**. Ion železa je **hexakoordinován**, hemové železo tedy interaguje ještě s jedním ligandem (např. s -OH, -COOH nebo -NH₂ skupinou postranních řetězců aminokyselin apoproteinu (Gut et al., 1992) či atomem kyslíku z molekuly vody) (Felsted et al., 1973) a nachází se pak prakticky v rovině kruhu protoporfyrinu IX (**Obrázek 14**).

Obě spinové formy 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 absorpance 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 absorpance při 390 nm a nárůst (dle heteroatomu) při 418 až 460 nm, tedy tak zvané „ligandové spektrum“.



Obrázek 14 Struktura hemu cytochromu P450 (převzato z www.uky.edu).
a) vysokospinová forma, b) nízko-spinová forma

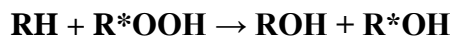
1.5.2.2 Enzymové funkce cytochromu P450

Oxidasová funkce - aktivace biatomické molekuly kyslíku pro klíčové reakce. Spontánní reakce organických molekul s atmosférickým kyslíkem jsou spinově zakázané. V aerobních organismech se proto nachází řada proteinů nesoucích prosthetickou skupinu s kovem nebo flavinem, s jejichž pomocí jsou schopny oxidační potenciál kyslíku využít (Bend & Foureman, 1984).

Oxygenasová aktivita - zabudování kyslíku do molekuly málo reaktivního substrátu.

Redukční reakce - elektrony poskytnuté NADPH:cytochrom P450 reduktasou mohou redukovat přímo substrát a nejsou využity k aktivaci molekuly kyslíku. K tomu dochází, pokud je hydrofobní substrát zároveň dobrým ligandem železa porfyrinového skeletu, a je tedy vázán jako šestý ligand místo kyslíku.

Peroxidasová aktivita - místo kyslíku je druhým substrátem organický peroxid (R^*OOH) nebo peroxid vodíku (Anari et al., 1997). Pro průběh reakce není potřeba NADPH jako zdroje elektronů (Dahl & Hadley, 1983). Produktem reakce je stejně jako při klasickém mechanismu hydroxylovaný substrát (ROH):

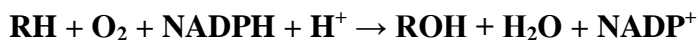


Produkce H_2O_2 a aktivních forem kyslíku - k tomuto jevu dochází tehdy, když MFO systém interaguje s látkou, která se obtížně hydroxyluje (je pouze hydrofobní, tvoří komplex s enzymem, ale těžko se do ní zabudovává kyslík). Proběhne oxidasová fáze funkce cytochromu P450 (aktivuje se molekula kyslíku), ale už neproběhne fáze oxygenasová. Aktivní forma kyslíku je z molekuly uvolněna do okolí, kde přijme protony nebo dismutuje, čímž vzniká peroxid.

1.5.2.2.1 Reakční mechanismus monooxygenasové reakce

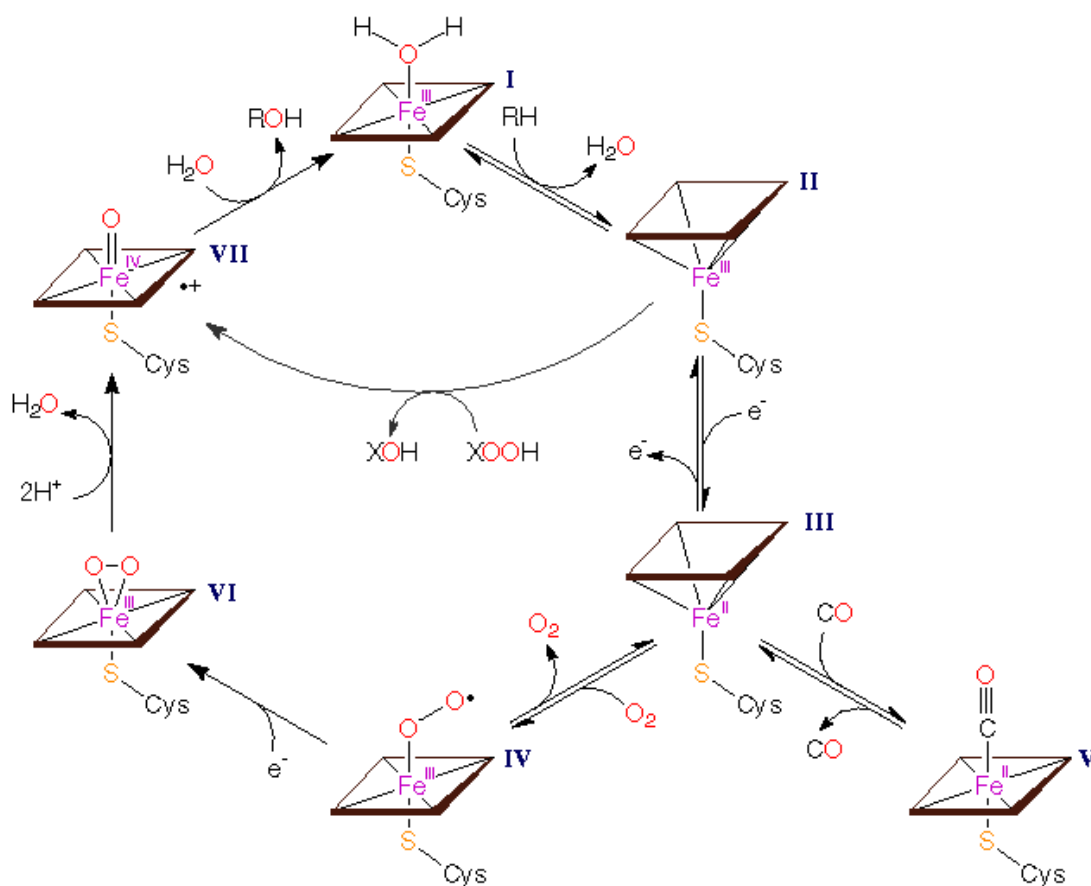
Nejtypičtější reakcí katalyzovanou cytochromy P450 je monooxygenasová reakce, která zahrnuje aktivaci molekulárního kyslíku a zabudování jednoho atomu do molekuly substrátu. Aktivace kyslíku je umožněna dvěma elektrony pocházejícími z NADPH:cytochrom P450 reduktasy, ale donorem druhého elektronu může být i cytochrom b_5 reduktasa (Gut et al., 1992). Druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Obecný průběh

monooxygenasové reakce katalyzované cytochromem P450 lze vyjádřit sumární rovnicí (kde RH je substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce):



Reakční cyklus cytochromů P450 probíhá uspořádaným mechanismem a sestává se alespoň z osmi kroků. Schématicky je znázorněn na

Obrázek 15.



Obrázek 15 Reakční cyklus cytochromu P450, naznačena je i peroxidasová aktivita a tvorba komplexu s oxidem uhelnatým (převzato z www.uky.edu).

V klidovém stavu je hemové železo ve ferri formě (Fe^{III}) a je hexakoordinováno (I). Po vazbě substrátu (RH) do aktivního místa dochází k vytlačení šestého ligandu železa, které zůstane pentakoordinované, a zároveň nastane konformační změna v molekule enzymu (Gut et al., 1992) (II). Vazbou substrátu je umožněna jednoelektronová redukce cytochromu P450 interakcí s NADPH:CYP reduktasou, čímž se hemové železo redukuje na ferro formu (Fe^{II}) a zůstává stále pentakoordinováno. Tato forma enzymu je pak

schopna vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy (III). Navázáním molekulárního kyslíku se dále tvoří ternární ferri-superoxidový komplex, kde je železo opět hexakoordinované. Tento ne příliš stabilní komplex je dále redukován NADPH:CYP reduktasou nebo NADH:cytochrom b₅ reduktasou, čímž dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion (IV). Vazba kyslíku na formu (III) může být inhibována v přítomnosti oxidu uhelnatého, který tvoří ternární ferrokomples cytochrom P450-CO-RH (V). Komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku po druhé redukci je již zcela aktivovanou formou cytochromu P450, ve které dochází k heterolytickému štěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku je redukován, přijme dva protony a dojde k uvolnění vody (VI), zatímco druhý zůstane vázán na Fe hemu a vzniká tak ferrioxenový komplex (VII). Ten je stabilizován mesomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík.

Takto vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na Fe hemu. Dochází k rekombinaci radikálů za uvolnění hydroxyderivátu substrátu (ROH) z enzymu. Obnovuje se nativní forma cytochromu P450 (Stiborová et al., 2004c).

1.5.2.3 Nomenklatura cytochromů P450

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (isoenzýmech, isoformách), které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry homologie jejich primární struktury. Rodiny cytochromů P450 jsou označovány prvním číslem za zkratkou CYP, následuje velké písmeno označující podrodinu (Nelson et al., 1993). Jednotlivé isoenzýmy jsou pak určeny číslem za písmenem podrodiny. Do stejné rodiny náleží cytochromy P450, u kterých byla nalezena více než 40% homologie aminokyselinové sekvence jejich proteinů, do stejné podrodiny pak ty, které vykazují homologii více než 55 % (Spatzenegger & Jaeger, 1995). Současná nomenklatura byla navržena Nebertem a spolupracovníky (Nebert et al., 1989).

1.5.2.4 Substrátová specifita cytochromů P450

Substrátová specifita cytochromů P450 participujících na biotransformaci xenobiotik je většinou široká. Hydroxylyjí celou škálu organických sloučenin (např. polycyklické aromatické uhlovodíky, alifatické uhlovodíky, polycyklické aromatické nitrosloúčeniny, aromatické i alifatické aminy, fenoly, dále pak řadu léčiv). Existují však i cytochromy P450, které hydroxylyjí pouze malý počet substrátů. Takovými enzymy jsou cytochromy P450 metabolisující endogenní sloučeniny v eukaryotických buňkách (např. steroidní hormony) (Stiborová et al., 1999).

1.5.2.5 Regulace hladiny cytochromů P450 indukci enzymu

Řada cytochromů P450 patří mezi indukibilní enzymy. Indukce enzymů je definována jako nárůst exprese katalyticky aktivních forem enzymů, kdy dochází ke zvýšení transkripce na základě stimulace chemickým signálem (Souček & Gut, 1993).

Většinou indukce cytochromů P450 zvyšuje biotransformaci xenobiotika, která by měla vést k jeho detoxikaci a k vyloučení z organismu. Jedná se tedy především o ochranný mechanismus. Některé cytochromy P450 však mohou nereaktivní sloučeninu přeměňovat na chemicky aktivní, toxické či kancerogenní intermediáty. U léčiv, která jsou účinná bez metabolické aktivace, pak může indukce cytochromu P450 zvýšit jejich eliminaci a snížit tak farmakologický efekt. Pokud je léčivo induktorem a zároveň substrátem některé isoformy cytochromu P450, může stimulovat svoji detoxikaci a to může vést až k toleranci organismu vůči danému léčivu. Naopak u léčiv vyžadujících metabolickou aktivaci může indukce cytochromu P450 vést ke zvýšení jejich farmakologického účinku (Stiborová & Mikšanová, 1999). Regulace exprese cytochromů P450 je řízena několika systémy. Jedná se o regulaci exprese na genové úrovni, zahrnující funkci specifických receptorů, rychlost přepisu DNA do RNA či stabilizaci syntetizované mRNA, a dále o posttranslační regulaci založenou především na stabilizaci molekuly proteinu daného cytochromu P450 (Souček & Gut, 1993).

1.5.2.5.1 Regulace exprese cytochromu P450 pomocí intracelulárních receptorů

Cytochromy P450 genových rodin 1-4 jsou z hlediska metabolismu xenobiotik nejdůležitější. Jejich geny jsou transkripčně aktivovány cizorodými látkami prostřednictvím mechanismů závislých na receptorech.

Receptor označovaný jako **AhR** (aryl hydrocarbon receptor) patří mezi cytosolární receptory. Jedná se o transkripční faktor participující na indukci CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 a dále některých enzymů druhé fáze biotransformace. Mezi xenobiotika interagující s AhR patří polycyklické aromatické uhlovodíky, složky tabákového kouře, β -naftoflavon (β -NF) a další (Fuhr, 2000).

Mezi jaderné receptory regulující expresi cytochromu P450 patří **CAR** (constitutive androstane receptor), indukující CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2A6. Xenobiotika reagující s tímto receptorem jsou např. fenobarbital (PB), rifampicin (RIF), cyklofosfamid aj. Dalším jaderným receptorem je **PXR** (pregnane X receptor) pro živočišné systémy a jeho lidský homolog, receptor **SXR** (steroid xenobiotic receptor). Mezi enzymy indukované prostřednictvím těchto receptorů patří CYP3A4 a CYP3A5 a interagujícími látkami jsou například pregnenolon-16 α -karbonitril (PCN), RIF, PB a dexametason. Indukce rodiny cytochromu P450 4A je zprostředkována prostřednictvím dalšího jaderného receptoru **PPAR** (peroxisome proliferator-activated receptor) aktivovaného například thiazolidinediony a glitasony (Waxman, 1999).

1.5.3 Membránové lipidy

Pro správnou činnost enzymů MFO systému jsou velmi důležité membránové lipidy, zvláště pak fosfatidylcholin. Membránové lipidy částečně specificky interagují s cytochromem P450 a způsobují konformační změny zvyšující afinitu cytochromu P450 k substrátu (Janouchová, 2004). Lipidy zároveň vytváří vesikulární útvar usnadňující interakce cytochromu P450 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou, čímž je stimulována tvorba funkčně aktivního komplexu. V neposlední řadě dochází v membránách k hromadění látek s hydrofobní povahou, které mohou sloužit jako substráty cytochromů P450 (Gut et al., 1992).

1.6 CYTOCHROM b_5

MFO systém může fakultativně obsahovat také cytochrom b_5 (cyt b_5). Cyt b_5 je malý (cca 15,9 kDa), cylindrický, kyselý membránový protein (Lu et al., 1995), jehož součástí je nekovalentně vázaná jedna či dvě molekuly hemu b (Von Jagow & Sebald, 1980). Tento hemoprotein se vyskytuje nejen u zvířat a rostlin, ale je i součástí hub (Vergeres & Waskell, 1995). Mikrosomální cyt b_5 významně ovlivňuje přenos elektronů mnoha oxidačních reakcí: anabolismus lipidů (desaturaci mastných kyselin (Lee et al., 1977; Strittmatter et al., 1974) a biosyntézu cholesterolu (Grinstead & Gaylor, 1982)) steroidů, biosyntézu plasmalogenů (Vergeres & Waskell, 1995; Paltauf et al., 1974) a v neposlední řadě katabolismus xenobiotik a endogenních látek (Schenkman & Jansson, 2003).

U savců je cytochrom b_5 lokalizován kromě endoplasmatického retikula (ER) také na vnější membráně mitochondrií, avšak jeho funkce není ještě zcela objasněna. Předpokládá se, že by tento mitochondriální cyt b_5 mohl působit jako aktivátor androgenyze v Leydigových buňkách (Ogishima et al., 2003).

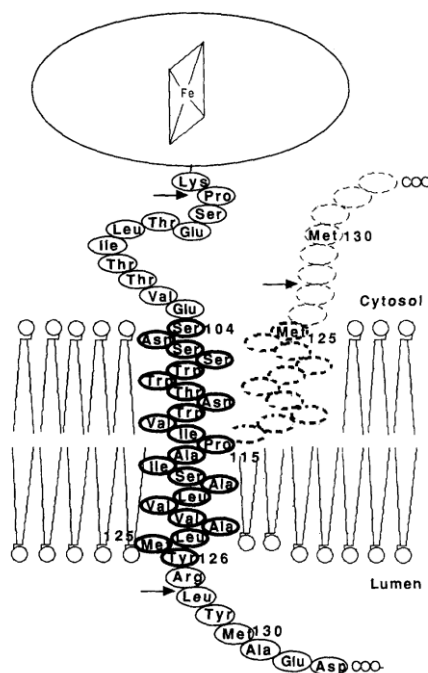
1.6.1 Struktura cytochromu b_5

Cytochrom b_5 je tvořen šesti α -helixy a pěti β -skládanými listy uspořádanými do dvou domén: větší globulární **N-terminální** (hydrofilní) domény, která obsahuje hem b a **C-terminální** (hydrofobní) domény sloužící k ukotvení cyt b_5 v membráně endoplasmatického retikula (Mathews, 1985). Přesný model membránově-vázané domény však zatím nebyl vyřešen. Předpokládané konformace C-terminální kotvy znázorňuje **Obrázek 16**. První, transmembránový model předpokládá průchod C-terminální domény do lumen ER, zatímco v druhém modelu je C-konec orientován do cytoplasmy (Vergeres et al., 2005).

C-terminální část je spojena s globulární doménou oblastí bohatou na prolin (Von Jagow & Sebald, 1980). Hem je lokalizován v hydrofobní „kapse“ a hemové železo je koordinováno postranními řetězci dvou histidinů. Katalytická oblast obsahuje „štěrbinu“, ve které je mezi α -helixy zasazený hem takovým způsobem, že je jedna jeho hrana úplně odkryta (Schenkman & Jansson, 2003).

U savců je 23 aminokyselin z celkových 134 aminokyselin cyt b_5 glutamát či aspartát. Tyto aminokyseliny jsou ve většině případů umístěny v katalytickém centru molekuly a jsou velice konzervovány. U rostlin je většinou glutamát nahrazen aspartátem (Schenkman & Jansson, 2003). Několik dalších aminokyselin poblíž odhalené hrany hemu a jeden ze zbytků propionátu hemu „vyčnívají“ do okolí. Tyto záporně nabitě aminokyseliny se podílejí na iontových interakcích mezi cytochromem b_5 a dalšími elektronovými přenašeči a na interakcích tohoto páru přenašečů s ostatními proteiny (Strittmatter et al., 1956, 1990; Stayton et al., 1989; Salemme, 1976; Rodgers et al., 1991; Qian et al., 1998; Oshino et al., 1971; Ng et al., 1977; Dailey & Strittmatter, 1980). Tato skutečnost poukazuje na fakt, že k tvorbě redoxních komplexů s cyt b_5 jsou využity elektrostatické síly (Schenkman & Jansson, 2003).

Vazba dvou histidinů jako pátého a šestého ligandu na hemové železo zabraňuje jeho přímé interakci s molekulárním kyslíkem. Přesto cyt b_5 může fungovat jako prostředník elektronového přenosu mezi reduktasou a oxidačním enzymem (Schenkman & Jansson, 2003). Tedy cyt b_5 může přijmout elektron od NADPH:cytochrom P450 reduktasy (Bilimoria & Kamin, 1973; Enoch & Strittmatter, 1979; Hildebrandt & Estabrook, 1971; Iyanagi et al., 1974; Omura & Takesue, 1970) nebo od NADH:cytochrom b_5 reduktasy (Oshino et al., 1971; Strittmatter & Velick, 1956) a předat jej proteinovým elektronovým akceptorům: například cytochromu P450 (Jansson & Schenkman, 1977), cytochromu c



Obrázek 16 Schéma předpokládaného ukotvení cyt b_5 v membráně ER (Vergeres et al., 2005).

(Hara & Minakami, 1971; Jansson & Schenkman, 1977; Staron & Kaniuga, 1974; Strittmatter & Velick, 1956), metmyoglobinu (Livingston et al., 1985) nebo methemoglobinu (Hultquist et al., 1974).

Pokud není hem v molekule cytochromu b_5 přítomen, dochází k rozvolnění struktury katalytické části a protein se stává méně stabilní (Pfeil, 1993). Pokud nedojde k porušení struktury, může přijmout cytochrom b_5 prostetickou skupinu - hem nazpět a dochází k opětovnému sbalení (Davis & Lecomte, 2008).

1.6.2 Mechanismy působení cytochromu b_5

Působení cytochromu b_5 v rámci MFO systému není zcela objasněné. Mechanismus je vysvětlován čtyřmi odlišnými způsoby (Schenkman & Jansson, 2003):

První předpokládaný mechanismus zahrnuje přímý přenos elektronu z cytochromu b_5 do monooxygenasového cyklu. V monooxygenasové reakci cytochromů P450 se zdá být rychlost reakce limitována přijetím druhého elektronu (Guengerich et al., 1976), který je třeba k tvorbě více aktivovaného molekulárního kyslíku navázaného na cytochrom P450. Pokud není druhý elektron doručen dostatečně rychle, dochází k rozpadu komplexu a uvolňuje se superoxidový anionradikál místo oxidovaného substrátu.

Další variantou je předpoklad, že se cytochrom b_5 chová jako pozitivní modifikátor monooxygenas tak, že snižuje četnost rozpojení komplexu se superoxidovým anionradikálem. Přes cytochrom b_5 může druhý elektron rychleji vstoupit do monooxygenasové reakce (Schenkman & Jansson, 2003; Hildebrandt & Estabrook, 1971; Reed & Hollenberg, 2003), což zabrání rozpadu komplexu superoxidového aniontu. Vytvoří se tak aktivovaný kyslík, který reaguje se substrátem a tvoří se produkt.

Třetí návrh ukazuje tvorbu dvou-hemoproteinového komplexu mezi cytochromem P450 a cytochromem b_5 . Nekompletní cytochrom P450, tedy za absence cytochromu b_5 , přijímá elektron od reduktasy, disociuje vazbu s reduktasou, váže kyslík a znovu tuto vazbu reasociuje a přijímá druhý elektron. Vytvoření komplexu s cytochromem b_5 by posilovalo rychlost formování aktivního kyslíku odstraněním dvojí interakce s reduktasou (Schenkman & Jansson, 2003).

Čtvrtý mechanismus předpokládá skutečnost, že cyt b_5 slouží jako efektor bez oxidačně-redukční role v monooxygenasové reakci. To by potvrdovalo stimulaci některých

cytochromů P450 nejen cytochromem b₅, ale i cytochromem b₅ postrádajícím hem (apo-cytochrom b₅) (Auchus et al., 1998; Loughran et al., 2001; Yamazaki et al., 1996). Cyt b₅ v takovém případě pravděpodobně posiluje rozklad oxygenovaného hemoproteinu na produkty nebo usnadní tok elektronů přes systém (Schenkman & Jansson, 2003).

2 CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Hlavními cíli předkládané disertační práce bylo rozšíření současných znalostí v oblasti metabolismu protinádorového léčiva ellipticinu a karcinogenního benzo[a]pyrenu. Oxidaci ellipticinu na jeho aktivační metabolity můžeme považovat za zásadní faktor determinující mechanismus působení a cílový účinek tohoto léčiva. Ellipticin totiž vykazuje selektivní účinek pouze vůči určitým nádorům. Snahou je proto vysvětlit, čím je tato vlastnost určena. Cílem práce bylo také vysvětlit vyšší účinnost některých cytochromů P450 (CYP1A1/2) v metabolické aktivaci ellipticinu *in vivo* v orgánech potkana a myši zjištěnou v předchozích studiích (Stiborová et al., 2003a,b; 2004b), oproti situaci *in vitro*. Též oxidaci benzo[a]pyrenu CYP můžeme považovat za první krok aktivace tohoto kancerogenu.

V rámci disertační práce byly řešeny následující problematiky:

Vliv cytochromu b₅ na oxidaci ellipticinu cytochromem P450 1A1/2 a 3A4

Tato studie sledovala, vliv cytochromu b₅ (fakultativní součást MFO systému) na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 1A1/2 a 3A4 na detoxikační a aktivační metabolity tohoto léčiva. Oxidace ellipticinu byla studována za použití rekonstituovaného systému purifikovaných enzymů CYP1A1 a 1A2 s NADPH:CYP reduktasou nebo enzymů supersomálních (SupersomesTM).

Metabolismus ellipticinu cytochromy P450 a peroxidasami v mikrosomálních systémech izolovaných z jater, ledvin a plic potkana

Cílem této části práce bylo poznání, jak premedikace ellipticinem ovlivňuje enzymy, které jsou zapojené do aktivace ellipticinu ve tkáni jater, ledvin a plic potkanů. Oxidace a aktivace ellipticinu byla sledována za použití mikrosomálních systému jater, plic a ledvin potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných ellipticinem (4, 40 a 80 mg/kg tělesné hmotnosti). Pro identifikaci enzymů participujících na metabolismu ellipticinu bylo využito i inhibitorů a kofaktorů CYP a peroxidas.

Metabolismus ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem myši

V této části práce jsme se zaměřili na studii, které enzymy jsou zapojené do metabolismu ellipticinu v jaterní tkáni myši. Oxidace ellipticinu byla sledována za použití mikrosomálního systému jater myši s „deletovanou“ NADPH:CYP reduktasou v játrech (HRNTM) a myši kontrolních (WT), a to jak nepremedikovaných zvířat, tak i premedikovaných benzo[a]pyrenem (125 mg/kg tělesné hmotnosti). Pro identifikaci enzymů participujících na metabolismu ellipticinu bylo využito i inhibitorů a kofaktorů CYP a peroxidas.

Příprava a charakterizace majoritního aduktu ellipticinu s DNA tvořeného jeho metabolitem, 13-hydroxyellipticinem, s deoxyguanosinem

K izolaci aduktu tvořeného reakcí 13-hydroxyellipticinu s deoxyguanosinem bylo nutné vyvinout metodu vhodnou pro jeho separaci pomocí HPLC, a to za účelem izolace jeho dostatečného množství nutného pro určení jeho struktury.

Studium metabolismu benzo[a]pyrenu enzymy jaterního mikrosomálního systému monooxygenas se smíšenou funkcí potkana a myši

V této části jsme se soustředili na oxidaci benzo[a]pyrenu mikrosomálním systémem izolovaným z jater potkana a myši. Účelem tedy bylo zjistit, na jaké metabolity je benzo[a]pyren těmito systémy oxidován. V případě použití mikrosomálního systému myši HRNTM a WT, bylo cílem srovnání efektivity těchto mikrosomů v oxidaci BaP.

Studium metabolismu benzo[a]pyrenu cytochromem P450 1A1

Tato studie sledovala jak je benzo[a]pyren oxidován purifikovaným cytochromem P450 1A1 v rekonstituovaném systému s NADPH:CYP reduktasou v prostředí liposomů, které simulují přirozenou membránu endoplasmatického retikula.

Vliv cytochromu b₅ na oxidaci benzo[a]pyrenu katalyzovanou cytochromy P450 1A1

V další části jsme se zaměřili na vliv cytochromu b₅ na oxidaci benzo[a]pyrenu purifikovaným cytochromem P450 1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou v prostředí liposomů.

Vliv epoxidhydrolasy na aktivaci benzo[a]pyrenu za tvorby aduktů s DNA cytochromem P450 1A1

Vedle vlivu epoxidhydrolasy na metabolismus benzo[a]pyrenu cytochromy P450 1A1/2 bylo cílem práce i poznání, jakou roli hraje tento enzym ve tvorbě jednotlivých aduktů aktivovaného benzo[a]pyrenu s DNA (adukty 1 a 2). K vyřešení této otázky bylo využito rekonstituovaného systému cytochromu P450 1A1, NADPH:CYP reductasy a epoxidhydrolasy.

Vliv cytochromu b₅ na aktivaci benzo[a]pyrenu za tvorby aduktů s DNA cytochromem P450 1A1

Tato studie sledovala, zda cytochrom b₅ (fakultativní součást MFO systému) ovlivňuje množství vznikajících aduktů aktivovaného benzo[a]pyrenu s DNA.

3 MATERIÁL A METODY

Většina metod využívaných při vypracování předkládané disertační práce je popsána v publikacích, které tvoří součást práce a jsou uvedeny jako přílohy 2-8. Pro větší přehlednost a detailnější znalost jsou však některé z metod, a také i použitý materiál a chemikálie, uvedeny v této kapitole disertační práce.

3.1 POUŽITÝ MATERIÁL

AbCam, USA primární králičí polyklonální protilátka proti cytochromu b₅ (potkan, králík, myš), primární králičí polyklonální protilátka proti NQO1 (potkan, králík, myš)

BIO-RAD, USA N-acetyltransferasa 1/2

Calbiochem, USA 9-hydroxyellipticin

Chemopetrol, Česká republika suchý led

Fermentas, USA Spectra™ multicolor broad range barevný standard pro elektroforézu a metodu western blotting

Fluka, Švýcarsko akrylamid, dilauroylfosfatidylcholin (DLPC), dodecylsulfát sodný (SDS), ethylacetát, 2-merkapt ethanol, methanol, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)

Lachema Brno, Česká republika dekahydrát uhličitanu sodného, dihydrát dihydrogen fosforečnanu sodného, (di)hydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan sodný, dithioničitan sodný, ethylendiamintetraoctová kyselina ve formě dvojsodné soli (EDTA, chelaton 3), ethanol, ethylacetát, hydrogenuhličitan sodný, hydroxid draselný, hydroxid sodný, chlorid draselný, chlorid hořečnatý, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková,

kyselina octová, methanol, octan sodný, pentahydrát síranu měďnatého, persíran amonný, sacharosa, síran měďnatý, uhličitan sodný, vinan sodný

Linde, Česká republika dusík (g), kapalný dusík, oxid uhelnatý

Loba Feinchemie, Rakousko glutathion, tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

Merck, Německo acetonitril, ethylacetát, voda LiChrosolv

Millipore Corp., USA ImmobilonTM- P transfer membrána (PVDF)

Reanal Budapešť, Maďarsko glukosa-6-fosfát Na₂, glycin

Sigma, USA glukosa-6-fosfát Na₂, glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, dimethylsulfoxid (DMSO), fenacetin, nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukovaný (NADPH), nikotinamidadenindinukleotid (NADP⁺), ellipticin, 1-heptansulfonová kyselina, 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS), acetylkoenzym A, acetonitril, 5'-deoxyguanosin, guanosin-5'-monofosfát, 2'-deoxyguanosin-5'-monofosfát, ellipticin, 4,4' dikarboxy 2,2' bicinchoninová kyselina (BCA), β-naftoflavon (β-NF), cytochrom c, sodná sůl 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonové kyseliny (HEPES), ketokonazol, králičí a koží protilátka IgY značená alkalickou fosfátasou, standardy pro polyakrylamidovou gelovou elektroforesu v prostředí SDS „Wide range“, benzo[a]pyren

Serva, Německo Coomassie Brilliant Blue R-250, glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin (TEMED), triton-X-100

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

Whatman, USA chromatografický papír č. 3

X Ford Biomedical research INC, USA sulfotransferasa 1A1/2

13-hydroxyellipticin byl syntetizován RNDr. Martinem Dračínským PhD. (Dračínský et al., 2007), 7-hydroxyellipticin a *N*²-oxid ellipticinu byly syntetizovány J. Kučkou a Doc. Ing. S. Smrčkem (katedra organické chemie PŘF UK).

3.2 ENZYMOVÉ PREPARÁTY

Samci králíků (čičila velká, 2.5-3.0 kg) a laboratorních potkanů (kmen Wistar, 150-200 g) byli drženi při laboratorní teplotě $22 \pm 2^\circ\text{C}$, voda a granulovaná strava jim byly podávány *ad libitum*. Případná premedikace byla zahájena po zhruba týdenní aklimatizaci. 18 hodin před usmrcením byla zvířatům odebrána strava pro snížení hladiny glykogenu v játrech. Experimenty byly realizovány v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (409/2008) a vyhláškou O chovu a využití pokusných zvířat (207/2004) v prostorách lékařské fakulty Univerzity Karlovy (U nemocnice 5, Praha 2).

3.2.1 Izolace mikrosomů a purifikace mikrosomálních enzymů

Mikrosomy byly z jater zvířat premedikovaných induktory cytochromů P450 a zvířat kontrolních (nepremedikovaných) izolovány frakční centrifugací podle Stiborové a spol. (Stiborová et al., 1990, 1995). **CYP1A2** byl získán z jaterních mikrosomů králíků premedikovaných β -naftoflavonem dle Saita et al., (Saito & Strobel, 1981) a Haugena et al., (Haugen & Coon, 1976).

Králičí jaterní NADPH:CYP reduktasa byla izolována dle Yasukotchiho et al., (Yasukochi et al., 1979) a potkaní **cytochrom b₅** podle Yanga et al., (Yang & Cederbaum, 1994). Úpravy izolačních postupů byly prováděny dle disertační práce M. Šulce (Šulc, 2002) a diplomové práce K. Janouchové (Janouchová, 2004). Kontrolní skupinu tvořily zvířata nepremedikovaná.

Izolované mikrosomální frakce i jednotlivé enzymy byly v alikvotech zmrazeny v kapalném dusíku a uskladněny v hlubokomrazicím boxu při -80°C .

Myší mikrosomy byly izolovány Prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc.

Rekombinantní potkaní CYP1A1 byl purifikován z membrán *Escherichia coli* transfekovaných modifikovanou *CYP1A1* cDNA (Saito & Strobel, 1981) v laboratoři

H. W. Strobel (University of Texas, Medical School of Houston, Texas, USA) Prof. Petrem Hodkem (katedra biochemie PřF UK).

SupersomyTM obsahující různé isoformy CYP a exprimující NADPH:CYP reduktasu a cytochrom b₅ byly získány z komerčního zdroje (Gentest Corp., Woburn, MA, USA).

Premedikace zvířat

Premedikace potkanů ellipticinem, samcům a samicím laboratorního potkana bylo intraperitoneálně (i.p.) jednorázově podáno 4, 40 a 80 mg ellipticinu na jeden kilogram tělesné hmotnosti zvířete. Ellipticin byl rozpuštěn v DMSO a následně ve slunečnicovém oleji v poměru 1:1 (v/v) o výsledné koncentraci roztoku 6 mg/ml. 48 hodin po aplikaci byla zvířata usmrcena a z tkání byly izolovány mikrosomální frakce.

Premedikace potkanů Sudanem I, samcům laboratorního potkana bylo i.p. podáno ve třech po sobě jdoucích dnech 20 mg Sudanu I na kg tělesné hmotnosti zvířete. Sudan I byl rozpuštěn ve slunečnicovém oleji na výslednou koncentraci roztoku 6 mg/ml. 24 hodin po poslední aplikaci byla zvířata usmrcena a z tkání byly izolovány mikrosomální frakce.

Premedikace myši benzo[a]pyrenem, samcům myši bylo i.p. podáno v jedné a pěti dávkách 125 mg benzo[a]pyrenu na kilogram tělesné hmotnosti zvířete rozpuštěné v malém množství DMSO a následně ve slunečnicové oleji v poměru 1:1(v/v). Premedikace myši byla provedena Prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc. v Německém centru pro rakovinu v Heidelbergu, Německo.

Kontrolní skupiny, potkanům (myším) bylo i.p. podáno pouze rozpouštědlo pro daný induktor.

Identifikace produktů izolace (cytochromů P450, NADPH:CYP reduktasy a cytochromu b₅) byla provedena hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF. Srovnání měřených spekter peptidů s databází NCBI_{nr} (2005/06/01) bylo provedeno programem ProFound (http://129.85.19.192/profound_bin/webProFound.exe). Provedeno Doc. RNDr. M. Šulcem, PhD.

3.3 METODY STANOVENÍ KONCENTRACÍ A AKTIVIT VYBRANÝCH ENZYMŮ

Koncentrace proteinů byla zjišťována metodou dle Wiechelmana a kol. (Wiechelman et al., 1988), při které se využívá tvorby modře zabarveného komplexu měďných iontů s 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou (BCA) v alkalickém prostředí a s hovězím sérovým albuminem (BSA) jako standardem. Intenzita zabarvení, stanovená spektrofotometricky (A_{562}), je pak přímo úměrná koncentraci bílkoviny.

Obsah cytochromu P450 v preparátech byl stanoven za využití charakteristické absorpce komplexu tohoto hemthiolátového proteinu v redukovaném stavu s oxidem uhelnatým při 450 nm (Omura & Sato, 1964).

Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reductasy bylo provedeno měřením rychlosti redukce cytochromu c za současné oxidace NADPH. Přírůstek redukovaného cytochromu c se měří při vlnové délce 550 nm (Sottocasa et al., 1964).

Koncentraci NADPH:CYP reductasy lze stanovit spektrofotometricky. Díky flavinovým koenzymům vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 455 nm (Vermilion & Coon, 1978).

Cytochrom b₅ je protein vykazující absorpční maximum při vlnové délce 413 nm. Jeho koncentrace byla stanovena spektrofotometricky z absorpčního spektra s využitím molárního extinčního koeficientu $\epsilon_{413} = 117 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Burchel 1985; Estabrook & Werringloer 1978; Strittmatter & Velick 1956), nebo z diferenčního spektra (dithioničitanem redukované – oxidované, molární extinční koeficient $\epsilon_{424-409} = 185 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Estabrook & Werringloer 1978).

3.4 ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

3.4.1 SDS elektroforéza

Pufir A: 0.375 M Tris/HCl; pH 8.8; 0.1% (w/v) SDS

Polymerační pufir A: 30% (w/v) akrylamid, 0.8% (w/v) BIS v pufiru A

Pufir B: 0.125 M Tris/HCl; pH 6.8; 0.1% (w/v) SDS, 0.0006% (w/v) bromfenolová modř

Polymerační B: 30% (w/v) akrylamid, 0.8% (w/v) BIS, v pufiru B

Vzorkový pufir: 0.25 M Tris/HCl, 8% (w/v) SDS, 20% (v/v) 2-merkptoethanol, 40% (v/v) glycerol, 0.004% (w/v) bromfenolová modř; pH 6.8

Elektrodový pufir: 0.192 M glycin, 0.025 M Tris/HCl; pH 8.3; 0.1% (w/v) SDS

Barvicí lázeň: 0.25% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250, 46% (v/v) ethanol, 9.2% (v/v) kyselina octová

Odbarvovací lázeň: 25% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová

Elektroforéza mikrosomálních proteinů v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) byla prováděna dle postupu popsaného v práci Laemmliho (Laemmli, 1970) na polyakrylamidovém gelu v diskontinuálním uspořádání za použití 3% nebo 4% zaostřovacího gelu a 8% (případně 7% nebo 15% pro NADPH:CYP reduktasu a cytochrom b₅) separačního gelu. Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 3:1, následně byly cca 5 minut povařeny ve vodní lázni a nanесeny hamiltonovou stříkačkou do jamek.

Elektromigrace probíhala ve vertikálním uspořádání při pH 8.3 a při napětí 80 V pro průchod zaostřovacím gelem, které bylo po 30 minutách zvýšeno na 150 V. Gely byly barveny v barvicí lázni po dobu 45 minut a následně byly zbaveny přebytečné coomassie brilliant blue R-250 v odbarvovací lázni.

3.4.2 Metoda „Western blotting“

Přenosový pufr: 0.025 M Tris, 0.192M glycin; pH 8.3

PBS Triton X-100: 0.134 M NaCl, 1.8 mM Na₂HPO₄·10H₂O, 1 mM NaH₂PO₄; pH 7.2;
0.3% (w/v) Triton X-100

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

Pro metodu „Western blotting“ (WB) byl gel po skončení elektroforézy 5 minut inkubován v přenosovém pufru na třepačce při laboratorní teplotě. Do aparatury pro WB byly postupně navrstveny 3 ks chromatografického papíru Whatman č. 3, PVDF membrána, gel a to vše překryto dalšími 3 ks chromatografického papíru. Před umístěním do aparatury byly membrány ponořeny na 30 sec do methanolu, 1 min do destilované vody a 2 min do přenosového pufru. Chromatografické papíry byly předem umístěny do přenosového pufru. Elektropřenos byl prováděn 50 minut při 3.5 mA/cm² gelu.

Při použití primární slepičí protilátky byla membrána se sorbovanými proteiny blokována přes noc v blokovacím roztoku při 6°C, v případě komerční králičí primární protilátky bylo blokování provedeno pouze 1 hod za laboratorní teploty na třepačce (IKA Yellow line OS2 basic, Německo).

Inkubace se specifickou primární protilátkou probíhala při použití slepičí primární protilátky (CYP1A1/2) 120 minut za míchání při laboratorní teplotě, v případě králičí primární protilátky (cytochrom b₅, epoxidhydrólasy) proběhla inkubace přes noc při 5°C. Membrána byla umístěna do jamky systému detekujícího proteiny SNAP i.d. (Millipore, USA) a primární protilátky byly odmyty puftrem PBS Triton X-100 (3 x 10-30 ml, podle velikosti jamky). Dále byla membrána 10 min inkubována v roztoku sekundární protilátky, králičí IgG proti slepičí IgY nebo koží IgG proti králičí IgY obě s navázanou alkalickou fosfátasou (finální ředění 1:1429, 7 µl do 10 ml PBS Triton X-100). Sekundární protilátka byla odmyta puftrem PBS Triton X-100 (3x10-30 ml). Membrána byla vyjmuta z jamky promyta destilovanou vodou a následně vyvolána roztokem substrátu pro alkalickou fosfátasu (BCIP/NBT) v 10 ml destilované vody. Intenzita zón ilustrující množství proteinů byla kvantifikována programem ELFOMAN 2.0.

3.5 STUDIUM METABOLISMU ELLIPTICINU CYTOCHROMY P450

3.5.1 Metabolismus ellipticinu cytochromy P450

Pro měření oxidace ellipticinu byly použity mikrosomy zvířat (králík, potkan, myš) premedikovaných induktory CYP, zvířat kontrolních (nepremedikovaných) a SupersomyTM.

Inkubační směsi byly připraveny vždy v „dubletech“ o celkovém objemu 500 μ l (mikrosomy) a 125-250 μ l (Supersomy) a následujícím složení:

- 0.2 mg proteinů mikrosomální frakce (viz *Tabulka 2*, str. 58) nebo 25-200 pmol supersomálního CYP
- 10 μ M ellipticin (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- 10 mM MgCl₂; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP⁺;
1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS)
- fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄; pH 7.4)

Všechny potřebné složky byly do inkubační směsi přidávány v takovém množství, aby jejich zastoupení ve vzorku odpovídalo výše uvedeným koncentracím. Směs byla doplněna pufrům do 500 μ l (125 μ l, 250 μ l). Reakce byla iniciována přidáním NADPH-generujícího systému, zamíchána a inkubována 20 minut za stálého třepání při 450 RPM (Thermomixer Compact, Eppendorf) v otevřených mikrozkuvkách při 37 °C. Probíhající reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a následným intenzivním protřepáním. Dále bylo přidáno 5 μ l 1 mM fenacetinu v methanolu, který slouží jako interní standard pro HPLC. Vzorky byly extrahovány 2 x 1 ml ethylacetátu intenzivním třepáním (2 minuty na vortexu Microshaker ML-1). Pro důkladné oddělení obou fází byla směs centrifugována po dobu 5 min při 13000 RPM (Centrifuge 5418 Eppendorf). Horní organická vrstva byla odebrána (2 x 750 μ l) a ethylacetát odpařen do sucha na vakuové odparce (CentriVap Concentrator, Labconco, USA). Vzorky byly rozpuštěny v 20 μ l methanolu a analyzovány pomocí HPLC (*kap. 3.5.2*).

Tabulka 2 Koncentrace proteinu v izolovaných mikrosomálních frakcích použitých pro experimenty.

mikrosomy	koncentrace proteinů
kontrolní	32.3 mg/ml
Sudan I	64.0 mg/ml
WT-K	29.5 mg/ml
WT-BaP	43.5 mg/ml
HRN-K	61.0 mg/ml
HRN-BaP	32.0 mg/ml

3.5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácené fázi (HPLC)

Metabolity ellipticinu vzniklé v inkubačních směsích byly separovány a jejich obsah stanoven pomocí RP-HPLC na přístroji Dionex (P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S) za použití izokratické eluce mobilní fází s kyselinou 1-heptansulfonovou [64% (v/v) methanol; 5 mM kyselina 1-heptansulfonová; 32 mM kyselina octová]. Mobilní fáze byly připraveny do skleněných lahví a před použitím byly vždy odstraněny bubliny sonikací v ultrazvukové lázni. Separace probíhala na koloně Ultrasphere, ODS, C18, 250 x 4.6 mm, 5 μ m (Beckman-Coulter) s průtokem mobilní fáze 0.7 ml/min (ellipticin), 0.6 ml/minutu (BaP). Metabolity byly detekovány při vlnové délce 313 nm (296 nm) a pro kvantifikaci byla jejich plocha vztažena k ploše píku vnitřního standardu fenacetinu.

3.5.3 Izolace 13-hydroxyellipticinu pomocí HPLC

mobilní fáze A : 80% methanol (v/v), 0.07M octan amonný

mobilní fáze B : 100% methanol (v/v), 0.07M octan amonný

Nežádoucí produkty vzniklé při synthese 13-hydroxyellipticinu, připraveného RNDr. Dračínským, PhD (Dračínský et al., 2007) byly separovány od žádoucího 13-hydroxyellipticinu, který byl manuálně „sbírán“ pomocí HPLC na koloně Nucleosil 120-5, C-18, 250 x 8 mm (Watrex) s průtokem 1.2-1.6 ml/min za použití eluce lineárním

gradientem mobilních fází 0-100 % A ve 20 min s následnou 10 min izokratickou elucí mobilní fází B. Jednotlivé produkty byly detekovány při vlnové délce 313 nm (příp. 290 nm, 296 nm) a pro identifikaci 13-hydroxyellipticinu ve směsi byl použit standard 13-hydroxyellipticinu.

3.5.4 Příprava aduktu 13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosinu pro analýzu metodou HPLC

K přípravě aduktu byl použit 13-hydroxyellipticin a deoxyguanosin resp. 5'-deoxyguanosin (popř. guanosin-5'-monofosfát, 2'-deoxyguanosin-5'-monofosfát).

Inkubační směsi byly připravované o celkovém objemu 100 μ l a složení:

- 50 μ M 13-hydroxyellipticin
- 1 mM deoxyguanosin nebo 1 mg DNA z telecího brzlíku
- fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 ; pH 6.0, 7.4, 8.4)
- za přítomnosti 0 nebo 39 nmoI SULT1A1/2 nebo NAT1/2 a jejich kofaktorů 0 nebo 2 mM AcCoA, 100 μ M PAPS)

13-hydroxyellipticin i deoxyguanosin byly rozpuštěny ve 100 μ l fosfátového pufru o daném pH. Vzorky byly připraveny odebráním a smícháním 50 μ l z obou zásobních roztoků. Směs byla zamíchána a inkubována přes noc za stálého třepání při 350 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf) v uzavřených mikrozkušavkách při 37 °C. Vzorky byly analysovány pomocí HPLC (viz *kap.* 3.5.2). Analýzy DNA aduktů metodou „³²P-postlabeling“ (Stiborová at al., 2004b) byly provedeny školitelkou na pracovišti Německého centra pro výzkum rakoviny v Heidelbergu.

3.5.5 Separace aduktu 13-hydroxyellipticinu metodou HPLC

mobilní fáze A : 32mM kyselina octová (vodný roztok)

mobilní fáze B : 100% methanol

Adukt 13-hydroxyellipticinu vzniklý v inkubačních směsích (viz *kap. 3.5.4*) byl separován pomocí HPLC za použití lineárního gradientu 0-100% mobilní fáze B během 70 minut s následnou 5 min izokratickou elucí mobilní fáze B.

Mobilní fáze byly připraveny do skleněných lahví a před použitím byly vždy odstraněny bubliny sonikací v ultrazvukové lázni. Separace probíhala na koloně Ultrasphere, ODS, 250 x 4.6 mm, 5 µm (Beckman-Coulter) s průtokem mobilní fáze 1 ml/min za použití programu "gradient5". Metabolity byly detekovány při vlnové délce 296 nm a 313 nm. Pro identifikaci aduktu byly proměřeny kontrolní vzorky obsahující jednotlivé reagensy.

3.6 STUDIUM METABOLISMU BENZO[A]PYRENU

3.6.1 Metabolismus benzo[a]pyrenu cytochromy P450

Metabolismus benzo[a]pyrenu byl studován za použití jaterních mikrosomů potkanů jednak kontrolních (nepremedikovaných) a jednak premedikovaných Sudanem I. Inkubační směsi byly připraveny vždy v „dubletech“ o celkovém objemu 500 µl a následujícím složení:

- 0.5 mg proteinů mikrosomální frakce (viz *Tabulka 2*, str. 58)
- 50 µM benzo[a]pyren (5mM zásobní roztok v DMSO)
- 1 mM MgCl₂; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP⁺;
1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS)
- fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄; pH 7,4)

Všechny potřebné složky byly do inkubační směsi přidávány v takovém množství, aby jejich zastoupení ve vzorku odpovídalo výše uvedeným koncentracím. Směs byla doplněna pufrem do 500 µl. Reakce byla iniciována přidáním NADPH-generujícího systému, zamíchána a inkubována 20 minut za stálého třepání při 450 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf) v otevřených mikrozkušnicích při 37 °C. Probíhající reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a následným intenzivním protřepáním. Dále bylo přidáno 5 µl 1 mM fenacetinu v methanolu, který slouží jako interní standard pro HPLC.

Vzorky byly extrahovány 2 x 1 ml ethylacetátu intenzivním třepáním (2 minuty na „vortexu“). Pro důkladné oddělení obou fází byla směs centrifugována po dobu 5 min při 13000 RPM (Centrifuge 5418 Eppendorf). Horní organická vrstva byla odebrána (2 x 750 μ l) a ethylacetát odpařen do sucha na vakuové odparce (CentriVap Concentrator, Labconco, USA). Vzorky byly rozpuštěny v 20 μ l methanolu a analyzovány pomocí HPLC (kap. 3.6.3).

3.6.2 Metabolismus benzo[a]pyrenu cytochromy P450 v rekonstituovaném systému

Rekonstituovaný systém cytochromů P450 byl připraven za přítomnosti NADPH:CYP reductasy, která zajišťuje funkčnost purifikovaných CYP. Tento systém obsahuje arteficiální membránu tvořenou liposomy (dilauroylfosfatidylcholin, DLPC), která simuluje přirozenou membránu endoplasmatického retikula. Společně jednotlivé složky vytváří funkční MFO systém obsahující jedinou izoformu CYP.

Rekonstituovaný systém byl připraven o následujícím složení:

- 100 pmol CYP
- 100 pmol NADPH:CYP reductasy
- 0.05 mg/ml CHAPS (0.5 mg/ml v pufru HEPES)
- 1 mg/ml DLPC (5 mg/ml v chloroformu)
- 3 mM glutathion (30 mM zásobní roztok v H₂O)
- 50 mM HEPES (500 mM zásobní roztok v H₂O; pH 7.4)

Pro studium vlivu NADPH:CYP reductasy na oxidaci ellipticinu bylo do rekonstituovaného systému dáváno 5-150 pmol reductasy, pro studium vlivu cytochromu b₅ byl tento protein přidáván v množství 0-500 pmol a pro studium vlivu EH byl tento protein přidáván v množství 0-500 pmol.

Nejdříve byl ve skleněných zkumavkách odpařen pod atmosférou dusíku roztok DLPC v chloroformu o koncentraci 5 mg/ml tak, aby se na dně a stěnách zkumavky vytvořila vrstvička lipidu. Dále byly do zkumavek přidány roztoky detergentu CHAPS, glutathionu a pufru HEPES. Směsi byly sonikovány 2 x 3 minuty, což přispívá k

snadnější tvorbě liposomů, a poté k nim byly přidány enzymy (CYP, NADPH:CYP reductasa, cytochrom b₅) či další složky. Směsi byly inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě na třepačce (IKA Yellow line OS2 basic, Německo). Tím byly rekonstituované systémy připraveny a použity pro inkubace s BaP.

Postup inkubace viz *kap. 3.6.1* a analýza vzorků pomocí HPLC viz *kapitola 3.6.3*.

3.6.3 Separace metabolitů benzo[a]pyrenu pomocí HPLC

mobilní fáze A: 50% acetonitril (v/v)

mobilní fáze B: 85% acetonitril (v/v)

Metabolity benzo[a]pyrenu vzniklé v inkubačních směsích byly separovány a jejich obsah stanoven pomocí HPLC na přístroji Dionex (P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S) za použití lineárního gradientu 0-100% mobilní fáze B během 35 min s následnou 5 min izokratickou elucí mobilní fáze.

Mobilní fáze byly připraveny do skleněných lahví a před použitím byly vždy odstraněny bubliny sonikací v ultrazvukové lázni. Separace probíhala na koloně Nucleosil® 100-5 C18, 5 μm, 250 × 4 mm (Macherey Nagel, Germany) s průtokem mobilní fáze 0.6 ml/minutu. Metabolity byly detekovány při vlnové délce 254 nm a pro kvantifikaci byla jejich plocha vztažena k ploše píku vnitřního standardu fenacetinu.

3.6.4 Hmotností spektrometrie

Příprava vzorků a identifikace získaných proteinů hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF byla provedena Doc. RNDr. Miroslavem Šulcem, PhD. Detailní popis metody je uveden v publikaci, která je součástí disertační práce jako *příloha 4*.

3.6.5 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Příprava vzorků a identifikace získaných proteinů nukleární magnetickou rezonancí byla provedena RNDr. Martinem Dračínským, PhD.

^1H NMR spektra (δ , ppm; J , Hz) byla měřena na přístrojích Bruker Avance II-600 a Bruker Avance II-500 vybavenými kryosondami (600.1 nebo 500.0 MHz pro ^1H) v hexadeutrovaném acetonu a CDCl_3 a referencována na signál rozpouštědla (δ 2.05, respektive 7.27). Množství jednotlivých vzorků nebylo dostačující pro měření ^{13}C NMR spekter nebo heteronukleárních korelovaných experimentů.

3.7 Metoda „ ^{32}P -postlabeling“

Analýzy DNA aduktů byly provedeny Prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc. na pracovišti Německého centra pro výzkum rakoviny v Heidelbergu metodou „ ^{32}P -postlabeling“ (Stiborová et al., 2004b). Detaily jsou popsány v citaci (Stiborová et al., 2004b) a publikacích, které tvoří součást disertační práce jako *přílohy 2, 3, 5-7*.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 METABOLISMUS ELLIPTICINU CYTOCHROMY P450

V první části disertační práce byl studován metabolismus ellipticinu v systému *in vitro*. Byla sledována jak detoxikační, tak i aktivační cesta katalyzovaná především cytochromy P450. Byly použity izolované purifikované enzymy, rekombinantní enzymy (Supersomes™) a mikrosomální frakce izolované z orgánů králíka, potkana i myši.

Cytochromy P450 obsažené v jaterní tkáni se významně podílejí na přeměně ellipticinu na jeho metabolity (Kotrbová et al., 2006; Stiborová & Frei, 2001). Pro funkci cytochromů P450 je nezbytná jejich kooperace s dalším membránovým enzymem MFO systému, NADPH:cytochrom P450 reduktasou, a to v prostředí, které umožňuje jejich funkční konformaci a vzájemnou interakci (membrána endoplasmatického retikula) (Hollenberg, 1993; Nadler et al., 1988; Tamburini et al., 1986). Za další důležitou součást MFO systému je považován cytochrom b₅, jehož úloha a mechanismus působení však není ještě zcela objasněný (Schenkman et al., 2003).

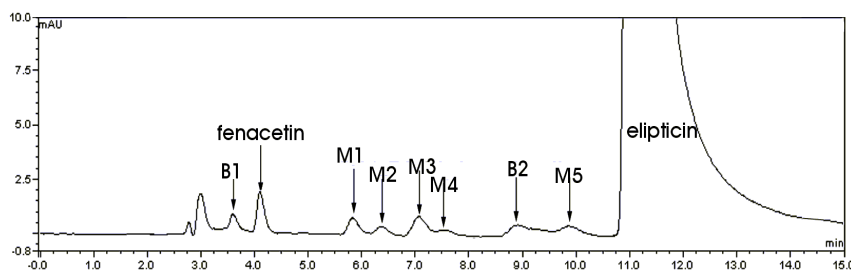
Ellipticin je všemi typy použitých mikrosomů i purifikovaných enzymů za přítomnosti NADPH-generujícího systému oxidován. Vzniklé metabolity byly separovány pomocí HPLC (*kap. 3.5.2, Obrázek 17*). Plochy „píků“ jednotlivých metabolitů byly vztahovány k ploše „píku“ vnitřního standardu fenacetinu.

Struktura separovaných metabolitů byla již určena v předchozích studiích v naší laboratoři s využitím hmotnostní spektrometrie a NMR (Stiborová et al., 2004a).

Jedná se o metabolity ellipticinu :

- **M1** : 9-hydroxyellipticin
- **M2** : 12-hydroxyellipticin
- **M3** : 13-hydroxyellipticin
- **M4** : 7-hydroxyellipticin
- **M5** : N(2)-oxid ellipticinu

Metabolit M2 (12-hydroxyellipticin) může vznikat i přeměnou metabolitu M5 (N²-oxid ellipticinu) Polonowského přesmykem.

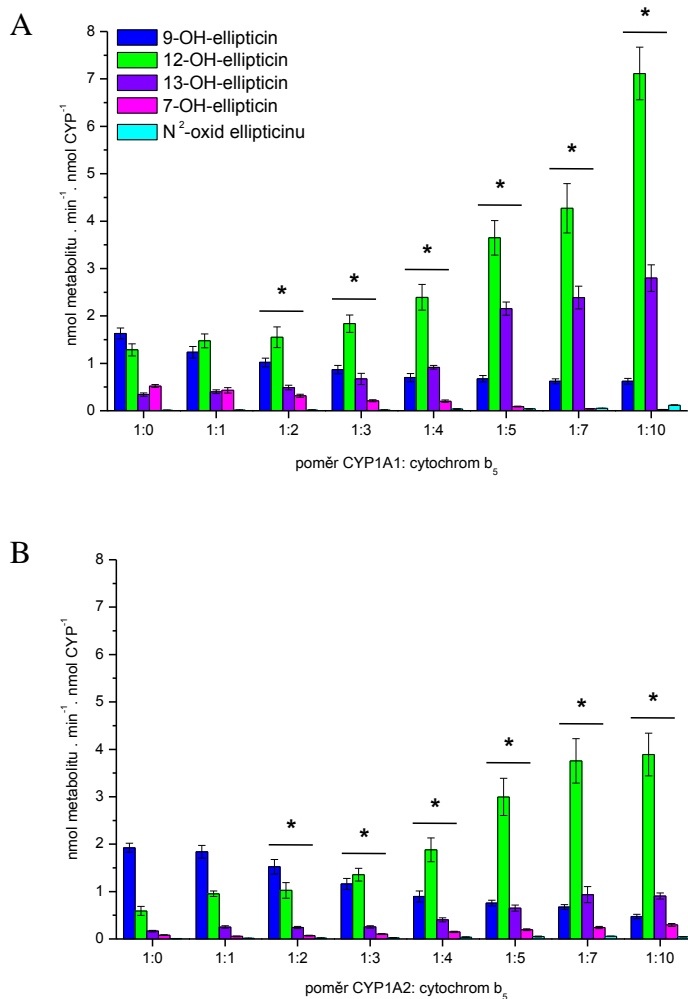


Obrázek 17 Metabolity ellipticinu tvořené oxidací ellipticinu potkaním mikrosomálním systémem separované a detekované pomocí RP-HPLC (Píky B1 a B2 jsou přítomné i v kontrolních inkubacích bez ellipticinu) (Kotrbová, 2005).

4.1.1 Oxidace ellipticinu cytochromy P450 1A1 a 1A2 za přítomnosti cytochromu b_5

V této části práce jsme studovali vliv cytochromu b_5 na oxidaci ellipticinu CYP1A1 a 1A2, a to v rekonstituovaném systému purifikovaných enzymů CYP1A1 a 1A2 s NADPH: CYP reduktasou. V experimentech byl použit rekombinantně připravený enzym CYP1A1. Použité preparáty CYP1A2, cytochromu b_5 a NADPH:CYP reduktasy byly izolované z jater králíka.

V první části studie jsme sledovali vliv koncentrace cytochromu b_5 na tvorbu jednotlivých metabolitů ellipticinu. Cytochrom b_5 byl přidáván k CYP1A1/2 v rekonstituovaném systému v poměru CYP: b_5 = 1:1 až 1:10 (1 = 100 pmol CYP). Získané výsledky ilustruje **Obrázek 18**.



Obrázek 18 Vliv cytochromu b_5 na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 1A1 (A) a 1A2 (B); Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření. * $p < 0.001$ (Studentův t-test).

V experimentech bylo zjištěno, že vlivem zvyšující se koncentrace cytochromu b_5 v rekonstituovaných systémech CYP1A1 i 1A2 dochází k významné změně v podílu tvorby jednotlivých metabolitů ellipticinu. To je unikátní zjištění, které dosud nebylo v literatuře popsáno. Dosud je známo, že cytochrom b_5 sice ovlivňuje stimulačně či inhibičně (Canova-Davis et al., 1982; Stiborova et al., 2006b; Zhang et al., 2005, 2008) oxidaci různých substrátů cytochromů P450, nebylo však popsáno, že se zásadně mění spektrum produktů oxidace těchto substrátů.

Trend těchto změn je srovnatelný pro oba cytochromy podrodiny 1A. Tvorba detoxikačních metabolitů, 9-hydroxyellipticinu (M1) a v případě CYP1A1 i tvorba 7-hydroxyellipticinu (M4), byla snížena. Tyto metabolity jsou, vzhledem k tomu, že po

druhé fázi jejich biotransformace vylučovány z organismu, považovány za metabolity detoxikační (Auclair, 1987). Stimulační efekt cytochromu b_5 bylo možno pozorovat na zvýšené tvorbě 12-hydroxyellipticinu (M2), 13-hydroxyellipticinu (M3) a N^2 -oxidu ellipticinu (M5) (**Obrázek 18**). Tedy metabolitů aktivačních, které zodpovídají za tvorbu kovalentních aduktů s DNA.

Cytochrom b_5 tak tedy výrazně stimuluje oxidaci ellipticinu cytochromy P450 1A1 a 1A2 na farmakologicky významné deriváty. Tento poznatek byl potvrzen i sledováním tvorby aduktů ellipticinu s DNA metodou ^{32}P -postlabeling. Cytochrom b_5 v systému CYP1A1 a 1A2 rekonstituovaných s NADPH:CYP reduktasou zvyšoval množství vznikajících aduktů s DNA (**Tabulka 3**). Příloha č. 8

Tabulka 3 Vliv cytochromu b_5 na tvorbu aduktů ellipticinu s DNA aktivovaného cytochromy P450 1A1 a 1A2 rekonstituovanými s NADPH:CYP reduktasou

Enzymový systém	DNA adukty (RAL . 10^{-7})		
	Adukt 1	Adukt 2	Total
CYP1A1 + NADPH:CYP reduktasa (1:1)	1.6 ± 0.2	0.8 ± 0.1	2.4 ± 0.3
CYP1A1 + NADPH:CYP reduktasa + cytochrom b_5 (1:1:5)	9.9 ± 0.6*	1.8 ± 0.3*	11.7 ± 0.9*
CYP1A2 + NADPH:CYP reduktasa (1:1)	0.9 ± 0.1	0.3 ± 0.1	1.2 ± 0.2
CYP1A2 + NADPH:CYP reduktasa + cytochrom b_5 (1:1:5)	3.5 ± 0.2*	0.8 ± 0.2	4.3 ± 0.3*

100 pmol CYP1A1/2 bylo rekonstituováno se 100 pmol NADPH:CYP reduktasy v absenci či přítomnosti 500 pmolů cytochromu b_5 , 100 μM ellipticin, 1 mM NADPH, 1 mg DNA a 0.1M fosfátový pufr, pH 7.4 byly použity v inkubačních směsích. DNA byla izolována fenol-chloroformovou extrakcí a adukty ellipticinu s DNA analyzovány pomocí metody ^{32}P -postlabeling; Hodnoty jsou průměrem šesti nezávislých měření. * $p < 0.001$ (Studentův *t*-test)

Získané výsledky mohou vysvětlit dříve nalezenou překvapivě rozdílnou účinností cytochromů P450 1A1 a 1A2 oxidovat ellipticin na metabolity vytvářející adukty s DNA *in vitro* a *in vivo*.

V experimentech *in vivo* bylo totiž zjištěno, že tvorba aduktů ellipticinu s DNA závisí na množství cytochromů P450 3A1 a dále cytochromů P450 1A1 a 1A2. Efektivita CYP3A1 aktivovat ellipticin na metabolity tvořící adukty s DNA

(12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin) byla potvrzena i v experimentech *in vitro* (Stiborová et al., 2003a).

Naopak CYP1A1 a 1A2 rekonstituované v systému *in vitro* s NADPH:CYP reduktasou oxidovaly ellipticin především na metabolity detoxikační (9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticin) (Aimová et al., 2007). Zjištění, že cytochrom b_5 mění oxidaci ellipticinu CYP1A1 a 1A2 z metabolitů detoxikačních na aktivační (**Obrázek 18**), tak vysvětluje výsledky nalezené v experimentech *in vivo*. Vysoká účinnost cytochromů P450 podrodiny 1A aktivovat ellipticin *in vivo* vyplývá z vlivu cytochromu b_5 , který je přirozenou součástí membrán endoplasmatického retikula a může ovlivnit katalytickou účinnost cytochromů P450. Tento předpoklad byl též potvrzen dalšími experimenty využívajícími mikrosomální systémy několika tkání potkana (kap. 4.2).

Pro potvrzení těchto výsledků také v experimentech *in vivo* jsou připravovány studie s živočišnými modely, u nichž je eliminována exprese cytochromu b_5 (Finn et al., 2008; McLaughlin et al., 2010).

Výsledky z této části disertační práce jsou uvedeny též v publikaci, která tvoří součást práce jako *příloha č. 8*.

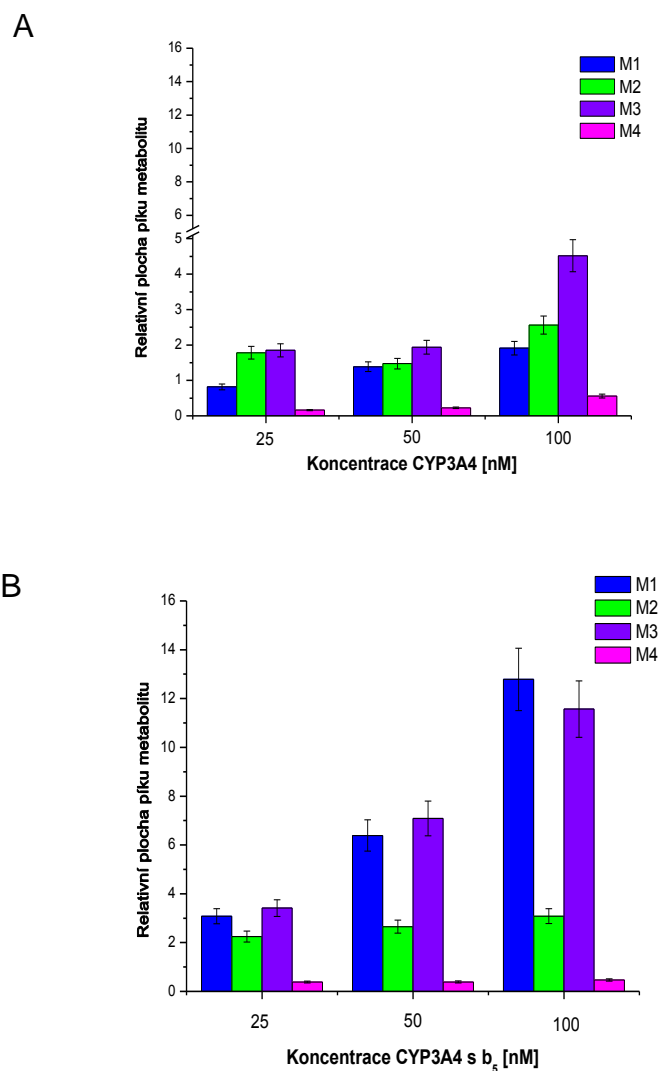
4.1.2 Oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4 za přítomnosti cytochromu b_5

V další části práce jsme se zaměřili na studium metabolismu ellipticinu cytochromem P450 3A4. CYP3A4 patří mezi nejvýznamnější cytochromy P450 zapojené do metabolismu léčiv v lidském organismu. CYP3A4 je hojně exprimován v tkáni jater, které jsou tímto jedním z hlavních orgánů metabolizující xenobiotika (Gonzalez et al., 1984; Ioannides et al., 1993; Juchau et al., 1992; Stiborová et al., 1999).

V této části disertační práce byl sledován vliv cytochromu b_5 na oxidaci ellipticinu lidským CYP3A4 v experimentech *in vitro*. Pro studii byly použity mikrosomální systémy hmyzích buněk transfekovaných Bakulovirem (SupersomyTM), obsahující MFO systém tvořený jedinou lidskou rekombinantní formou cytochromu P450 (v našem případě CYP3A4) a NADPH:CYP reduktasou popř. i cytochromem b_5 .

Efektivita oxidace ellipticinu vzrůstá se zvyšující se koncentrací CYP3A4 (SupersomesTM) (Obrázek 19A). Z výsledků je patrné, že CYP3A4 účinně oxiduje

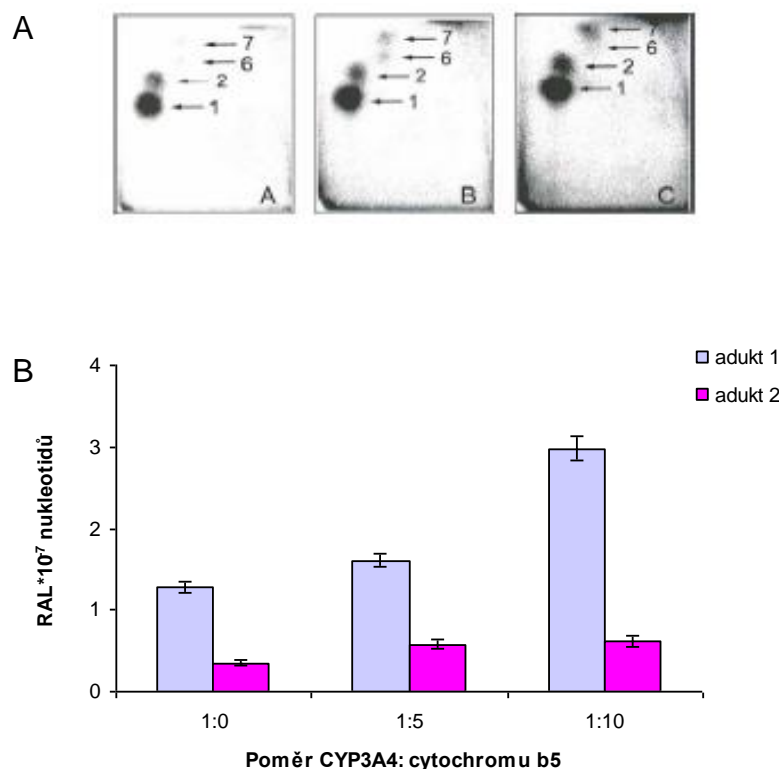
ellipticin převážně za tvorby aktivačních metabolitů, 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu, interagujících s DNA za vzniku kovalentních aduktů. Z experimentů studujících aktivaci ellipticinu za využití CYP3A4 s exprimovaným lidským cytochromem b₅ (Supersomes™) je patrné (Obrázek 19B), že se zvyšující se koncentrací cytochromu b₅ dochází ke stimulaci tvorby především 9-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu, 7-hydroxyellipticin je tvořen jen v minoritním množství. Metabolit N²-oxid ellipticinu nebyl, vzhledem k jeho nestabilitě, kvantifikován.



Obrázek 19 Vliv různých koncentrací (25, 50 a 100 nM) CYP3A4 (A) a CYP3A4 s exprimovaným cytochromem b₅ (B) na oxidaci ellipticinu. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření.

Zvýšená tvorba aktivačních metabolitů vzniklých oxidací ellipticinu CYP3A4 za přítomnosti cytochromu b₅ byla zároveň potvrzena sledováním tvorby aduktů ellipticinu s DNA metodou „³²P-postlabeling“ (Obrázek 20A). Vzrůstající koncentrace cytochromu b₅

koreluje se zvýšenou tvorbou minimálně dvou aduktů ellipticinu s DNA. Zejména pak s tvorbou majoritního aduktu 1, který je generován ze 13-hydroxyellipticinu.



Obrázek 20 Vliv cytochromu b_5 na tvorbu aduktů DNA s ellipticinem aktivovaným lidským CYP3A4 (*Supersomes*TM). CYP3A4 a cytochrom b_5 byly použity v poměru 1:0 (A), 1:5 (B) a 1:10 (C). Adukty byly analyzovány metodou „³²P-postlabeling“. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. (Studentův t -test).

Otázka jakým podílem se na aktivačních a detoxikačních reakcích ellipticinu podílí CYP3A v organismu potkana je řešena v další kapitole 4.2.

4.2 AKTIVACE ELLIPTICINU JATERNÍMI, PLICNÍMI A LEDVINNÝMI MIKROSOMÁLNÍMI SYSTÉMY POTKANŮ *IN VITRO*

Studium participace CYP a dalších enzymů aktivujících ellipticin, peroxidasa, na tvorbě kovalentních aduktů ellipticinu s DNA bylo sledováno v experimentech, využívajících mikrosomální systémy z jater, ledvin a plic potkanů kontrolních (nepremedikovaných), a také premedikovaných ellipticinem (40 mg/kg tělesné váhy). Tyto orgány byly zvoleny, protože nejvyšší hladiny kovalentních aduktů ellipticinu s DNA po

intraperitoneálním podáním elliptycinu *in vivo* byly nalezeny v játrech, dále v menším množství též v ledvinách a plicích (Stiborová et al., 2003a, 2007b, 2008).

Játra jsou orgán bohatý na rozličné CYP, zatímco ledviny a plíce exprimují vedle nižších hladin CYP též další enzymy aktivující ellipticin, jako jsou peroxidasy. Příspěvky jednotlivých enzymů na aktivaci elliptycinu jak v játrech, i v dalších tkáních, však nejsou zcela specifikované. Předchozí studie sice dokázaly, že nejdůležitějšími enzymy aktivujícími ellipticin *in vivo* jsou v potkaním modelu CYP3A1 a 1A (Stiborová et al., 2003a), ale podíl těchto enzymů na aktivaci v jednotlivých orgánech není ještě zcela objasněn.

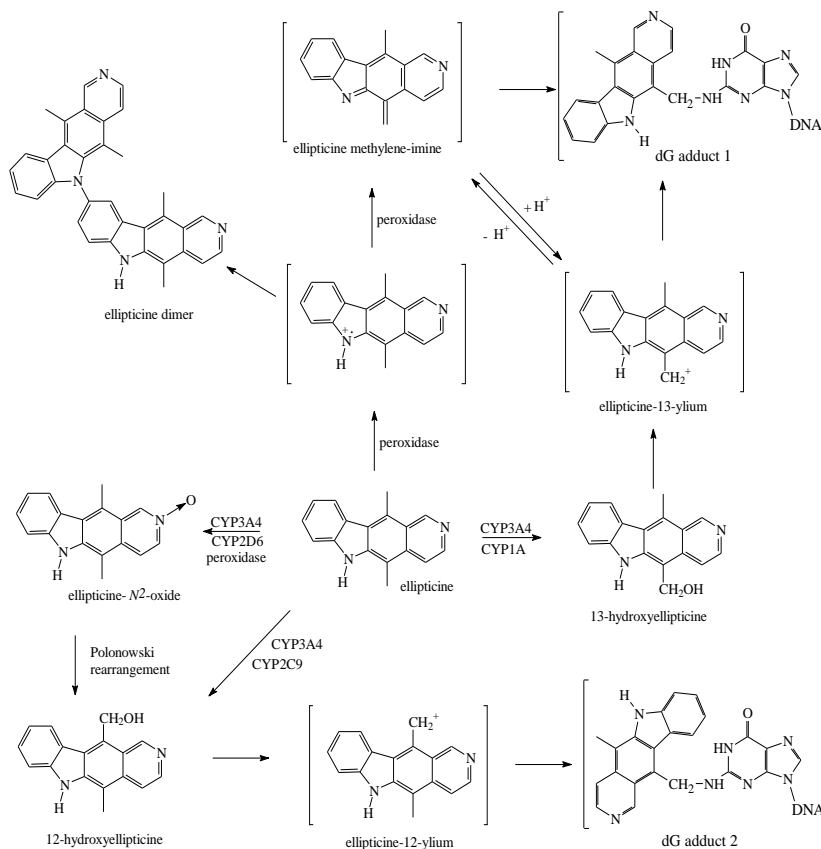
4.2.1 Aktivace elliptycinu hepatálním a extrahepatálním mikrosomálním systémem potkana

Jak již bylo uvedeno v předchozích kapitolách, ellipticin, po své metabolické aktivaci CYP a peroxidasami, vytváří kovalentní adukty s DNA (Stiborová et al., 2001a; 2003a,b; 2004a; 2006a; 2007a,b; Poljaková et al., 2006). Majoritní adukt je tvořený ze 13-hydroxyelliptycinu a minoritní z 12-hydroxyelliptycinu. Oba adukty jsou tvořené jak *in vivo*, tak *in vitro* (v tomto případě mikrosomálními systémy potkanů a myši premedikovaných ellipticinem). Stejně adukty byly nalezeny i v nádorových buněčných liniích, jako jsou MCF-7 buňky lidského prsního adenokarcinomu (Bořek-Dohalská et al., 2004), leukemické buněčné linie HL-60 a CCRF-CEM (Poljaková et al., 2007) a pod. Nežádoucí účinky elliptycinu na výše zmíněné buněčné linie úzce souvisí s vysokou koncentrací kovalentních aduktů elliptycinu s DNA tvořených v těchto buňkách a jsou také závislé na expresi enzymů jako např. CYP1A1, 1B1, 3A4 a peroxidasy (laktoperoxidasa, myeloperoxidasa a cyklooxygenasa). Farmakologická účinnost, ale i toxické vedlejší účinky elliptycinu jsou tedy závislé na množství enzymů, které ellipticin metabolizují.

Studie prezentovaná v této části disertační práce přispívá k porozumění, které enzymy jsou zapojené do metabolické aktivace elliptycinu. Jak již bylo zmíněno výše, lidské a potkaní CYP1A a 3A jsou hlavními enzymy oxidujícími ellipticin *in vitro* jak na detoxikační metabolity (7-hydroxy- a 9-hydroxyellipticin), tak i aktivační metabolity (12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin) (Stiborová et al., 2001; 2003a,b; 2004a; 2006a; 2008; Moserová et al., 2008). Tvorba jednotlivých metabolitů je však závislá na interakci těchto enzymů s cytochromem b_5 (kap. 4.1.1 a 4.1.2). Účinnými peroxidasami participujícími na

aktivaci elliptycinu jsou lidská cyklooxygenasa-2 (COX-2), ovčí cyklooxygenasa-1 (COX-1), hovězí laktoperoxidasa (LPO) a lidská myeloperoxidasa (MPO) (

Obrázek 21) (Poljaková et al., 2006; Stiborová et al., 2007a).



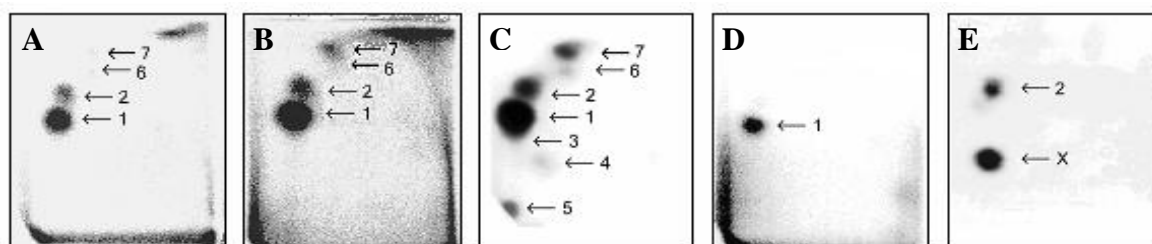
Obrázek 21 *Metabolismus elliptycinu lidskými peroxidasami a CYP.*
(Poljaková et al., 2006; Stiborová et al., 2007a)

V této části disertační práce jsme se soustředili na zhodnocení podílu jednotlivých CYP a peroxidas aktivovat ellipticin *in vitro*.

Ellipticin je aktivován mikrosomálními enzymy na jeden majoritní a tři minoritní adukty s DNA (**Obrázek 22**, skvrna 1, 2, 6 a 7). Uvedené adukty jsou tvořeny stejně jako v případě tvorby aduktů v experimentech *in vivo* (**Obrázek 22C**). Kovalentní adukty 1 a 2 jsou tvořeny z metabolitů 13-hydroxyelliptycinu (**Obrázek 22D**) a 12-hydroxyelliptycinu (**Obrázek 22E**), vznikajících oxidací elliptycinu CYP a peroxidasami (**Obrázek 21**).

Nejprve byla testována aktivita enzymů mikrosomů jater, plic a ledvin izolovaných z kontrolních potkanů, a to bez NADPH (kofaktoru NADPH:CYP reductasy). V jaterních

mikrosomech nebyly nalezeny adukty 1, 6 a 7, ale adukt 2 byl jasně detekován (*Tabulka v příloze č. 1*). Naproti tomu ve vzorcích obsahujících ledvinné nebo plicní mikrosomy kontrolních potkanů byly nalezeny všechny adukty (1, 2, 6 a 7) (*Tabulka v příloze č. 1*). Toto zjištění naznačuje, že za aktivaci ellipticinu v ledvinách a plicích jsou odpovědné enzymy jiné, než enzymy závislé na aktivitě NADPH:CYP reductasy. Tyto výsledky byly též jasně potvrzeny studií s použitím myšího modelu HRNTM („Hepatic cytochrome P450 Reductase Null“), ve kterém byl deletovaný gen pro NADPH:CYP reductasu v játrech, která následně vede téměř ke ztrátě funkce CYP (kap 4.4) (Stiborová et al., 2008, *příloha č. 2*). Lze předpokládat, že v tomto myším modelu HRN dochází k aktivaci ellipticinu za účasti enzymů nezávislých na NADPH:CYP reductase (Stiborová et al., 2008), jako jsou např. peroxidasy nebo CYP2S1 (Saarikoski et al., 2005; Downie et al., 2005; Bui et al., 2009).



Obrázek 22 Autoradiografické profily aduktů vzniklých v DNA *in vitro* aktivací ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem potkanů kontrolních (nepremedikovaných) (A), premedikovaných ellipticinem (40 mg/kg) (B), v DNA z jater potkanů premedikovaných ellipticinem (40 mg/kg) (C) a reakcí DNA s 13-hydroxyellipticinem (D) a 12-hydroxyellipticinem (E). Analýzy byly provedeny P1 nukleasovou verzí metody ³²P-postlabeling.

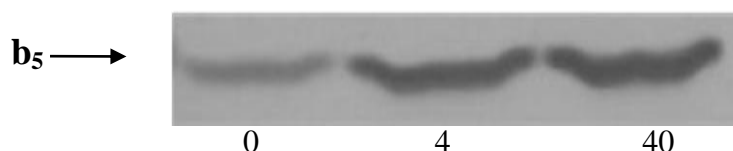
Pro hlubší prozkoumání, které enzymy, a do jaké míry, jsou zapojeny do aktivace ellipticinu, byla provedena i inhibiční studie s použitím kofaktorů a selektivních inhibitorů jednotlivých enzymů.

Byly použity selektivní inhibitory jak CYP, tak i peroxidas, jmenovitě α -naftoflavon (α -NF) inhibitor cytochromů P450 podrodiny 1A, především CYP1A1 (Rendic & DiCarlo 1997; Stiborová et al., 2005 a,b), furafyllin inhibitor CYP1A2, ketokonazol inhibitor enzymů CYP podrodiny 3A (Rendic & DiCarlo 1997; Stiborová et al., 2005b) a indomethacin, který je inhibitorem peroxidasy COX (Eling et al., 1992; Stiborová et al., 2005a).

Za použití jaterních, plicních a ledvinných mikrosomálních systémů kontrolních potkanů bylo zjištěno, že ketokonazol snižoval tvorbu aduktů s DNA, vznikajících účinkem enzymů závislých na NADPH. A to až o 93, 22 a 34 % (**Obrázek 24**, *Tabulka v příloze č. 1*). Naproti tomu, v jaterních a ledvinných mikrosomech z premedikovaných potkanů, nebyl zaznamenán vliv ketokonazolu tak významný jako v předchozím případě. Množství vznikajících aduktů s DNA bylo sníženo o 78 % v jaterních mikrosomech a o 6 % v ledvinných mikrosomech (*Tabulka v příloze č. 1*). Získané výsledky ukazují, že premedikací potkanů ellipticinem se mění poměr jednotlivých CYP v játrech a ledvinách tak, že CYP3A již není nejvýznamnějším enzymem katalyzujícím tvorbu aduktů ellipticinu s DNA. Tím se stává CYP1A1/2, který je premedikací ellipticinem v játrech a ledvinách potkana silně nabohacen. Jeho působením je indukována jak exprese proteinů těchto enzymů, tak i aktivita CYP1A1/2 (**Obrázek 25** v *kap. 4.2.2*, Aimová et al., 2007).

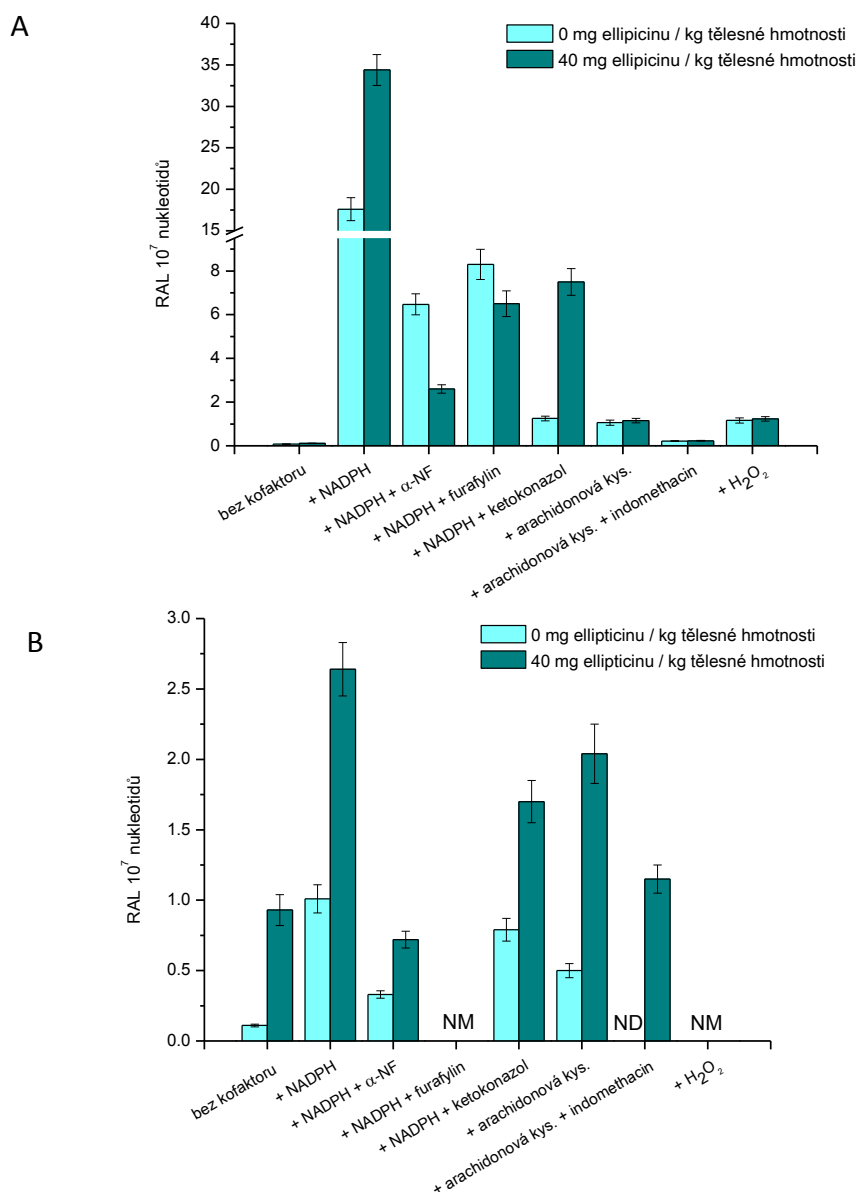
Pro potvrzení teorie o změně hlavního CYP, z CYP3A na 1A, metabolizujícího (aktivujícího) ellipticin, byl použit selektivní inhibitor právě pro podrodinu cytochromů P450 1A, α -naftoflavon. Tento inhibitor snižoval hladinu tvorby aduktů ellipticinu s DNA u všech použitých mikrosomálních systémů, jak kontrolních (nepremedikovaných), tak i premedikovaných ellipticinem. Mírný pokles byl zaznamenán při použití mikrosomů jater a plic premedikovaných potkanů. Významnější inhibiční účinek byl pozorován v případě ledvinných mikrosomů kontrolních i premedikovaných potkanů (**Obrázek 24**, *Tabulka v příloze č. 1*).

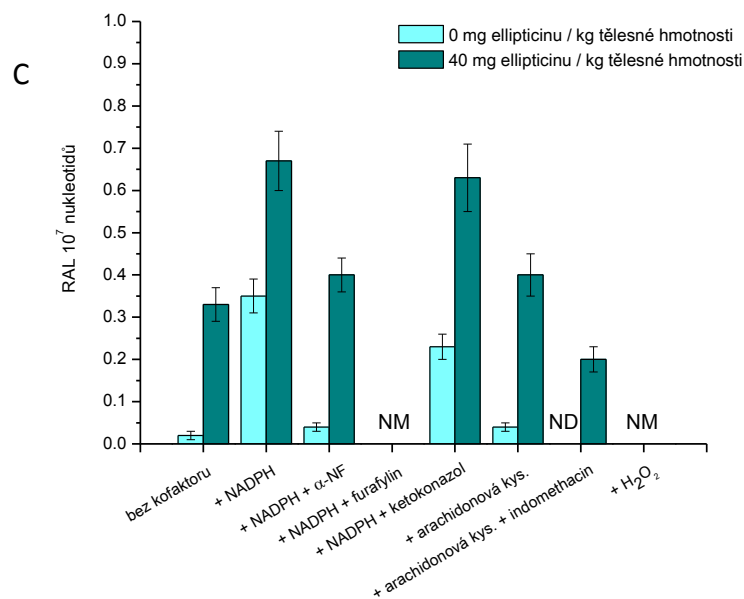
Dalším použitým inhibitorem pro CYP1A2 byl furafyllin, který významně snižoval hladinu vytvářených aduktů s DNA v jaterních mikrosomech (**Obrázek 24**, *Tabulka v příloze č. 1*). Tento inhibitor však nebyl použit v experimentech s mikrosomy ledvin a plic, jelikož CYP1A2 je v těchto orgánech exprimovaný pouze na velmi nízké úrovni.



Obrázek 23 Immunostanovení cytochromu b_5 v jaterní tkáni potkana premedikovaného ellipticinem 0, 4 a 40 mg/kg tělesné hmotnosti.

Stimulace tvorby aktivačních metabolitů ellipticinu v jednotlivých tkáních, především v játrech, potkanů premedikovaných ellipticinem, může též přispívat zvýšení exprese cytochromu b_5 (**Obrázek 23**). Imunostanovení (**Obrázek 23**) potvrzuje, že premedikací potkanů dochází k indukci cyt b_5 v játrech těchto zvířat. Z předchozích studií uvedených v kapitole 4.1.1 bylo zjištěno, že cytochrom b_5 ovlivňuje oxidaci ellipticinu CYP1A1 a 1A2 ve prospěch aktivačních metabolitů (Stiborová et al., 2006b a příloha č. 8). Můžeme proto tvrdit, že v orgánech premedikovaných potkanů, ve kterých dochází účinkem ellipticinu ke zvýšení exprese CYP1A1/2 (**Obrázek 26**, str. 78) a cytochromu b_5 (**Obrázek 23**), jsou adukty vytvářeny aktivačními metabolity vznikajícími působením především těchto enzymů CYP1A1/2.





Obrázek 24 Vliv inhibitorů CYP1A, 3A a COX na tvorbu aduktů ellipticinu s DNA v mikrosomech izolovaných z jater (A), plic (B) a ledvin (C) potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a potkanů premedikovaných ellipticinem (40 mg/kg tělesné hmotnosti). Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření. ND = nedetekováno, NM = nezměřeno.

Tyto výsledky jasně prokazují, že CYP1A hrají roli v aktivaci ellipticinu v játrech, plicích a ledvinách potkana. Premedikací ellipticinem, která má za následek zvýšení exprese CYP1A, dochází ke změně hlavních enzymů, z CYP podrodiny 3A na CYP podrodiny 1A, odpovědných za protinádorovou aktivitu ellipticinu vyplývající z jeho schopnost kovalentně modifikovat DNA v cílových tkáních.

Pro určení participace enzymů nezávislých na NADPH, jako jsou peroxidasy, byly použity substráty těchto enzymů arachidonová kyselina ev. peroxid vodíku, jmenovitě pro COX. Zvýšení tvorby aduktů ellipticinu s DNA po přidání arachidonové kyseliny bylo pozorováno u všech typů mikrosomů izolovaných z premedikovaných potkanů, nejvíce však v případě plicních mikrosomálních systémů. V jaterním systému není dosaženo takové stimulace tvorby aduktů s DNA jako při použití NADPH, což jasně ukazuje, že na aktivaci ellipticinu v této tkáni nejvíce participují CYP. Naproti tomu přítomnost arachidonové kyseliny a inhibitoru COX indomethacinu ve vzorcích s mikrosomálními systémy plic a ledvin ovlivňuje hladinu aduktů ellipticinu s DNA. Hladina aduktů s DNA je snížena inhibitorem COX (indomethacinem) při použití mikrosomů plic a ledvin premedikovaných potkanů v přítomnosti arachidonové kyseliny, a to o 77 % u systému

izolovaného z plic a 59 % u systému izolovaného z ledvin, oproti vzorkům v přítomnosti NADPH. Tyto výsledky jasně dokazují vysoký podíl peroxidasy (COX) na aktivaci ellipticinu ve studovaných extrahepatálních tkáních.

Výsledky uvedené jak v této části disertační práce, tak i v kapitole 4.1.1 prokazují unikátní aktivitu cytochromu b₅, kdy jeho působením dochází k „přepnutí“ metabolismu ellipticinu CYP1A1 a 1A2 z detoxikační cesty na aktivační. Tyto změny vedou ke zvýšené tvorbě aduktů ellipticinu s DNA. Vliv cytochromu b₅, který způsobuje změnu v oxidaci ellipticinu, jak již bylo řečeno výše, můžeme předpokládat i *in vivo*, jelikož premedikací ellipticinem dochází ke zvýšení hladiny exprese cytochromu b₅ v jaterní tkáni potkanů (**Obrázek 23**, str. 74). Ellipticin, který je ligandem Ah receptoru (Gasiewicz et al., 1996), zvyšuje i hladinu exprimovaného CYP1A1/2. Touto indukci v játrech (**Obrázek 25**, kap. 4.2.2) následně dochází ke zvýšení tvorby kovalentních aduktů s DNA, za kterou jsou odpovědné CYP1A1/2 oproti aduktům vytvářených CYP3A (Stiborová et al., 2010).

4.2.2 Oxidace ellipticinu hepatálními a extrahepatálními systémy potkana

Pro doplnění představy, k jakým změnám dochází při premedikaci potkanů ellipticinem, byl, vedle aktivační cesty ellipticinu a vzniku aduktů s DNA, sledován i metabolismus ellipticinu na jednotlivé metabolity. Obzvláště zajímavá byla studie metabolismu ellipticinu jiným enzymovým systémem než je systém jaterní. Jmenovitě s enzymovým systémem mikrosomů izolovaných z ledvin a plic potkana, které ještě nebyly prozkoumány tak detailně jako systém jater. Pro detekci a separaci vzniklých metabolitů ellipticinu byla využita metoda HPLC (kap 3.5.2).

Stimulace tvorby aduktů premedikací potkanů ellipticinem, popsána v předchozí kapitole, je ve shodě se zvýšením účinnosti oxidace ellipticinu izolovaným jaterním mikrosomálním systémem ze zvířat premedikovaných ellipticinem (**Obrázek 24**, Tabulka v příloze č. 1). Ellipticin je oxidován mikrosomálním systémem jater, plic i ledvin na čtyři metabolity: 7-hydroxy-, 9-hydroxy-, 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin (**Obrázek 8**, str. 27). N²-oxid ellipticinu vzniká taktéž, ale je spontánně přeměněn na 12-hydroxyellipticin. Jeho tvorba tudíž nebyla kvantifikována.

Ellipticin působí jako silný induktor cytochromů P450 podrodiny 1A. Ve tkáních potkanů premedikovaných ellipticinem (4, 40 a 80 mg/kg) byla zvýšena jak hladina

CYP1A1 a 1A2 (**Obrázek 25**), tak i jejich aktivita (*příloha č. 4*). Premedikace ellipticinem značně mění podíl CYP1A1 a 1A2 jak v játrech (**Obrázek 25**), tak i v dalších testovaných orgánech (ledviny, plíce) (Aimová et al., 2007).

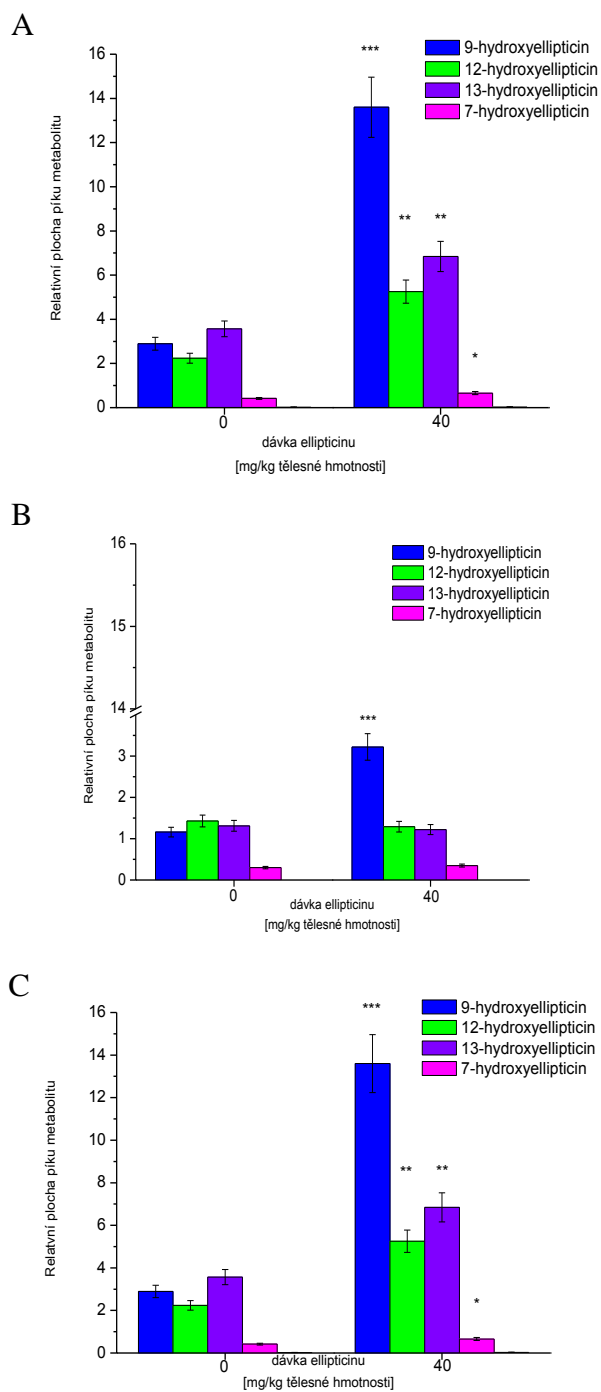


Obrázek 25 Immunostanovení CYP1A1/2 v mikrosomech jater potkanů premedikovaných ellipticinem, použity byly jaterní mikrosomy potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných ellipticinem (4, 40 a 80 mg/kg tělesné hmotnosti) (převzato z Aimová et al., 2007).

Pozorovaný nárůst tvorby detoxikačních metabolitů (7-hydroxy- a 9-hydroxyellipticin) v mikrosomálních enzymových systémech potkanů premedikovaných ellipticinem, vytvářených především CYP1A1/2, je zřejmý z indukce těchto enzymů ellipticinem (**Obrázek 25 a příloha č. 4**). Je však zajímavé, že dochází i ke stimulaci vzniku 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu.

Při oxidaci ellipticinu ledvinným a plicním mikrosomálním systémem premedikovaných potkanů nedocházelo k nárůstu tvorby aktivačních metabolitů (12-hydroxy a 13-hydroxyellipticin), avšak množství detoxikačních metabolitů bylo zvýšeno (**Obrázek 26**). Toto zjištění signalizuje, že v ledvinách a plicích dochází vlivem CYP1A1/2 zejména k detoxikaci ellipticinu.

Za aktivaci ellipticinu jsou v těchto orgánech odpovědné peroxidasy (především COX). Což potvrzují i výsledky, že v extrahepatálních tkáních byla zjištěna 4-10krát vyšší aktivita cyklooxygenasy v aktivaci ellipticinu oproti jaterní tkáni (**Obrázek 24**, str. 76, *Tabulka v příloze č. 1*).

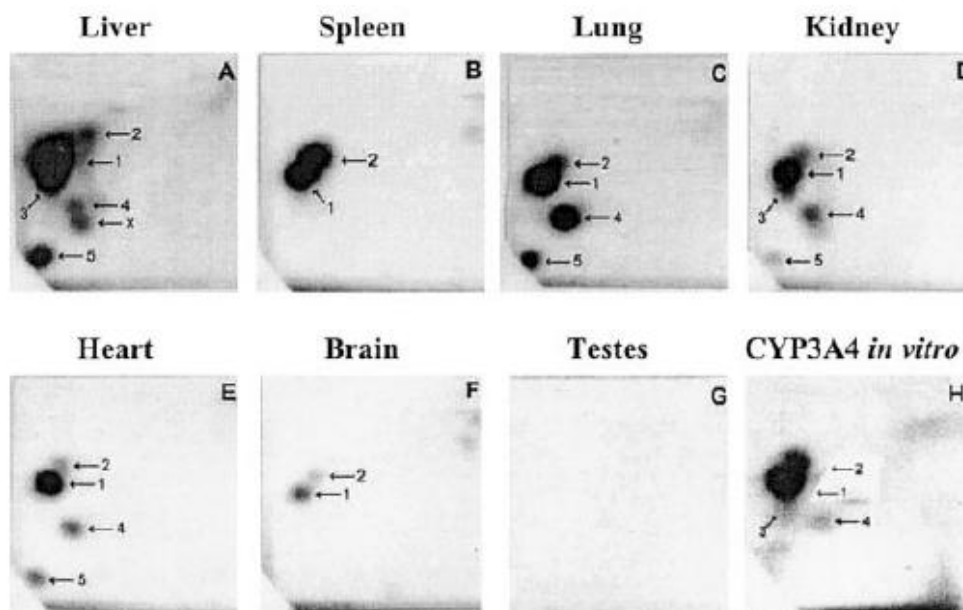


Obrázek 26 Metabolismus ellipticinu mikrosomálním systémem jater (A), plic (B) a ledvin (C) kontrolních potkanů (nepremedikovaných) a potkanů premedikovaných ellipticinem (40 mg/kg). Inkubační směsi obsahovaly mikrosomy (0.2 mg/ml proteinu) a 10 μM ellipticin. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření. * $p < 0,001$ (Studentův t -test).

4.3 AKTIVACE ELLIPTICINU ZA TVORBY ADUKTŮ S DNA

IN VITRO A IN VIVO

Jak již bylo řečeno v předchozích částech této disertační práce, cytochromy P450 mají schopnost aktivovat ellipticin na metabolity, které mohou vytvářet kovalentní adukty s DNA. Tvorba těchto aduktů byla prokázána jak *in vitro* s různými enzymovými systémy (kap. 4.2), *in vitro* v plicích fibroblastických buňkách křečka (V-79) transfekovaných lidskými cytochromy P450 (Frei et al., 2002), v buněčných liniích lidského prsního adenokarcinomu (buňky MCF-7) (Bořek-Dohalská et al., 2004) a leukemických buňkách (HL-60, CCRF-CEM) (Poljaková et al., 2007), tak i *in vivo* v některých orgánech (játra, slezina, plíce, ledviny, srdce, mozek) potkana (**Obrázek 27**) a myši exponovaných tomuto protinádorovému léčivu (Stiborová et al., 2003a) (**Obrázek 28**).

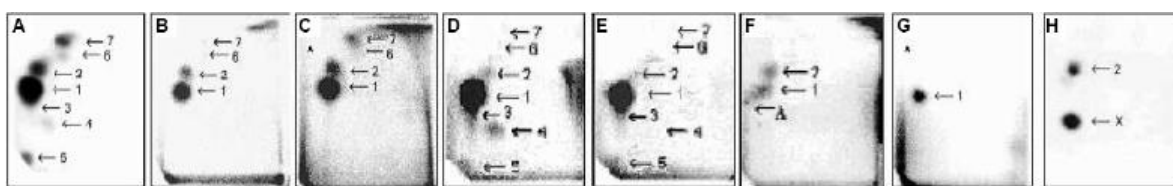


Obrázek 27 Autoradiografie aduktů ellipticinu s DNA tvořených *in vivo* v játrech (A), slezině (B), plicích (C), ledvinách (D), srdci (E), mozku (F), varlatech (G) potkanů premedikovaných ellipticinem a *in vitro* v rekonstituovaném systému CYP3A4 s NADPH: CYP reduktasou. Měření bylo provedeno P1 nukleasovou verzí metody ^{32}P -postlabeling (převzato z Stiborová et al., 2003a).

Jak vyplývá z předchozích studií (Stiborová et al., 2001a, 2003b; Frei et al., 2002), tak i z výsledků této disertační práce, tvorba majoritního aduktu 1 *in vitro* je závislá na aktivaci cytochromy P450. Stejná závislost byla zjištěna i *in vivo* (Stiborová et al., 2003a), kde bylo zjišťováno zastoupení jednotlivých CYP v aktivaci ellipticinu. Tvorba

majoritního aduktu 1 (**Obrázek 27**) je úzce spjata s expresí CYP3A1 a CYP1A v orgánech kontrolních potkanů. Také v případě minoritního aduktu 5 (**Obrázek 27**) jeho tvorba závisí na množství CYP3A1 a 1A. Korelace mezi vznikem minoritních aduktů 2 a 4 (**Obrázek 27**) a expresí CYP nebyla nalezena (Stiborová et al., 2003a)

V předkládané disertační práci byl pro studie sledující zapojení monooxygenasového enzymového systému, resp. CYP s NADPH:CYP reduktasou, využit zvířecí model myši, u kterých byl „deletován“ gen pro NADPH:CYP reduktasu v játrech, nesoucích označení HRNTM (**H**epatic NADPH:CYP **R**eductase **N**ull) (příloha č. 2).



Obrázek 28 Autoradiografie aduktů ellipticinu v DNA tvořených *in vivo* v játrech potkana (A), HRNTM myši linii (D) a „wild type“ kontrolní myši linii (E); *in vitro* s DNA po aktivaci ellipticinu jaterními mikrosomy kontrolních (B) a ellipticinem premedikovaných (C) potkanů a „wild type“ myši (F); *in vitro* s metabolity ellipticinu, 13-hydroxyellipticinem (G) a 12-hydroxyellipticinem (H) bez enzymové aktivace.

V tkáních potkana i myši *in vivo* byly detekovány nejméně dva adukty ellipticinu s DNA. Těmi hlavními jsou **majoritní adukt** (adukt 1, **Obrázek 27** a **Obrázek 28**), který je generován z ellipticinu po jeho metabolické aktivaci na 13-hydroxyellipticin (M3) a **minoritní adukt** (adukt 2, **Obrázek 27** a **Obrázek 28**), který vzniká jak po aktivaci biotransformačními enzymy, tak i bez přítomnosti enzymového systému, pravděpodobně aktivací ellipticinu autooxidací (Stiborová et al., 2001a; 2003a,b). Adukt 2 je generován především z metabolitu 12-hydroxyellipticinu (M2), který může vznikat jak účinkem CYP z ellipticinu, a taktéž z N^2 -oxidu ellipticinu (M5) Polonowského přesmykem.

O struktuře těchto aduktů je zatím známa pouze ta skutečnost, že jsou tvořeny zmíněnými metabolity ellipticinu, respektive karbeniovými ionty těchto metabolitů, s deoxyguanosinem v DNA (Stiborová et al., 2003a,b).

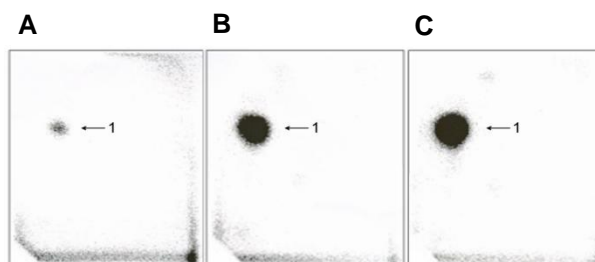
Nicméně, vzhledem k reaktivitě těchto intermediátů byla struktura obou aduktů již navržena. Z chemických vlastností obou metabolitů lze dedukovat, že se spontánně rozpadají na karbeniové ionty, které ochotně reagují s exocyklickou amino skupinou deoxyguanosinu (**Obrázek 10**, str. 30). Nicméně detailní charakterizace obou aduktů a

příprava a izolace majoritního aduktu, tvořeného z 13-hydroxyellipticinu je stále předmětem výzkumu této disertační práce a je popsána v kapitole 4.3.1. Výsledky jsou též uvedeny v publikaci tvořící součást disertační práce jako příloha č. 3.

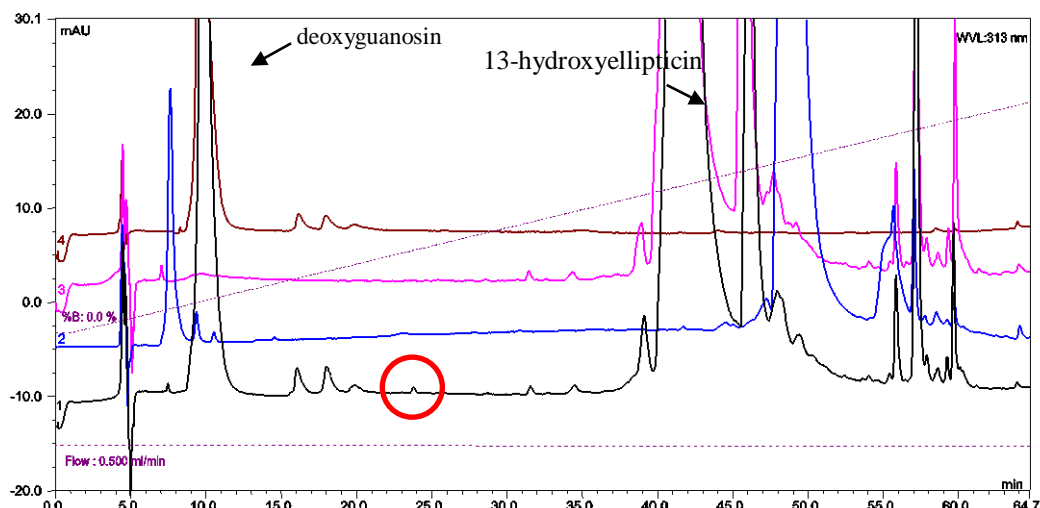
4.3.1 Izolace a částečná charakterizace aduktu tvořeného 13-hydroxyellipticinem s deoxyguanosem v DNA

K izolaci aduktu tvořeného reakcí 13-hydroxyellipticinu s deoxyguanosem byla vyvinuta originální metoda jeho separace pomocí HPLC, vedoucí zejména k oddělení aduktu, eluovaného v retenčním čase 23.8 min, od dalších nezreagovaných součástí (13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosu) inkubační směsi (**Obrázek 30**, příloha č. 3).

Deoxyguanosinový adukt tvořený v DNA reakcí s 13-hydroxyellipticinem byl nejdříve detekován a kvantifikován metodou „³²P-postlabeling“ (**Obrázek 29**). Jak je patrné z uvedeného obrázku, tvorba deoxyguanosinového aduktu s 13-hydroxyellipticinem je závislá na pH. Při pH 6.0 bylo detekováno pouze malé množství vytvářeného aduktu, zatímco zvýšení pH mělo za následek nárůst tvorby tohoto aduktu. Srovnáním jednotlivých autoradiografických snímků získaných metodou „³²P-postlabeling“ je patrný nárůst tvorby aduktu především při pH 8.4. Tato závislost byla potvrzena i pomocí HPLC, která je metodou mnohem méně citlivou než je metoda „³²P-postlabeling“. Proto byl adukt vznikající z 13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosu detekován pouze jako malý „pík“ aduktu, a to tvořený při pH 8.4 (**Obrázek 30**, v červeném kroužku).



Obrázek 29 Autoradiografie aduktu tvořeného 13-hydroxyellipticinem s deoxyguanosem v DNA v závislosti na pH, analyzované metodou „³²P-postlabeling“. pH 6.0 (A); pH 7.4 (B); pH 8.4 (C).

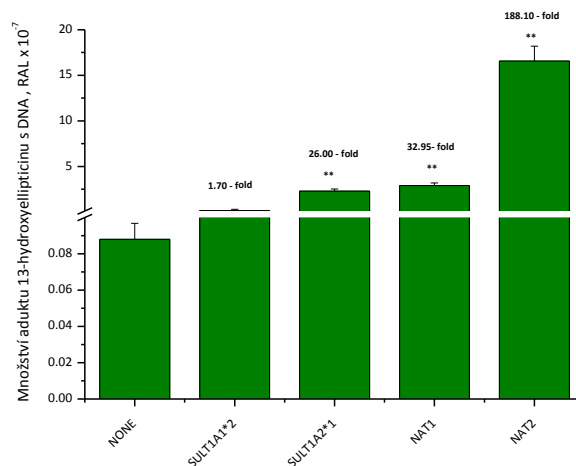


Obrázek 30 Chromatogram reakční směsi 13-hydroxyellipticinu (3) a deoxyguanosinu (4) při pH 7.4(2); 8.4 (1).

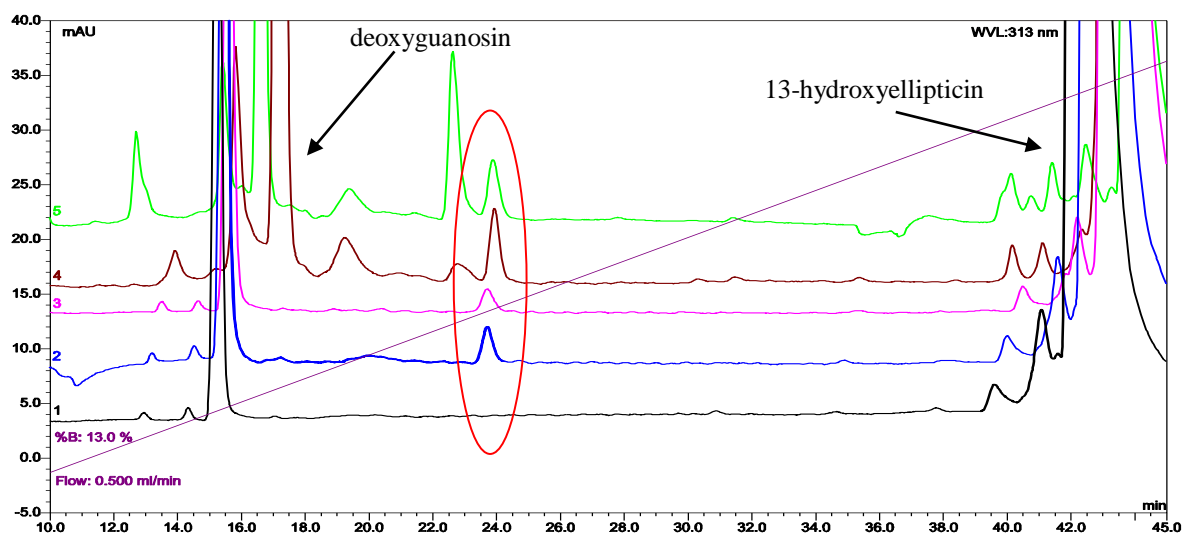
Složení inkubačních směsí: 50 μ M 13-hydroxyellipticin, 50 μ l nasyceného roztoku deoxyguanosinu, fosfátový pufr pH 7.4 a pH 8.4. Separované látky byly detekovány při vlnové délce 313 nm .

Množství vytvářeného aduktu 13-hydroxyellipticinu s DNA výrazně roste v přítomnosti konjugačních enzymů (sulfotransferasy - SULT, N-acetyltransferasy - NAT) a jejich kofaktorů (PAPS pro SULT a acetyl-CoA pro NAT) (**Obrázek 31**). Vzhledem k tomu, že jsou tyto enzymy exprimovány mimo jiné právě v cílových nádorových buňkách léčby ellipticinem např. lidský karcinom prsu, může zvýšená tvorba kovalentních aduktů 13-hydroxyellipticinu s DNA mít i fyziologický význam. Stimulace tvorby aduktu 13-hydroxyellipticinu s DNA derivatizací na sulfát či acetát by proto mohla vést ke zvýšení farmakologické účinnosti ellipticinu.

Tento nárůst byl rovněž pozorován při sledování tvorby aduktu 13-hydroxyellipticinu s deoxyguanosinem pomocí HPLC (**Obrázek 32**). Zvýšení tvorby uvedeného aduktu za tvorby konjugátů se sulfátem a acetátem navíc potvrzují hypotézu o jeho struktuře, jako produktu reakce karbeniového iontu 13-hydroxyellipticinu s deoxyguanosinem. Sulfát a acetát 13-hydroxyellipticinu totiž tvoří zmíněný karbeniový ion mnohem snáze než 13-hydroxyellipticin samotný.



Obrázek 31 Vliv konjugačních enzymů na tvorbu aduktu 13-hydroxyellipticinu DNA. Adukty byly detekovány metodou „³²P-postlabeling“. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření.



Obrázek 32 HPLC aduktu vzniklého inkubací 13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosinu při pH 7.4 v přítomnosti SULT1A1/2 nebo NAT1 a 2 a jejich kofaktorů PAPS a acetyl-CoA

Inkubační směsi 13-hydroxyellipticinu a deoxyguanosinu bez přidavku enzymů, pH 7.4 - **1**, s přidavkem SULT1A1 a PAPS - **2**, s přidavkem SULT1A2 a PAPS - **3**, s přidavkem NAT1 a acetyl-CoA - **4**, s přidavkem NAT2 a acetyl-CoA - **5**; detekováno při 313 nm.

Získané výsledky a také poznatky o tvorbě aduktů ellipticinu s DNA po jeho aktivaci peroxidasami (Stiborová et al., 2007) plně podporují předpoklad, že majoritní adukt je tvořen z reaktivního karbéniového iontu (ellipticin-13-ylia), který je produktem rozpadu 13-hydroxyellipticinu. Jak již bylo uvedeno výše, nejpravděpodobnější reakcí tohoto reaktivního intermediátu je reakce s jedním z nukleofilních center na deoxyguanosinu,

jmenovitě s exocyklickou NH_2 skupinou guaninu v DNA (**Obrázek 10**, str. 30). Tomuto předpokladu odpovídají také výsledky ze studia vlivu pH na tvorbu uvedeného aduktu. Bylo zjištěno, že pokles pH vede ke snížení tvorby aduktu. Nižší pH vede k protonaci NH_2 skupiny guaninu v DNA, což zapříčiňuje snížení jeho nukleofility, která je nezbytná pro vazbu ellipticin-13-ylia na tuto skupinu. Také výsledky dalších experimentů odpovídají tomuto předpokladu. Již dříve zmíněná tvorba derivátů 13-hydroxyellipticinu se sulfátem či acetátem usnadňuje rozpad na ellipticin-13-ylum. Jeho vyšší produkované množství pak vede ke zvýšení tvorby aduktu.

Získané výsledky jsou slibné pro přípravu aduktu v množství, která budou dostatečná pro jeho další charakterizaci pomocí MS a NMR.

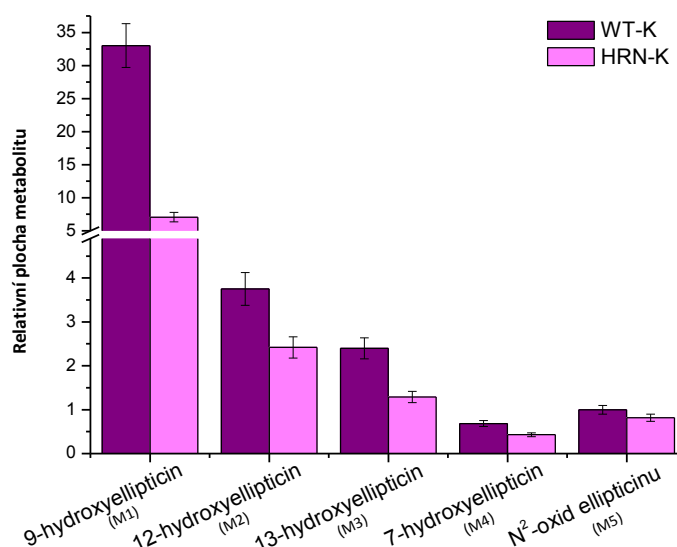
4.4 METABOLISMUS ELLIPTICINU JATERNÍMI MIKROSOMÁLNÍMI SYSTÉMY MYŠÍ *IN VITRO*

V další části předkládané disertační práce jsme se zaměřili na studium metabolismu ellipticinu myším mikrosomálním systémem. Ke sledování přeměn ellipticinu byly použity mikrosomální systémy již dříve zmíněného experimentálního modelu myši (*kap. 4.2.1*) jednak kontrolních (WT-K) a jednak geneticky modifikovaných „knock-out“, u kterých byla v játrech „deletována“ NADPH:CYP reduktasa (HRN-K). Vedle těchto jaterních mikrosomů byly též použity mikrosomy jater obou typů myši premedikovaných induktorem CYP1A, benzo[a]pyrenem WT-BaP a HRN-BaP. Geneticky modifikované „knock-out“ myši byly konstruovány v laboratořích spolupracujících institucí ve Velké Británii (Henderson et al., 2003).

Ellipticin je všemi typy použitých mikrosomů za přítomnosti NADPH-generujícího systému oxidován (*kap. 3.5.1*). Vzniklé metabolity, jmenovitě 9-hydroxy- (M1), 12-hydroxy- (M2), 13-hydroxy- (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N^2 -oxid ellipticinu (M5) (**Obrázek 33**) byly separovány pomocí HPLC (*kap. 3.5.2*). Plochy „píků“ jednotlivých metabolitů byly vztahovány k ploše „píku“ vnitřního standardu fenacetinu.

4.4.1 Oxidace ellipticinu jaterními mikrosomálními systémy myši

Srovnáním oxidace ellipticinu jaterními mikrosomy myši WT-K a HRN-K (**Obrázek 33**) bylo zjištěno, že mikrosomální systém WT-K oxiduje ellipticin efektivněji než mikrosomální systém s deficitem jaterní NADPH:CYP reductasy (HRN-K). Takový výsledek byl očekávaný. Tato efektivita je téměř dvojnásobná (u všech metabolitů). Oba systémy nejvíce tvoří metabolit 9-hydroxyellipticin (M1), v případě mikrosomů myši WT-K je plocha tohoto metabolitu až šestkrát větší než při oxidaci ellipticinu mikrosomy myši HRN-K.

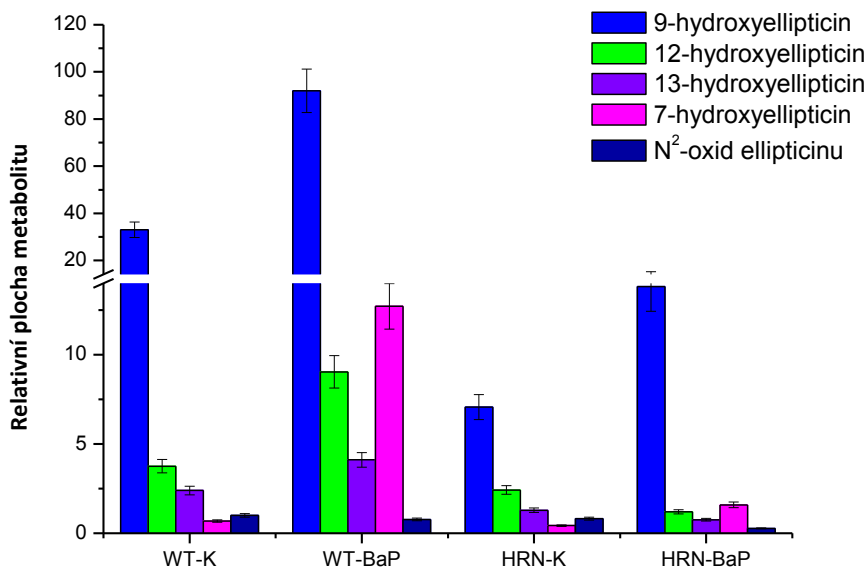


Obrázek 33 Srovnání oxidace ellipticinu (tvorby jednotlivých metabolitů) myšimi jaterními mikrosomy WT-K a HRN-K.

Složení inkubační směsi: 10 μ M ellipticin; 0.2 mg proteinů (mikrosomů); 10 mM $MgCl_2$; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM $NADP^+$; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS); fosfátový pufr pH 7.4. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření.

Srovnáním oxidace ellipticinu mikrosomálními systémy po indukci cytochromů P450 podrodiny 1A, benzo[a]pyrenem, WT-BaP, HRN-BaP a kontrolními mikrosomy (nepremedikovaných zvířat) WT-K, HRN-K (**Obrázek 34**) bylo zjištěno, že za použití mikrosomálních systémů myši premedikovaných BaP dochází k signifikantnímu nárůstu tvorby 9-hydroxyellipticinu (M1) a 7-hydroxyellipticinu (M4). Vzniká až dvojnásobné množství těchto metabolitů, než při použití kontrolních mikrosomálních systémů. Nejvyšší

efektivitu oxidovat ellipticin vykazuje systém WT-BaP, v případě metabolitu M1 se vytváří až jeho trojnásobné množství než v případě WT-K.



Obrázek 34 Oxidace ellipticinu mikrosomálními systémy myši.

Srovnání efektivity mikrosomálních systémů; Složení inkubační směsi: 10 μ M ellipticin;

0.2 mg proteinů (mikrosomů); 10 mM MgCl₂; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1mM NADP⁺;

1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS); fosfátový pufr pH 7.4. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření.

Navzdory tomu, že u myši HRNTM byla v játrech vyřazena NADPH:CYP reduktasa, unikátní donor elektronů pro CYP v MFO systému (Schacter et al., 1972), ellipticin je přesto tímto mikrosomálním systémem mírně oxidován. To je překvapující výsledek. Nedosahuje sice takové efektivity jako mikrosomální systém jater myši kontrolní skupiny, ale přesto jsou vznikající metabolity detekovatelné. Vysvětlení tvorby metabolitů ellipticinu jaterními mikrosomy z modifikovaných zvířat je v současnosti obtížné.

Jedním z vysvětlení může být skutečnost, že velmi nízká exprese NADPH:CYP reduktasy (~1-3% oproti kontrole) u „knock-out“ modelu (Henderson et al., 2003) je stále dostačující pro tvorbu efektivního MFO systému. Tedy komplexu tohoto enzymu (NADPH:CYP reduktasy) a CYP (ev. cytochromu b₅ a jeho reduktasy) v membráně

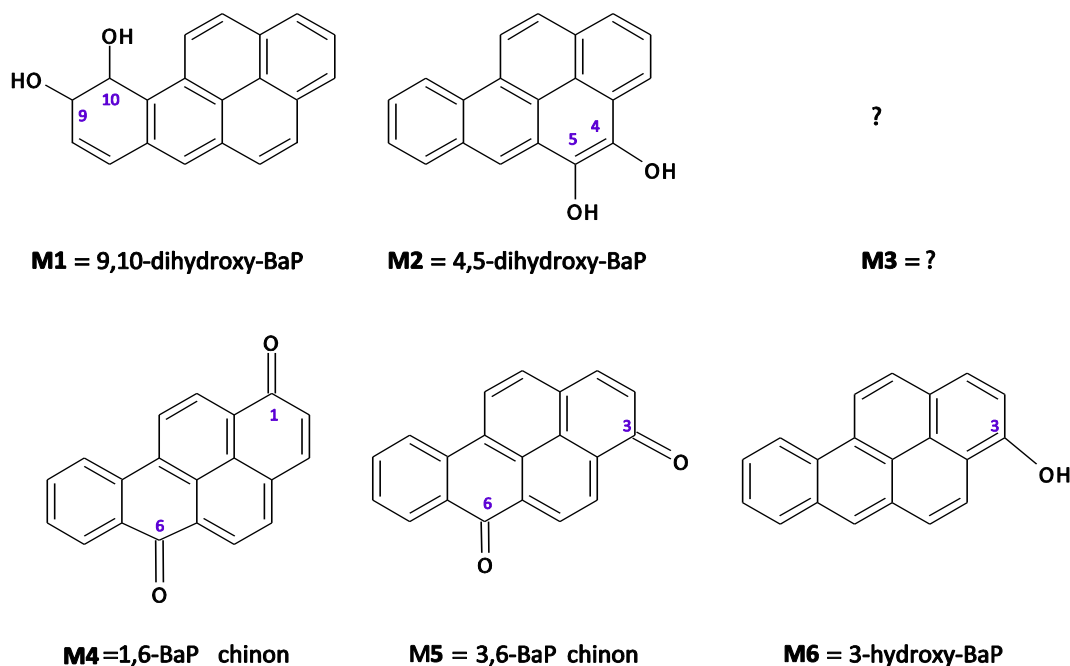
endoplasmatického retikula. To by navíc signalizovalo, že v jaterní tkáni nemodifikovaných zvířat je NADPH:CYP reductasa exprimována ve značném nadbytku, který není zcela nutný pro vlastní efektivitu MFO systému. Otázkou rovněž zůstává, zda není efektivita systému v případě malého množství NADPH:CYP reductasy nahrazena NADH: cytochrom b₅ reductasou, která je funkční až při druhé redukci CYP v reakčním cyklu MFO systému. Prvním krokem k řešení těchto otázek bylo zkoumání exprese jednotlivých proteinů participujících na metabolismu ellipticinu v játrech myšího modelu (viz kap. 4.6).

4.5 METABOLISMUS BENZO[A]PYRENU MIKROSOMÁLNÍM SYSTÉMEM OXYGENAS SE SMÍŠENOU FUNKCÍ

V další části předkládané disertační práce jsme se zabývali studiem metabolismu karcinogenního benzo[a]pyrenu enzymy mikrosomálního MFO systému. BaP je karcinogenem jak pro potkana, jako modelového organismu, tak i pro člověka (IARC 2010). Metabolity BaP (především 7,8,-dihydroxy-9,10-epoxy-BaP) vzniklé účinkem CYP a epoxidhydrolasy jsou schopné kovalentně modifikovat DNA (Phillips, 2005). BaP je CYP1A1 a 1B1 aktivován těmito reakcemi za tvorby 7,8-dihydroxyderivátu, který je v následném kroku přeměněn na 9,10-epoxy-derivát, který je velmi reaktivní a vytváří adukty s DNA (**Obrázek 5**, str. 21)

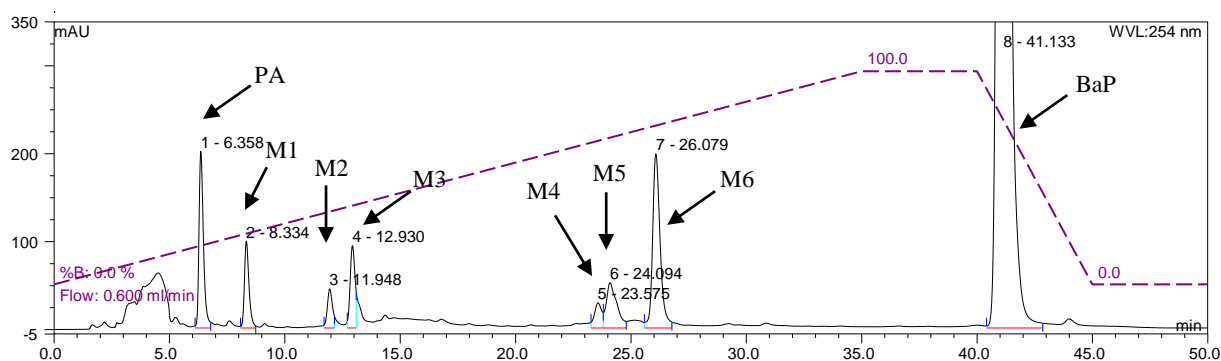
4.5.1 Metabolismus benzo[a]pyrenu

V části disertační práce, zaměřené na studium metabolismu BaP, jsme studovali oxidaci BaP mikrosomálním systémem jater pokana a myši, a dále také purifikovanými enzymy (CYP1A1) v rekonstitovaném systému s dalšími složkami MFO systému. BaP je plnohodnotným mikrosomálním systémem jater metabolizován na šest metabolitů M1-M6 (**Obrázek 35**), tyto metabolity byly strukturně charakterizovány pomocí NMR (viz *kap. 3.6.5*) jako:



Metabolit M3 se nepodařilo charakterizovat.

Vzniklé metabolity BaP byly separovány pomocí nově vyvinuté metody HPLC a detekovány při 254 nm (kap. 3.6.3). Detailní popis optimalizace separace metabolitů BaP pomocí HPLC je popsán v publikaci, která je součástí disertační práce jako příloha č. 5.

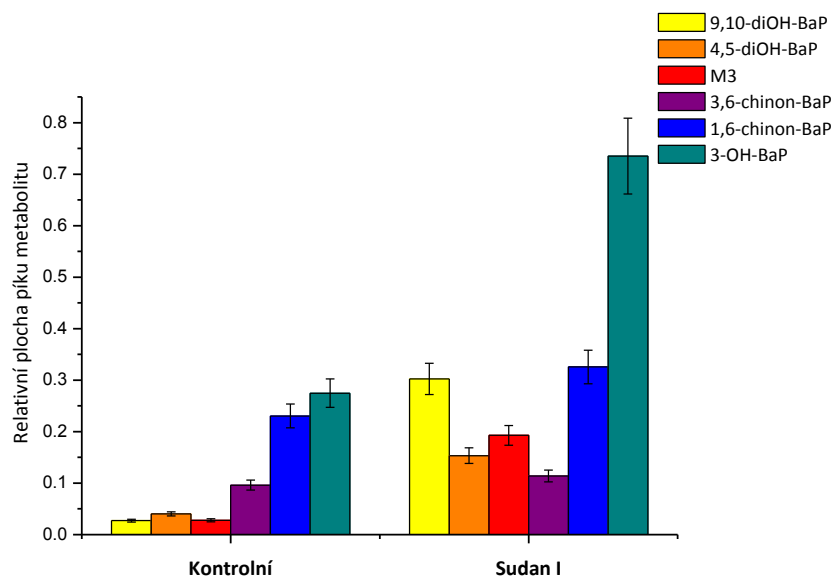


Obrázek 35 Chromatografický profil separace metabolitů BaP vzniklých působením mikrosomálního systému jater potkana premedikovaného Sudanem I. Detekce při 254 nm. PA = fenacetin.

4.5.2 Oxidace benzo[a]pyrenu jaterním mikrosomálním systémem potkana

Při této studii jsme využili mikrosomální systémy potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a premedikovaných Sudanem I. Sudan I je silným induktorem CYP1A1 (Lubet et al., 1983, Martínek & Stiborová, 2002; Stiborová et al., 2002b). CYP1A1 je jedním z nejdůležitějších enzymů metabolizujících BaP *in vitro* (Baird et al., 2005; Luch a Baird 2005).

BaP je jaterním mikrosomálním systémem potkana jak kontrolních zvířat, tak i mikrosomy jater potkanů premedikovaných Sudanem I metabolizován na šest metabolitů, jak již bylo zmíněno výše. Separace byla provedena pomocí HPLC (kap. 3.6.3).

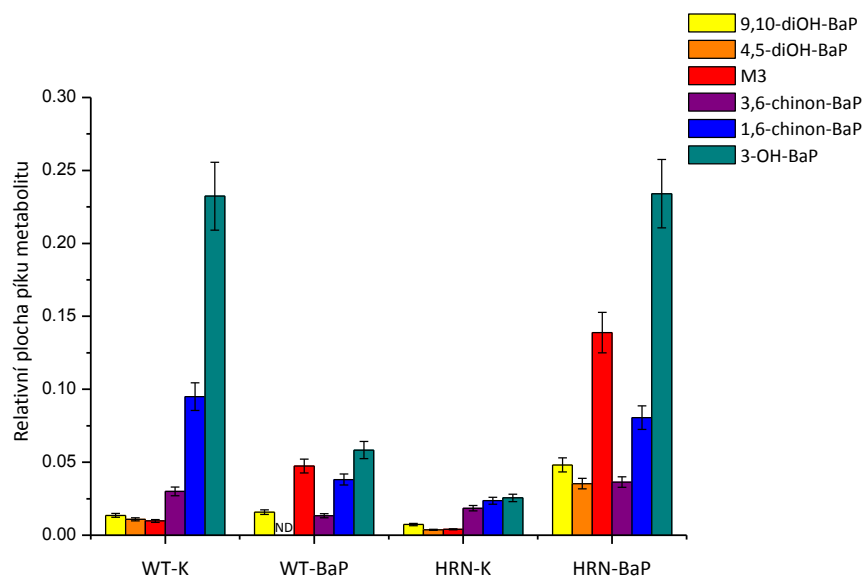


Obrázek 36 *Metabolismus BaP jaterním mikrosomálním systémem potkana nepremedikovaným (Kontrolní) a premedikovaným Sudanem I (Sudan I). Srovnání efektivity těchto mikrosomů. Inkubační směs obsahovala 0.5 mg proteinu, 50 μM BaP. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření*

Mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I jsou v metabolismu BaP účinnější oproti mikrosomům kontrolních potkanů. Při použití mikrosomů potkanů premedikovaných Sudanem I bylo zvýšeno množství všech vytvářených metabolitů, v případě metabolitu M1 (9,10-dihydroxy-BaP) byla jeho tvorba zvýšena až 11krát (**Obrázek 36**). Z těchto výsledků můžeme potvrdit dřívější studie (Baird et al., 2005; Luch a Baird 2005), že CYP1A1 jednoznačně participuje na vzniku všech šesti metabolitů BaP.

4.5.3 Oxidace benzo[a]pyrenu jaterním mikrosomálním systémem myši

V další části studie sledující metabolismus BaP jsme se zaměřili na roli NADPH:CYP reductasy v metabolismu BaP, a to za použití mikrosomálních systémů HRN a WT myši. Byly použity jaterní mikrosomy jak kontrolních (nepremedikovaných) myši (K), tak i myši premedikovaných BaP (BaP). V případě systému myši linie HRN jsme předpokládali sníženou účinnost cytochromů P450 v játrech, z důvodu delece NADPH:CYP reductasy, která je unikátním donorem elektronu právě pro CYP (viz kap. 4.4).



Obrázek 37 Metabolismus BaP jaterním mikrosomálním systémem myší WT a HRN nepremedikovaných (-K) a premedikovaných BaP (-BaP). Srovnání efektivity těchto mikrosomů. Inkubační směs obsahovala 0.5 mg proteinu, 50 μ M BaP.

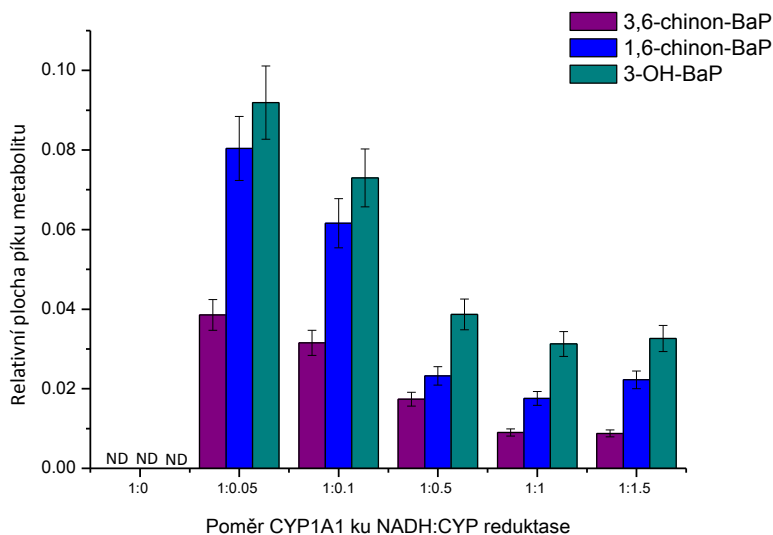
Srovnáním metabolismu BaP jaterními mikrosomy myší WT-K a HRN-K (**Obrázek 37**) bylo zjištěno, že mikrosomální systém myší WT-K oxiduje BaP účinněji než mikrosomální systém s deficitem jaterní NADPH:CYP reductasy (HRN-K). Oba systémy vytvářejí metabolity s podobnou tendencí a majoritně tvoří metabolit 3-hydroxybenzo[a]pyren (M6). V případě mikrosomů myší WT-K je plocha tohoto metabolitu až devětkrát větší než při oxidaci BaP mikrosomy myší HRN-K. Navzdory tomu, že u myší HRNTM byla v játrech vyřazena NADPH:CYP reductasa, unikátní donor elektronů pro CYP v MFO systému (Schacter et al., 1972), BaP je přesto tímto mikrosomálním systémem metabolizován. Tento systém ovšem nedosahuje takové účinnosti jako systém myší z kontrolní skupiny.

Při porovnání účinnosti mikrosomálních systémů myší WT a HRN premedikovaných BaP, je z **Obrázek 37** jasně patrné, že systém HRN-BaP je výrazně účinnější v oxidaci BaP než systém nepremedikovaných HRN myší, tvorba metabolitu M3 vzrostla až 34krát, metabolit M6 je zvýšen 9krát. V účinnosti oxidovat BaP jsou dokonce efektivnější než jaterní mikrosomy myší WT premedikovaných BaP (WT-BaP). To je opravdu překvapující výsledek. Otázkou zůstává, jak je možné, že premedikací HRN myší BaP dochází k takovému nárůstu efektivity metabolizovat BaP a jestli tedy není preferována cesta oxidace BaP při nízké koncentraci NADPH:CYP reductasy, která je v jaterních mikrosomech myší s „deletovanou“ NADPH:CYP reductasou. Je jasné, že použití

mikrosomálního systému nemůže poskytnout odpověď na tuto otázku. Proto jsme využili studie s purifikovanými enzymy (viz další *kap. 4.5.4-4.5.6*).

4.5.4 Metabolismus BaP purifikovaným cytochromem P450 1A1 rekonstituovaným s NADPH: cytochrom P450 reduktasou

V dalším kroku jsme využili purifikovaných enzymů CYP1A1 v rekonstituovaném systému s NADPH:CYP reduktasou v prostředí liposomů (vesikuly simulující strukturu mikrosomů). Jak již bylo zmíněno výše, CYP1A1 participuje na oxidaci BaP vedoucí k tvorbě jeho reaktivních intermediátů, které jsou schopné kovalentně modifikovat DNA (kap 4.7). Pro správnou funkci CYP v MFO systému je potřebná NADPH:CYP reduktasa. V této studii jsme prostudovali vliv koncentrace NADPH:CYP reduktasy na oxidaci BaP CYP1A1. BaP je tímto systémem metabolizován pouze na tři metabolity (M4-M6, 1,6-BaP chinon; 3,6-BaP chinon a 3-hydroxy-BaP) (**Obrázek 38**). NADPH:CYP reduktasa byla rekonstituována v systému s CYP1A1 v poměru CYP:RED 1:0-1:1.5 (1 = 100 pmol CYP).



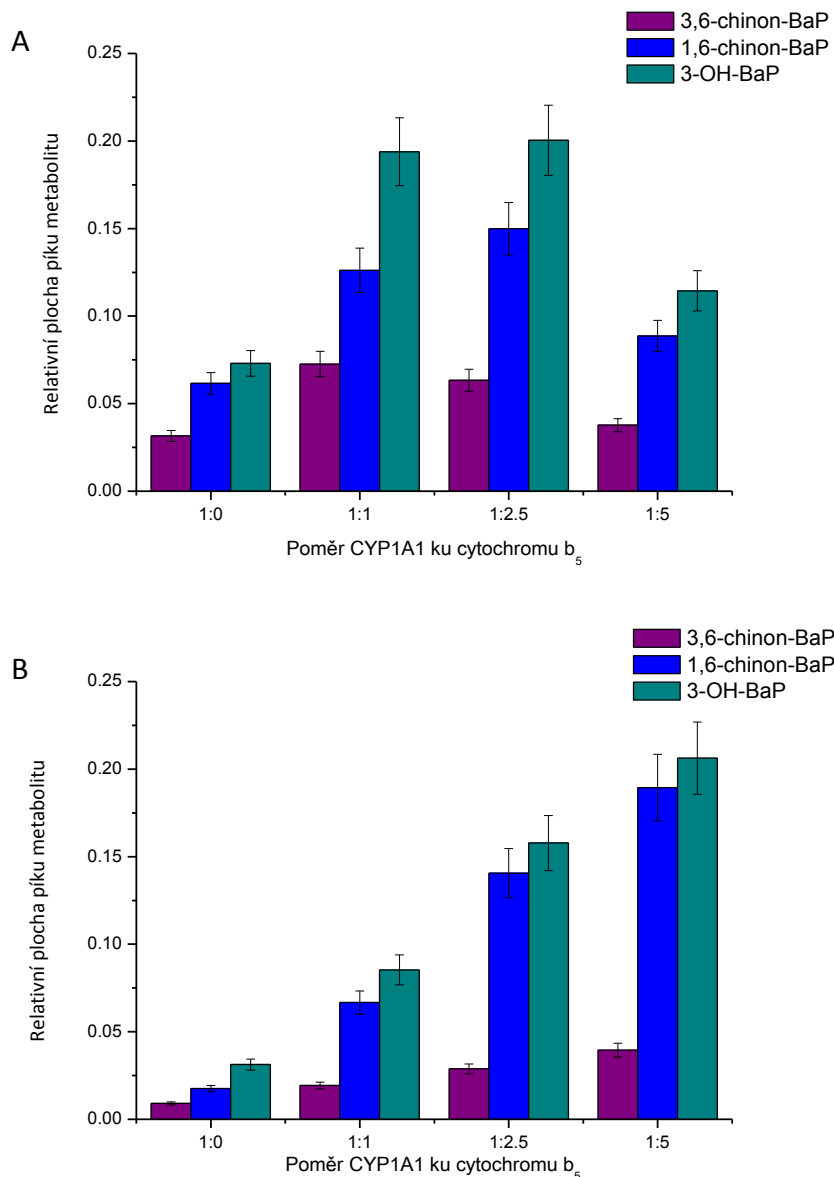
Obrázek 38 Vliv NADPH:CYP reduktasy na metabolismus BaP purifikovaným CYP1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou. Inkubační směs obsahovala 100 pmol CYP1A1 a 10 μ M BaP. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření

Benzo[a]pyren je nejučinněji oxidován na výše zmíněné metabolity systémem s nejnižším obsahem NADPH:CYP reductasy, v systému obsahujícím CYP1A1 ku NADPH:CYP reductase 1:0.05. Tento výsledek odpovídá výsledkům z předchozí části disertační práce (viz *kap 4.5.3*), že při metabolismu BaP je preferována nízká koncentrace NADPH:CYP reductasy v systému s vysokou koncentrací CYP1A1 (**Obrázek 37**, mikrosomy HRN-BaP). Se zvyšující se koncentrací reductasy dochází ke snížení efektivity tvorby metabolitů BaP (**Obrázek 38**).

Jelikož v mikrosomálním systému nejsou přítomné pouze CYP1A1 a NADPH:CYP reductasa, zařadili jsme, v další studii do rekonstituovaného systému též cytochrom b_5 , který je další, fakultativní složkou MFO systému. Jak je uvedeno v předchozích částech disertační práce, cytochromu b_5 při kooperaci s CYP1A1 ovlivňuje metabolismus ellipticinu (*kap. 4.1.1*). Zajímalo nás tedy, jaký vliv bude mít tento protein na oxidaci BaP CYP1A1.

4.5.5 Vliv cytochromu b_5 na oxidaci BaP cytochromem P450 1A1

Jak již bylo řečeno v předchozích částech práce (*kap. 4.1.1 a 4.1.2*). Cytochrom b_5 je malý protein, který je součástí MFO systému. Výsledky studie jeho vlivu na oxidaci BaP purifikovaným CYP1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reductasou v prostředí liposomů jsou presentovány v této kapitole. Zvolili jsme dvě koncentrace reductasy; nízkou, ve které je poměr CYP ku NADPH:CYP reductase 1:0.1 a vysokou, kde je jejich poměr 1:1. I v případě přidavku cytochromu b_5 je BaP metabolizován na tři metabolity (M4-M6,1,6-BaP chinon; 3,6- BaP chinon a 3-hydroxy-BaP) (**Obrázek 38**). Cytochromu b_5 byl rekonstituován v systému s CYP1A1 v poměru CYP:cyt b_5 1:0-1:5 (1 = 100 pmol CYP).



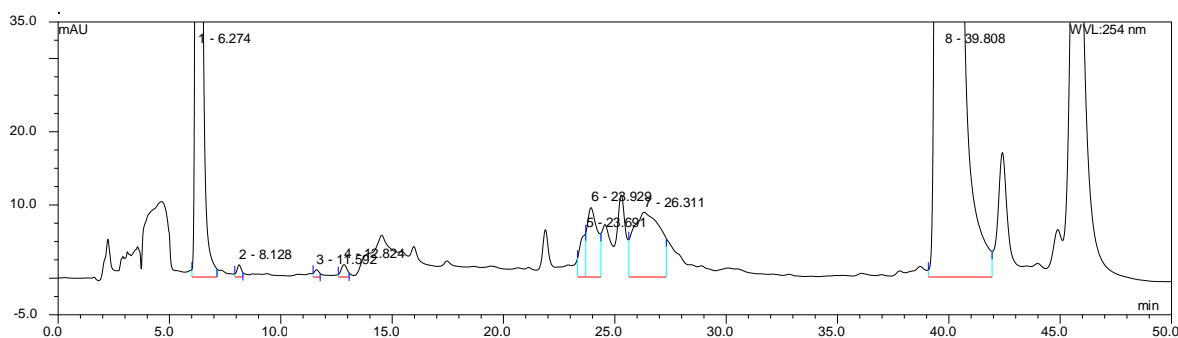
Obrázek 39 Vliv cytochromu b₅ na metabolismus BaP purifikovaným CYP1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou. Inkubační směs obsahovala 100 pmol CYP1A1, 10 μM BaP, 10 pmol RED (A) a 100 pmol RED (B). Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření.

V rekonstituovaném systému CYP1A1 s NADPH:CYP reduktasou docházelo vlivem cytochromu b₅ ke zvýšení účinnosti tvorby metabolitů BaP. S rostoucí koncentrací cytochromu b₅ dochází ke zvýšení hladiny vytvářených metabolitů v systému s oběma množstvími reduktasy (10 i 100 pmol RED, **Obrázek 39**). Nicméně, v systému s nižší koncentrací reduktasy (**Obrázek 39A**) byl metabolismus BaP stimulován pouze do poměru CYP1A1 ku cytochromu b₅ 1:2.5, při vyšší koncentraci již nedocházelo k další výrazné

stimulaci oproti deficitu cytochromu b_5 v systému (CYP: cyb₅ 1:0). Cytochrom b_5 může být též odpovědný za stimulaci tvorby metabolitů při oxidaci BaP jaterním mikrosomálním systémem HRN myši. Osvětlení této „záhadné“ stimulace můžeme dále dosáhnout zjištěním jak BaP ovlivňuje hladiny jednotlivých enzymů zapojených do jeho metabolismu. Proto je taková studie dalším cílem disertační práce. Výsledky jsou presentovány v kapitole 4.6).

4.5.6 Vliv epoxidhydrólasy na oxidaci BaP cytochromem P450 1A1

Epoxidhydrólasa (EH) je klíčovým enzymem pro vznik reaktivního intermediátu BaP; 7,8-dihydroxy-9,10-epoxidu BaP ze 7,8-diolu vytvořeného účinkem cytochromů P450. Není sice složkou MFO systému, ale je enzymem lokalizovaným v membráně endoplasmatického retikula, a tedy i v mikrosomech. Je tudíž nutné prostudovat jaký poměr EH ku CYP1A1 v rekonstituovaném systému bude nejvhodnější pro zvýšení účinnosti metabolismu BaP tímto systémem. Pro takové studie jsme opět využili dvě koncentrace RED (viz kap 4.7.2).



Obrázek 40 Separace metabolitů BaP vzniklých účinkem rekonstituovaného systému CYP1A1, NADPH:CYP reduktasy a EH pomocí HPLC. Inkubační směs obsahovala 100 pmol CYP1A1; 10 pmol RED; 100 pmol EH.

Výsledky z těchto experimentů však nemohly být interpretovány, jelikož se nepodařilo separovat jednotlivé metabolity BaP. Potenciálním důvodem tohoto neúspěchu může být vazba epoxidhydrólasy na některé metabolity, čímž se mění jejich chromatografické vlastnosti (**Obrázek 40**).

4.6 EXPRESE ENZYMŮ ZAPOJENÝCH DO METABOLISMU ELLIPTICINU A BENZO[A]PYRENU V JATERNÍCH MIKROSOMECH MYŠÍ WT A HRN

V této části práce jsme se zabývali určením exprese jednotlivých mikrosomálních enzymů participujících na oxidaci jak ellipticinu, tak i BaP. Jak již bylo řečeno v předchozí kapitole, exprese těchto enzymů by mohla být zvýšena účinkem premedikace BaP, což by mohlo ovlivnit tvorbu aktivačních metabolitů a z toho plynoucí tvorbu aduktů s DNA. Navíc byly studovány i cytosolární enzymy jako např. NQO1. Vzhledem k tomu, že tento enzym neparticipuje na oxidaci BaP, výsledky nejsou v disertační práci presentovány. Jsou uvedeny pouze v publikaci, která je součástí disertační práce jako *příloha. 7.*

4.6.1 Imunostanovení cytochromů P450 podrodiny 1A v myších mikrosomech

Benzo[a]pyren patří do skupiny polycyklických aromatických uhlovodíků, které indukují enzymy, které participují na metabolismu xenobiotik, jako je např. CYP1A1. Působí především přes Ah receptor (Kouri et al., 1973). Můžeme tedy předpokládat, že v mikrosomech myší premedikovaných BaP dochází k „nabohacení“ těchto enzymů v jaterní tkáni, a to jak u myší WT, tak i u „knock-out“ linie HRN. BaP je též CYP1A1 metabolizován, a proto je možné předpokládat, že tímto způsobem BaP zvyšuje svou metabolickou aktivaci (viz *kap. 3.4.2*), stejný způsob modulace vlastního metabolismu můžeme přiřadit i ellipticinu (Aimová et al., 2007) (*příloha č. 4*).

Míra exprese CYP1A1/2 byla stanovena metodou Western blot (*kap. 3.4.2*). Primární protilátkou byla slepičí anti-CYP1A1/2 a jako sekundární byla použita králičí anti-slepičí protilátka s navázanou alkalickou fosfatase (Sigma). Tento komplex byl vizualizován tabletou (Sigma FastTM) obsahující substrát alkalické fosfatasy.



Obrázek 41 Immunostanovení CYP1A1/2 v játrech myši nepremedikovaných, kontrolních (WT), nepremedikovaných s deletovanou NADPH:CYP reduktasou v játrech (HRN) a premedikovaných BaP (125 mg/kg) (WT-BaP; HRN-BaP).

Z **Obrázek 41** je patrné, že působením BaP dochází k velkému nárůstu exprese CYP1A1 i 1A2 především v jaterních mikrosomech myši premedikovaných BaP. To také bylo předpokládáno. Zaznamenali jsme též mírný nárůst exprese CYP1A1/2 u myši linie HRN oproti WT (**Obrázek 41**).

4.6.2 Imunostanovení cytochromu b₅ v myších jaterních mikrosomech

Dalším testovaným enzymem, u kterého jsme sledovali expresi v jaterních mikrosomech, byl cytochrom b₅. Sledovali jsme vliv premedikace zvířat BaP na hladinu tohoto proteinu. Jelikož je BaP schopen indukce CYP1A1, zajímalo nás, jestli má stejný vliv i na cytochrom b₅.



Obrázek 42 Immunostanovení cytochromu b₅ v játrech myši nepremedikovaných kontrolních (WT), nepremedikovaných s deletovanou NADP:CYP reduktasou v játrech (HRN) myši obou linií premedikovaných BaP (125 mg/kg) (WT-BaP; HRN-BaP).

Míra exprese proteinu cytochromu b₅ byla stanovena metodou Western blot viz *kap. 3.4.2*,. Primární protilátkou byla králičí anti-cyt b₅ (AbCAM) a jako sekundární protilátka byla použita kozí anti-králičí protilátka s navázanou alkalickou fosfatasou (Sigma). Tento komplex byl zviditelněn tabletou (Sigma FastTM) obsahující substrát alkalické fosfatasy. Z **Obrázek 42** je patrné, že vlivem premedikace BaP dochází i k nabožení cytochromu b₅

v jaterním mikrosomálním systému obou myších linií. U myší HRN jsme zaznamenali vyšší expresi tohoto proteinu oproti expresi v myších WT. Tento fakt může být způsoben delecí NADPH:CYP reduktasy. Je možné, že se v tomto případě kompenzuje absence NADPH:CYP reduktasy, a to participací cyt b₅ (a jeho reduktasy NADH:cyt b₅ reduktasy) jako donoru elektronu pro CYP místo NADPH:CYP reduktasy.

4.6.3 Imunostanovení epoxidhydrolasy v myších jaterních mikrosomech

Epoxid hydrolasa je dalším klíčovým enzymem metabolizujícím BaP za tvorby aduktů s DNA. Především aduktu dG-N²-BPDE (**Obrázek 5**, str. 21, *kap. 1.1.5.1*). Nejedná se sice o složku MFO systému, ale je součástí enzymové výbavy endoplasmatického retikula jaterní tkáně, ze které byly izolovány mikrosomální frakce myších modelů HRN a WT, kontrolních (nepremedikovaných), tak i premedikovaných BaP.

Míra exprese byla stanovena metodou Western blot (viz *kap. 3.4.2*), primární protilátkou byla králičí anti-EH (AbCAM) a jako sekundární protilátka byla použita kozí anti-králičí protilátka s navázanou alkalickou fosfátasou (Sigma). Tento komplex byl zviditelněn tabletou (Sigma FastTM) obsahující substrát alkalické fosfatasy.



Obrázek 43 *Imunostanovení epoxidhydrolasy v játrech myší nepremedikovaných, kontrolních (WT), nepremedikovaných s deletovanou NADPH:CYP reduktasou v játrech (HRN) a premedikovaných BaP (125 mg/kg) (WT-BaP; HRN-BaP).*

Slabé zvýšení exprese EH bylo zjištěno v mikrosomálních systémech myší premedikovaných BaP oproti nepremedikovaným. U myší HRN docházelo též k vyšší expresi EH v porovnání s myší linií WT, a to jak v případě premedikovaných BaP, tak i nepremedikovaných (**Obrázek 43**). Vyšší hladina tohoto enzymu může vysvětlit vyšší

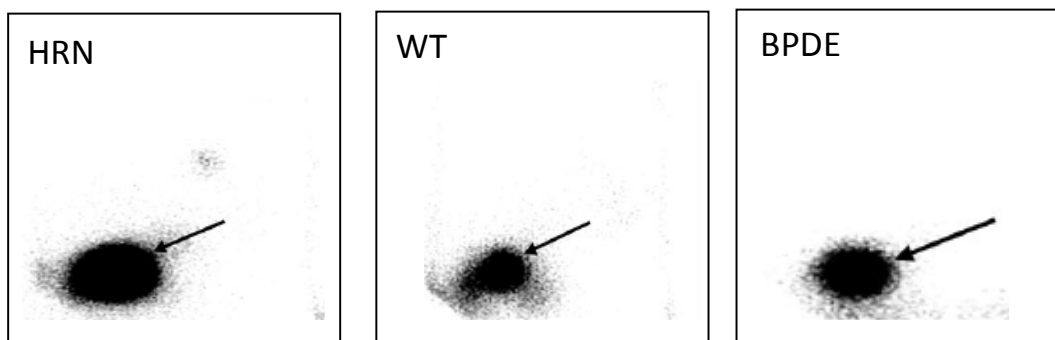
množství vytvářeného aduktu BPDE s DNA, jelikož může docházet k vyšší tvorbě reaktivního intermediátu BPDE právě účinkem EH v kombinaci s CYP1A1.

4.7 AKTIVACE BENZO[A]PYRENU ZA TVORBY ADUKTŮ BENZO[A]PYRENU S DNA

V poslední části předkládané disertační práce jsme studovali vznik aduktů benzo[a]pyrenu s DNA. V experimentech jsme používali mikrosomální systémy izolované z jater myši, využito bylo i purifikovaných enzymů. BaP je po své metabolické aktivaci CYP, buď sám, nebo ve spolupráci s EH schopen kovalentně modifikovat DNA. Stejně jako v předchozí kapitole jsme se zaměřili na vliv jednotlivých složek mikrosomálního MFO systému, a také na vliv poměru těchto složek vůči sobě navzájem. Vzniklé adukty s DNA byly analyzovány metodou ^{32}P -postlabeling (viz *kap. 3.7*).

4.7.1 Aktivace benzo[a]pyrenu mikrosomálním systémem jater myši *in vivo* a *in vitro*

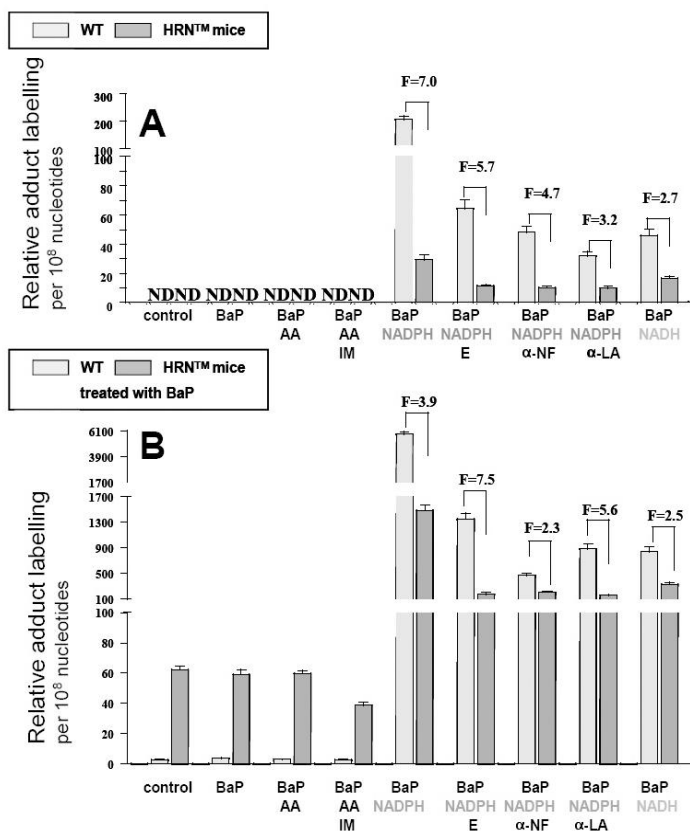
V další části studie sledující metabolický osud BaP v organismu jsme se zaměřili na roli NADPH:CYP reduktasy v aktivaci BaP na reaktivní intermediáty schopné tvořit adukty s DNA. Pro tento účel jsme využili myši linie HRN s deletovanou NADPH:CYP reduktasou a myši linie WT jak kontrolních zvířat, tak i premedikovaných BaP jednou nebo pěti dávkami (125 mg/kg tělesné váhy) (viz *kap. 3.2.1*). V *in vivo* experimentech byly využity jednotlivé orgány, jako jsou játra, ledviny, plíce, žaludek, močový měchýř, slezina a střeva těchto zvířat (Arlt et al., 2008, *příloha č. 4*).



Obrázek 44 Autoradiografie aduktů BaP s DNA vzniklých v jaterní tkáni HRN (A) a WT (B) myši premedikovaných BaP 5krát 125 mg/kg tělesné hmotnosti *in vivo*. Adukt vzniklý modifikací DNA působením BPDE *in vitro* byl použit jako pasivní kontrola (C).

Ke zvýšení tvorby aduktu BaP s DNA dochází v případě použití jaterní tkáně myši HRN (**Obrázek 44**) (Arlt et al., 2008). I přesto, že je v těchto myších liniích „deletována“ NADPH:CYP reductasa, dochází zde k vyšší tvorbě aduktu s DNA oproti myším WT. Za „záhadnou“ tvorbu aduktu s DNA tedy mohou být zodpovědné jiné enzymy, než jsou CYP, nezávislé na NADPH:CYP reductase. Toto je pozoruhodný výsledek, který jsme se pokusili v našich studiích vysvětlit.

Pro porozumění, které enzymy jsou zapojeny do aktivace BaP v myších mikrosomálních systémech HRN v porovnání se systémy myši WT, a také, jak premedikace BaP ovlivňuje jednotlivé enzymy, byla provedena inhibiční studie *in vitro*. V experimentech byly použity inhibitory a kofaktory pro CYP1A, jako jsou α -NF a NADPH, pro COX indomethacin a kyselina arachidonová, pro NADPH:CYP reductasu kyselina lipová a NADPH a nakonec byl použit i kofaktor NADH pro NADH: cytochrom b_5 reductasu.



Obrázek 45 Tvorba aduktů s DNA vznikajících aktivací BaP mikrosomy izolovanými z jater myši HRN a WT kontrolních (nepremedikovaných) (A) a premedikovaných BaP (i.p. 5 dávek 125 mg/kg tělesné hmotnosti) (B) (převzato z Arlt et al., 2008). Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření. RAL, relativní značení aduktů; AA, arachidonová kyselina; E, ellipticin; IM, indomethacin; α-LA, α -lipoová kyselina; α-NF, α-naftoflavon; ND, nedetekováno.

Použitím selektivních inhibitorů a kofaktorů enzymů zapojených do aktivace BaP jsme zjistili, že v přítomnosti kofaktorů NADH i NADPH dochází ke stimulaci tvorby aduktů s DNA. Obecně můžeme říci, že premedikace BaP vede ke zvýšení tvorby aduktů s DNA v porovnání s nepremedikovanými systémy. Kofaktor NADPH stimuluje vznik aduktů s DNA u všech použitých systémů, WT-K jsou 7krát účinnější než HRN-K. Po přidavku NADH, kofaktoru NADH: cytochrom b₅ reductasy, donoru druhého elektronu pro systémy závislé na CYP (Schenkman a Jansson, 1999), nedocházelo k výrazné stimulaci tvorby aduktů s DNA jako v případě NADPH, přesto je stimulována tvorba při použití WT-K, a to 2.7krát oproti HRN-K. Inhibiční studie potvrdila zapojení CYP do aktivace BaP jaterními mikrosomálními systémy. Použití α -lipoové kyseliny, selektivního inhibitoru NADPH:CYP reductasy (Arlt et al., 2003), snižuje hladinu aduktů s DNA až o

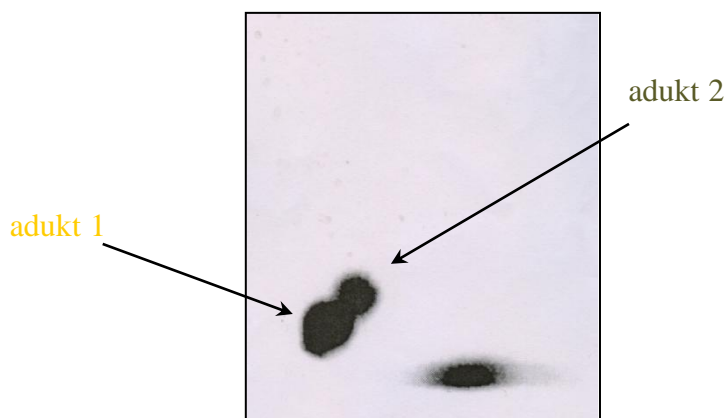
90 % v mikrosomálním systému myši WT-K (**Obrázek 45**). V dalších experimentech bylo použito α -naftoflavonu, inhibitoru CYP1A1 a 1A2 (Arlt et al., 2004; Stiborová et al., 2003b), ellipticinu, který jako substrát CYP1A1 kompetuje s BaP a působí jako inhibitor CYP1A1 vůči tomuto substrátu (BaP) (Stiborová et al., 2003b, 2004a). Obě sloučeniny způsobily pokles hladiny vytvářeného aduktu s DNA až o 90 % (**Obrázek 45**), z tohoto výsledku můžeme dedukovat, že enzymem, který je nejvíce zapojený do aktivace BaP je právě CYP1A1.

Pro testování cesty aktivace BaP nezávislé na CYP, byla použita arachidonová kyselina, kofaktor COX (Arlt et al., 2006, Stiborová et al., 2005a), jejíž přítomnost neměla žádný výrazný účinek na stimulaci tvorby aduktu s DNA. Naproti tomu, při použití indomethacinu, selektivnímu inhibitoru COX (Stiborová et al., 2005a), docházelo ke snížení hladiny aduktu s DNA až o 40 % (**Obrázek 45**).

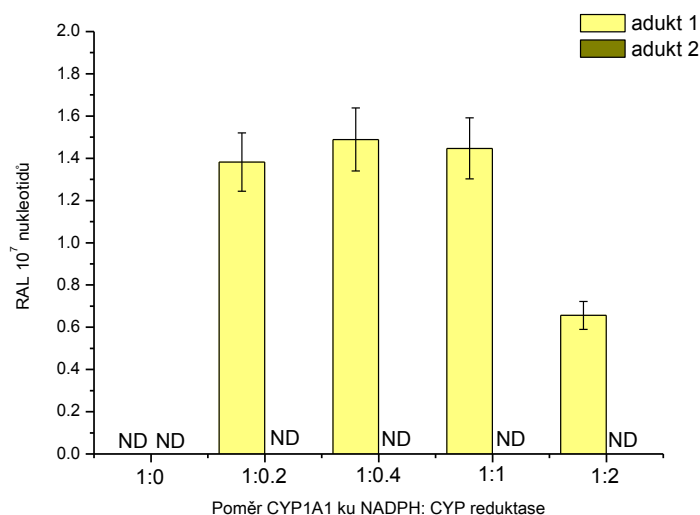
Získané výsledky jasně ukazují, že tvorba aduktu BaP s DNA je silně závislá na katalytické aktivitě NADPH:CYP reductasy. „Záhadná“ aktivita mikrosomálního systému myši HRN má pravděpodobně stejné vyvětlení jako v případě metabolismu ellipticinu viz *kap. 4.4*.

4.7.2 Vliv NADPH: cytochrom P450 reductasy a cytochromu b₅ na aktivaci benzo[a]pyrenu cytochromem P450 1A1 *in vitro*

Pro zjištění, jaký poměr jednotlivých složek MFO systému je preferován pro aktivaci BaP byla provedena studie *in vitro*, s purifikovanými enzymy. Byly použity purifikované enzymy CYP1A1, NADPH:CYP reductasa, epoxidhydrólasy a cytochrom b₅ v prostředí arteficiální membrány (liposomy). Jak již bylo řečeno výše, CYP1A1 je jedním z nejdůležitějších enzymů metabolizujících BaP na metabolity schopné kovalentně modifikovat DNA. Obecně jsou cytochromy P450 závislé na dodání elektronu od NADPH:CYP reductasy, proto jsme se v první fázi zaměřili na zjištění ideálního poměru CYP1A1 a NADPH:CYP reductasy v aktivaci BaP. NADPH:CYP reductasa byla rekonstituována v systému s CYP1A1 v poměru CYP:RED 1:0-1:2 (1 = 100 pmol CYP). CYP1A1 rekonstituovaný s NADPH:CYP reductasou tvoří jediný adukt, adukt 1 (**Obrázek 46**).



Obrázek 46 Autoradiografie aduktů BaP s DNA vzniklých jeho aktivací v myších jaterních mikrosomech.

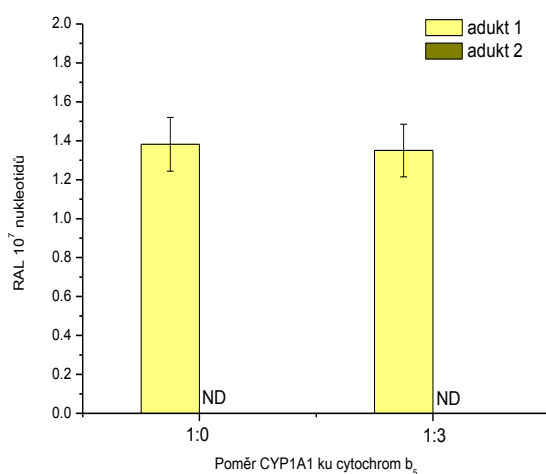


Obrázek 47 Tvorba aduktu 1 vznikajícího aktivací BaP CYP1A1 rekonstituovaného s NADPH:CYP reduktasou v DNA. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření.

Z **Obrázek 47** je patrné, že k nejučinnější aktivaci BaP za tvorby aduktu 1 v DNA dochází při použití poměru CYP1A1 ku RED 1:0.4 až 1:1. Zvýšení koncentrace reduktasy v systému (poměr CYP1A1:RED 1:2), dochází k poklesu tvorby tohoto aduktu (**Obrázek 47**). Tento výsledek koreluje s výsledky získané z *kap. 4.5.4*, kde též dochází k nejvyšší aktivitě CYP1A1 v metabolismu BaP již při nízkých koncentracích NADPH:CYP reduktasy. V rekonstituovaném systému obsahujícím pouze CYP1A1 a NADPH:CYP reduktasu dochází k tvorbě pouze aduktu 1 (

Obrázek 46, který je tvořen z 9-hydroxy-4,5-epoxidu BaP (Fang et al.,2001). Tvorba aduktu 2, který je vytvářen ze 7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-BaP) nebyla detekována.

Cytochrom b_5 tvorbu aduktu 1 BaP s DNA neovlivňuje. Z **Obrázek 48** je patrné, že cytochrom b_5 nemá téměř žádný vliv na hladinu aduktu 1 v DNA, a to ani při jedné z použitých koncentrací NADPH:CYP reductasy. Ani v přítomnosti cytochromu b_5 nedochází k tvorbě aduktu 2, který vzniká z BPDE (7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-BaP).



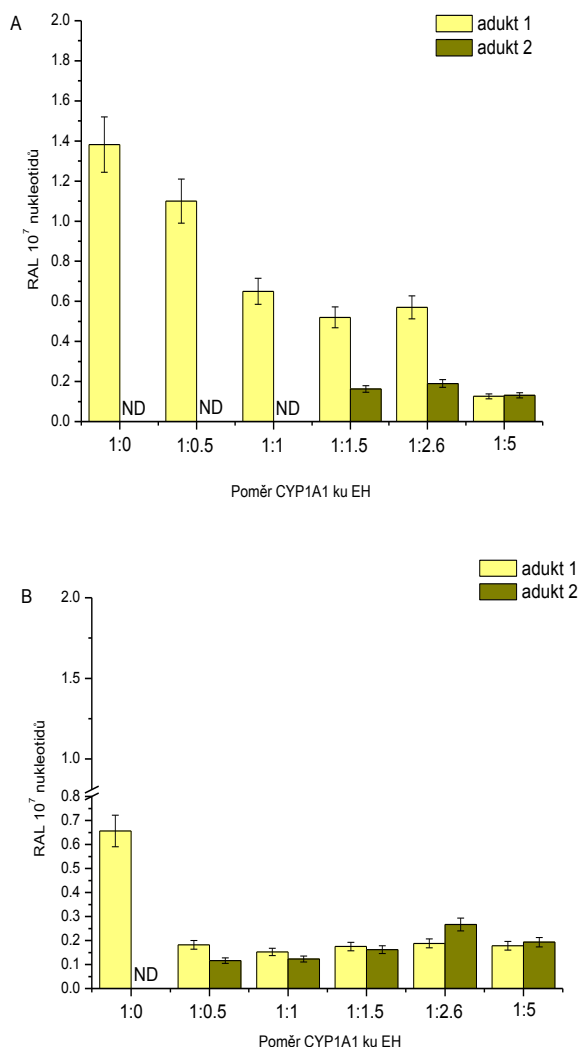
Obrázek 48 Tvorba aduktů s DNA vznikajících aktivací BaP CYP1A1 rekonstituovaného s NADPH:CYP reductasou a cytochromem b_5 ; poměr CYP1A1:RED 1:0.2.

V dalším výzkumu jsme pokračovali s experimentem, ve kterém jsme studovali vliv epoxidhydrolasy na tvorbu aduktů BaP s DNA, jelikož tvorba aduktu 2 je závislá na hydrolýze 7,8-epoxy-BaP epoxidhydrolasou (**Obrázek 5**, str. 21) (kap. 4.7.3).

4.7.3 Vliv epoxidhydrolasy na aktivaci benzo[a]pyrenu *in vitro*

V dalších experimentech jsme do rekonstituovaného systému CYP1A1 s NADPH:CYP reductasou přidali epoxidhydrolasu, která je odpovědná za tvorbu 7,8-diolu BaP, který je dále CYP1A1 oxidován na BPDE. Není součástí MFO systému, ale je důležitou složkou mikrosomálního systému metabolizujícího xenobiotika. V těchto experimentech jsme použili dvě koncentrace NADPH:CYP reductasy a to v poměru CYP1A1:RED 1:0.2

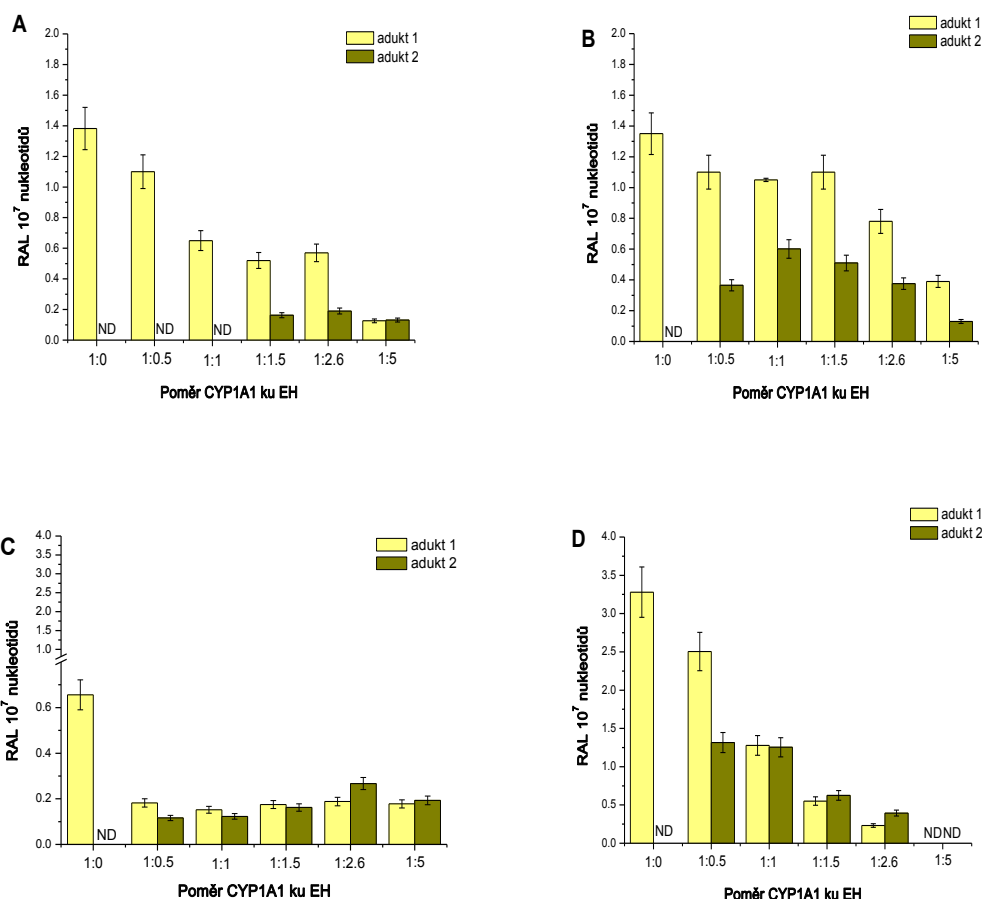
a 1:2. Epoxidhydrolasa byla rekonstituována v systému s CYP1A1 v poměru CYP:EH 1:0-1:5 (1 = 100 pmol CYP).



Obrázek 49 Tvorba aduktů s DNA vznikajících aktivací BaP CYP1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou v poměru 1:0.2 (A) a 1:2 (B) a za přítomnosti epoxidhydrolasy. Hodnoty jsou průměrem ze tří nezávislých měření.

Přítomnost epoxidhydrolasy, při použití vyššího množství NADPH:CYP reduktasy (100 pmol), snižuje tvorbu aduktu 1 a stimuluje tvorbu aduktu 2 již při nízkých koncentracích tohoto enzymu (EH) (**Obrázek 49**). Při nižší koncentraci NADPH:CYP reduktasy (20 pmol) dochází ke snížení tvorby aduktu 1, ke stimulaci tvorby aduktu 2 však dochází až přidávkem EH v množství 150 pmol (**Obrázek 49A**). Přidávek EH nemění trend, kdy je aktivace BaP nejúčinnější při nízkých koncentracích RED

v rekonstituovaném systému, ale zcela mění zastoupení obou aduktů. Z **Obrázek 49B** je jasně zřetelná změna preference tvorby jednotlivých aduktů, v přítomnosti pouze CYP1A1 a NADPH:CYP reductasy je preferovaná tvorba aduktu 1, zatímco přidavek epoxidhydrolasy dramaticky mění tuto preferenci ve prospěch aduktu 2. Tyto výsledky jasně potvrzují skutečnost, že epoxidhydrolasa je klíčovým enzymem pro vznik aduktu 2. V předchozích kapitolách jsme potvrdili participaci cytochromu b_5 na metabolismus benzo[a]pyrenu, kde stimuloval tvorbu metabolitů, a tudíž ještě zbývá prostudovat jeho vliv na aktivaci BaP CYP1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou a epoxidhydrolasou. V experimentech bylo použito 150 pmol cytochromu b_5 a dvě množství NADPH:CYP reduktasy 10 pmol a 100 pmol. Epoxidhydrolasa byla rekonstituována v systému s CYP1A1 v poměru CYP: EH 1:0-1:5 (1 = 100 pmol CYP) (**Obrázek 50**).



Obrázek 50 Vliv cytochromu b_5 na tvorbu aduktů s DNA vznikající aktivací BaP CYP1A1 rekonstituovaného s NADPH:CYP reduktasou v poměru 1:0.2 (A, B) a 1:2 a za přítomnosti epoxidhydrolasy (C, D). Cytochrom b_5 byl přítomen v inkubacích, jejichž výsledky jsou uvedeny v panelech B a D.

V případě, kdy bylo použito množství NADPH:CYP reductasy 20 pmol (**Obrázek 50A,B**), je tvorba aduktu 2, který je vytvářen epoxidhydrolasou, podpořena přítomností cytochromu b₅ v systému, a to již v nízkých koncentracích EH. Cytochrom b₅ udržuje za současného působení epoxidhydrolasy i tvorbu aduktu 1 (**Obrázek 50B**). Pokles jeho tvorby je působením EH daleko nižší v přítomnosti cyt b₅ než bez tohoto proteinu (**Obrázek 50**).

Nejvyšší účinnost v aktivaci BaP CYP1A1 s cyt b₅ (1:3) a EH bylo dosaženo při koncentraci EH v poměru s CYP1A1 1:1. V druhém případě, při použití 200 pmol RED dochází vlivem cytochromu b₅ ke stimulaci tvorby obou aduktů s DNA. I v deficitu EH cytochrom b₅ zvyšuje tvorbu aduktu 1 až 6krát oproti systému bez cyt b₅. Při poměru EH:CYP1A1 1:1 dochází k vyrovnání množství tvořených aduktů 1 a 2. Zvyšující se koncentrace EH stimuluje tvorbu aduktu 2.

5 SOUHRN A ZÁVĚR

Předkládaná disertační práce přispívá k rozšíření znalostí v oblasti farmakologických účinků protinádorového léčiva ellipticinu a jeho mechanismu působení. Přispívá též k poznání funkce cytochromů P450 a dalších složek systému oxidas (oxygenas) se smíšenou funkcí (MFO) v oxidaci studovaného léčiva a stejně tak i studovaného kancerogenu benzo[a]pyrenu. Rozvíjí tak i obecné biochemické poznatky.

Nejdůležitější poznatky zjištěné v disertační práci lze shrnout následovně:

Cytochrom b₅ moduluje oxidaci ellipticinu cytochromy P450 1A1/2

Vlivem cytochromu b₅ dochází ke změně v podílu tvorby jednotlivých metabolitů ellipticinu, tvořených cytochromy P450 1A1 a 1A2, a to ve prospěch aktivačních metabolitů, které vytváří adukty v DNA. Stimulována je tvorba jak 12-hydroxy-, tak i 13-hydroxyellipticinu. Naopak tvorba detoxikačních metabolitů ellipticinu (9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticin) je snížena.

Cytochrom b₅ stimuluje aktivaci ellipticinu CYP3A4

Cytochrom b₅ ovlivňuje oxidaci ellipticinu CYP3A4 cestou stimulace tvorby jednotlivých metabolitů, zejména pak za tvorby 13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticinu, tvorba detoxikačního 7-hydroxyellipticinu je snížena. Tyto výsledky (zvýšená tvorba aktivačních metabolitů ellipticinu) koreluje s nárůstem tvorby aduktů DNA s ellipticinem. Zejména pak s nárůstem tvorby majoritního aduktu 1, který je generován ze 13-hydroxyellipticinu.

Ellipticin moduluje své farmakologické a genotoxické účinky indukci CYP1A1/2

Premedikací samců a samic laboratorního potkana ellipticinem dochází k signifikantnímu zvýšení exprese i katalytické aktivity CYP1A1 a 1A2, a to jak v játrech, tak extrahepatálních orgánech. V játrech navíc dochází vlivem ellipticinu i ke zvýšení exprese cytochromu b₅. Vlivem indukce zároveň dochází v průběhu oxidace ellipticinu jaterními mikrosomy indukovaných zvířat ke zvýšení tvorby aduktů v DNA, která koreluje s nárůstem aktivačních metabolitů, zodpovědných za jejich tvorbu. Premedikací potkanů ellipticinem dochází ke změně podílu jednotlivých CYP ve zkoumaných orgánech. CYP3A

již není hlavním enzymem aktivujícím ellipticin, ale tuto roli zaujímá CYP1A1/2. V ledvinách a plicích dochází účinkem CYP1A1 především k detoxikaci ellipticinu.

Oxidace ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem myší HRN a WT

Ellipticin je myším mikrosomálním systémem oxidován na pět metabolitů, totožných s metabolity tvořenými mikrosomy potkana. Efektivita mikrosomů myší HRN je nižší než u myší WT, ale přesto měřitelnou. Premedikace myší induktorem CYP1A1/2, BaP, zvyšuje účinnost mikrosomů v tvorbě detoxikačních metabolitů (7-hydroxy a 9-hydroxyellipticinu).

V práci byla vyvinuta originální metoda HPLC separace aduktu tvořeného 13-hydroxyellipticinem s deoxyguanosinem v DNA

Množství vznikajícího aduktu bylo však příliš malé na to, aby mohla být určena jeho struktura. Jeho struktura však již byla dříve navržena jako aduktu ellipticin-13-ylia tvořeného z metabolitu ellipticinu, 13-hydroxyellipticinu, s exocyklickou aminoskupinou guaninu. Výsledky experimentů se vzrůstající hodnotou pH inkubační směsi a derivatizací (konjugací) 13-hydroxyellipticinu se sulfátem či acetátem, které vedly ke zvýšení tvorby tohoto aduktu, předpokládanou strukturu plně podpořily.

Oxidace benzo[a]pyrenu jaterním mikrosomálním systémem potkana

Benzo[a]pyren je oxidován mikrosomálním systémem potkana na 6 metabolitů (M1-M6) (9,10-dihydroxy-BaP; 4,5-dihydroxy-BaP; M3 = ?; 1,6-BaP chinon; 3,6-BaP chinon; 3-hydroxy-BaP). Mikrosomální systém potkanů premedikovaných induktorem CYP1A/2, Sudanem I, oxiduje BaP s vyšší efektivitou než mikrosomy kontrolních potkanů. Zjištěné výsledky potvrzují, že CYP1A1 participuje na oxidaci BaP. Pro separaci metabolitů BaP vznikajících účinkem mikrosomálních systémů a purifikovaných enzymů byla vyvinuta nová metoda.

Oxidace benzo[a]pyrenu jaterním mikrosomálním systémem myší HRN a WT

Jaterní mikrosomální systémy kontrolních myší s „deletovanou“ NADPH:CYP reduktasou v játrech oxidovaly BaP s nižší, ale přesto měřitelnou efektivitou, než mikrosomy myší WT. Premedikací obou těchto myších linií vlastním BaP, který je induktorem CYP1A1/2, došlo ke změně účinnosti mikrosomů oxidovat BaP. Efektivita jaterních mikrosomů myší

HRN několikanásobně vzrostla, jak oproti systému myši HRN kontrolních, tak i myši WT premedikovaných BaP.

Oxidace benzo[a]pyrenu purifikovaným CYP1A1 je ovlivněna množstvím NADPH:CYP reductasy v rekonstituovaném systému

CYP1A1 rekonstituovaný s NADPH:CYP reductasou oxiduje BaP pouze na tři metabolity (3,6- a 1,6-chinon- a 3-hydroxy-BaP). Nejúčinnější oxidace BaP byla pozorována při použití nejnižší koncentrace NADPH:CYP reductasy v rekonstituovaném systému, a to v poměru CYP1A1:RED 1:0.05.

Vliv cytochromu b₅ na oxidaci BaP purifikovaným CYP1A1

Cytochrom b₅ stimuluje oxidaci BaP, při použití nízké koncentrace NADPH:CYP reductasy v poměru CYP:RED 1:0.1 až do množství 200-250 pmol cytochromu b₅. Stejně tak stimuluje i oxidaci BaP při použití vyšší koncentrace NADPH:CYP reductasy (poměr 1:1), zde dochází k nejúčinnější oxidaci BaP při poměru CYP:cyt b₅ 1:5.

Imunostanovení mikrosomálních enzymů v játrech myši premedikovaných BaP

Premedikací myši induktorem CYP1A1/2, BaP, dochází ke zvýšení exprese všech stanovovaných proteinů, CYP1A1/2, cytochromu b₅ a epoxidhydrolasy. Především u myši HRN-BaP dochází ke stimulaci exprese epoxidhydrolasy a cytochromu b₅.

Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA v myších modelech

V případě myši s „deletovanou“ NADPH:CYP reductasou v játrech dochází *in vivo* ke zvýšení tvorby aduktů BaP oproti množství aduktů tvořených v orgánech myši kontrolních (linie WT). K tvorbě aduktů DNA s BaP aktivovaného enzymy myších jaterních mikrosomů dochází i v experimentech *in vitro*. Jaterní mikrosomy myši HRN však byly v této aktivaci BaP méně účinné než mikrosomy myši linie WT. Tvorba aduktů DNA s aktivovaným BaP je přímo závislá na katalytické aktivitě NADPH:CYP reductasy.

Aktivace BaP za tvorby aduktů s DNA purifikovaným CYP1A1 je ovlivněna množstvím NADPH:CYP reductasy v rekonstituovaném systému

NADPH:CYP reductasa stimuluje tvorbu aduktu 1 tvořeného z metabolitu BaP 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP s DNA, nejúčinnější poměr CYP:RED je 1:0.4. Tento výsledek potvrzuje preference nízké koncentrace reduktasy v aktivaci BaP CYP1A1.

Vliv epoxidhydrolasy na aktivaci BaP aktivovaným CYP1A1

Epoxidhydrolasa stimuluje tvorbu aduktu 2, který je generován ze 7,8-diol-9,10-epoxidu BaP. Pro jeho tvorbu je epoxidhydrolasa jednoznačně esenciální.

Cytochrom b₅ stimuluje tvorbu aduktů BaP aktivovaného CYP1A1 s DNA

Vlivem cytochromu b₅ dochází při nízkém množství reduktasy (10 pmol) ke stimulaci tvorby aduktů 1 i 2 tvořených metabolity BaP v DNA. V případě vyššího množství reduktasy (100 pmol) je tvorba aduktu 2 podpořena přítomností cytochrom b₅ již při nízkých koncentracích. CYP1A1 v poměru CYP:cytochrom b₅ 1:1 aktivuje BaP za tvorby obou aduktů v DNA (adukt 1 a 2) v analogickém množství.

Předkládaná disertační práce přináší originální vědecké poznatky. Část těchto poznatků již také byla publikována formou časopiseckých publikací v renomovaných vědeckých periodikách. Takto bylo publikováno 7 prací, které tvoří součást disertační práce jako přílohy 2-7. Řada dalších poznatků, vyplývajících z výsledků prezentovaných v disertační práci, však byla dosud publikována pouze formou příspěvků na vědeckých kongresech a sympoziích. Pro časopiseckou publikaci jsou nyní připravovány.

- Acton E.M., Narayanan V.L., Risbood P.A., Shoemaker R.H., Vistica D.T. and Boyd M.R. (1994): *J Med Chem*, 37(14), 2185-2189.
- Aimová D.(2001): *Diplomová práce*, PřF UK, Praha
- Aimova D., Svobodova L., Kotrbova V., Mrazova B., Hodek P., Hudecek J., Vaclavikova R., Frei E. and Stiborova M. (2007): *Drug Metab Dispos*, 35(10), 1926-1934.
- Aimová D. P.J., Kotrbová V., Moserová M., Frei E., Arlt V.M., Stiborová M. (2008): *Interdiscip Toxicol.*, 1(2), 160-168.
- Alam S., Conway M.J., Chen H.S. and Meyers C. (2008): *J Viro* 82(2):1053-8
- Alison M.R. (2004): *The Cancer Handbook*, John Wiley & Sons,Hoboken
- Anari M.R., Khan S., Jatoe S.D. and O'Brien P.J. (1997): *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.*, 22(4), 305-310.
- Arlt V.M., Stiborova M., Hewer A., Schmeiser H.H. and Phillips D.H. (2003): *Cancer Res*, 63(11), 2752-2761.
- Arlt V.M. H.A., Sorg B.L., Schmeiser H.H., Phillips D.H., Stiborova M. (2004): *Chem Res Toxicol*, 17(8), 1092-1101.
- Arlt V.M. Henderson C.J., Wolf C.R., Schmeiser H.H., Phillips D.H., Stiborova M. (2006): *Cancer Lett*, 234(2), 220-231.
- Ashby J., Elliott B.M., Styles J.A. (1980): *Cancer Lett*, 9(1), 21-33.
- Auclair C. (1987): *Arch Biochem Biophys*, 259(1), 1-14.
- Auchus R.J., Lee T.C. and Miller W.L. (1998): *J Biol Chem*, 273(6), 3158-3165.
- Bednář. B. (1982): *Patologie*, Praha, Avicenum.
- Baird W.M., Hooven L.A. and Mahadevan B. (2005): *Environ Mol Mutagen*, 45(2-3), 106-114.
- Bend J.R. and Foureman C.L. (1984): *Mar Environ Res*, 14(1-4), 405-406.
- Bertrand J.R. and Giacomoni P.U. (1985): *Chemioterapia*, 4(6), 445-453.
- Bilimoria M.H. K.H. (1973): *Ann N Y Acad Sci*, 212 428-448.
- Bořek -Dohalská L., Frei E. and Stiborova M. (2004): *Collect Czech Chem Commun*, 69 603-615.
- Bui P.H. and Hankinson O. (2009): *Mol Pharmacol*, 75(5), 1031-1043.
- Burchell A. (1985): *Biochem J*, 226(1), 339-341.

- Canova-Davis E. and Waskell L. (1984): *J Biol Chem*, 259(4), 2541-2546.
- Chu Y. and Hsu M.T. (1992): *Nucleic Acids Res*, 20(15), 4033-4038.
- Coon M.J. (1978): *Nutr Rev*, 36(11), 319-328.
- Coon M.J., Persson A.V. (1980) (ed. Jakoby, William B): *Enzymatic basis of detoxification I*. Academic Press, New York.
- Cornfield J., Haenszel W., Hammond E.C., Lilienfeld A.M., Shimkin M.B. and Wynder E.L. (2009): *Int J Epidemiol*. 38(5):1175-91.
- Český statistický úřad, ČSÚ (2011) http://www.mini-scitani.cz/csu/2010edicniplan.nsf/kapitola/4017-10-%282000_az_2009%29-01 (13.7.2011)
- Dahl A. R. and Hadley W.M. (1983): *Toxicol Appl Pharmacol*, 67(2), 200-205.
- Dailey H.A. and Strittmatter P. (1980): *J Biol Chem*, 255(11), 5184-5189.
- Dalton L.K., Demerac, S., Elmes, B. C., Loder, J. W., Swan, J. M., Teitei, T. (1967): *Aust J Chem*, 20 2715-2727.
- Davis R.B., Jr. and Lecomte J.T. (2008): *Biopolymers*, 90(4), 544-555.
- DeMarini D.M., Aby-Shakra A., Gupta R., Hendee L.J., Levine J.G. (1992): *Environ Mol Mutagen*, 20(1), 12-18.
- Downie D., McFadyen M.C., Rooney P.H., Cruickshank M.E., Parkin D.E., Miller I.D., Telfer C., Melvin W.T., Murray G.I. (2005): *Clin Cancer Res*, 11(20), 7369-7375.
- Dracinsky M., Sejbál J., Rygerova B. and Stiborova M. (2007): *Tetrahedron Letters*, 48(39), 6893-6895.
- Edwards R.J., Murray B.P., Singleton A.M. and Boobis A.R. (1991): *Biochemistry*, 30(1), 71-76.
- El-Rayes B.F., Ali S., Heilbrun L.K., Lababidi S., Bouwman D., Visscher D., Philip P.A. (2003): *Clin Cancer Res*, 9(5), 1705-1709.
- Eling T.E. and Curtis J.F. (1992): *Pharmacol Ther*, 53(2), 261-273.
- Enoch H.G. and Strittmatter P. (1979): *J Biol Chem*, 254(18), 8976-8981.
- Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice, program SVOD (2011), <http://www.svod.cz/graph/?sessid=gqh3dcslo6dd74jihakqmkls7&typ=incmor&zobrazeni=graph&incidence=1&mortalita=1&vypocet=c&diag=C18> (13.7.2011)
- Estabrook R.W. and Werringloer J. (1978): *Methods Enzymol*, 52 212-220.

- Fang A.H., Smith W.A., Vouros P., Gupta R.C. (2001): *Biochem Biophys Res Commun*, 281(2), 383-389.
- Felsted R.L., En-Yuen Chu A., Chaykin S. (1973): *J Biol Chem*, 278(7), 2580-2587.
- Finn R.D., McLaughlin L.A., Ronseaux S., Rosewell I., Houston J.B., Henderson C.J. and Wolf C.R. (2008): *J Biol Chem*, 283(46), 31385-31393.
- Foretová L., Hrubá M. and Navrátilová M. (2001): *Dědičnost jako rizikový faktor pro vznik nádorových onemocnění*, Masarykův onkologický ústav, Brno
- Frei E., Bieler C.A., Arlt V.M., Wiessler M. and Stiborova M. (2002): *Biochem Pharmacol*, 64(2), 289-295.
- Froelich-Ammon S.J., Patchan M.W., Osheroff N. and Thompson R.B. (1995): *J Biol Chem*, 270(25), 14998-15004.
- Fuhr U. (2000): *Clin Pharmacokinet*, 38(6), 493-504.
- Garfinkel D. (1958): *Arch Biochem Biophys*, 77(2), 493-509.
- Gasiewicz T.A., Kende A.S., Rucci G., Whitney B. and Willey J.J. (1996): *Biochem Pharmacol*, 52(11), 1787-1803.
- Gonzalez F.J. and Gelboin H.V. (1994): *Drug Metab Rev*, 26(1-2), 165-183.
- Grinstead G.F. and Gaylor J.L. (1982): *J Biol Chem*, 257(23), 13937-13944.
- Guengerich F.P., Ballou D.P. and Coon M.J. (1976): *Biochem Biophys Res Commun*, 70(3), 951-956.
- Gut I., Soucek P. and Hodek P. (1992): *Prac. lék.*, (1), 15-20.
- Hara T. and Minakami S. (1971): *J Biochem*, 69(2), 325-330.
- Haugen D.A. and Coon M.J. (1976): *J Biol Chem*, 251(24), 7929-7939.
- Heinemann F.S. and Ozols J. (1983): *J Biol Chem*, 258(7), 4195-4201.
- Henderson C.J., Otto D.M., Carrie D., Magnuson M.A., McLaren A.W., Rosewell I. and Wolf C.R. (2003): *J Biol Chem*, 278(15), 13480-13486.
- Hildebrandt A. and Estabrook R.W. (1971): *Arch Biochem Biophys*, 143(1), 66-79.
- Hodgson E. (2004): *A Textbook of Modern Toxicology (Third Edition)*, John Wiley & Sons, Hoboken
- Hollenberg P.F. (1992): *Faseb J*, 6(2), 686-694.
- Hořejší V. and Bartůňková J. (2002): *Základy imunologie*, Triton, Praha
- Howard P.C., Beland, F.A. (1982): *Biochem Biophys Res Commun*, 104(2), 727-732.

- http://www.p450.kvl.dk/At_rel/CPR_E_trans.jpg (17.7.2011)
- http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_enzymology.htm (14.7.2011)
- Hultquist D.E. and Passon P.G. (1971): *Nat New Biol*, 229(8), 252-254.
- Chu Y. and Hsu M.T. (1992): *Nucleic Acids Res*, 20(15), 4033-4038.
- IARC (1973): *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum*, 3, 271
- IARC (1983): *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum*, 32, 477
- IARC (1987): *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum*, 7, 326
- IARC, International Institute for Research on Cancer, <http://www.iarc.fr/> (13.7.2011)
- Ioannides C. and Parke D.V. (1993): *Drug Metab Rev*, 25(4), 485-501.
- Iyanagi T., Makino N. and Mason H.S. (1974): *Biochemistry*, 13(8), 1701-1710.
- Janouchova K. (2004): *Diplomová práce*, PřF UK, Praha
- Jansson I. and Schenkman J.B. (1977): *Arch Biochem Biophys*, 178(1), 89-107.
- Juchau M.R., Lee Q.P. and Fantel A.G. (1992): *Drug Metab Rev*, 24(2), 195-238.
- Juret P., Tanguy A., Girard A., Le Talaer J.Y., Abbaticci J.S., Dat-Yuong, Le Pecq J.B. and Paoletti C. (1979): *Nouv Presse Med*, 8(18), 1495-1498.
- Kasper C.B. (1971): *J Biol Chem*, 246(3), 577-581.
- Kasper C.B. (1980) (ed. Jakoby, William B): *Enzymatic Basis of Detoxication II*, Academic Press, New York
- Klener P. (1996): *Protinádorová chemoterapie*, Galén, Praha
- Klener P. (1999): *Chemoterapie-minimum pro praxi*, Triton, Praha
- Klener P. (2002): *Klinická onkologie*, Galén, Praha
- Klingenberg M. (1958): *Arch Biochem Biophys*, 75(2), 376-386.
- Kotrbova V. (2005): *Diplomová práce*, PřF UK, Praha
- Kotrbova V., Aimova D., Brezinova A., Janouchova K., Poljakova J., Frei E. and Stiborova M. (2006): *Neuro Endocrinol Lett*, 27 Suppl 2 18-22.
- Kotrbova V., Mrazova B., Moserova M., Martinek V., Hodek P., Hudecek J., Frei E. and Stiborova M. (2011): *Biochem Pharmacol*, v tisku.
- Kouri R.E., Salerno R.A. and Whitmire C.E. (1973): *J Natl Cancer Inst*, 50(2), 363-368.

- Laemmli U.K. (1970): *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Le Pecq J.B., Nguyen Dat X., Gosse C. and Paoletti C. (1974): *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(12), 5078-5082.
- Lee T.C., Baker R.C., Stephens N. and Snyder F. (1977): *Biochim Biophys Acta*, 489(1), 25-31.
- Livingston D.J., McLachlan S.J., La Mar G.N. and Brown W.D. (1985): *J Biol Chem*, 260(29), 15699-15707.
- Loughran P.A., Roman L.J., Miller R.T. and Masters B.S. (2001): *Arch Biochem Biophys*, 385(2), 311-321.
- Lu G., Lindqvist Y., Schneider G., Dwivedi U. and Campbell W. (1995): *J Mol Biol*, 248(5), 931-948.
- Lubet R.A., Connolly G., Kouri R.E., Nebert D.W. and Bigelow S.W. (1983): *Biochem Pharmacol*, 32(20), 3053-3058.
- Luch A., Baird W.M. (2005): Metabolic activation and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Carcinogenic Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Imperial College Press, London, 19–96.
- Martinek V. and Stiborova M. (2002): *Collect Czech Chem Commun*, 67(12), 1883-1898.
- Martinkova E., Dontenwill M., Frei E. and Stiborova M. (2009): *Neuro Endocrinol Lett*, 30 Suppl 1 60-66.
- Masopust J. (2003): *Patobiochemie buňky*, 2. LF UK, Praha
- Mathe G., Triana K., Pontiggia P., Blanquet D., Hallard M. and Morette C. (1998): *Biomed Pharmacother*, 52(9), 391-396.
- Mathe G. (1999): *Biomed Pharmacother*, 53(10), 484-486.
- Mathews F.S. (1985): *Prog Biophys Mol Biol*, 45(1), 1-56.
- McLaughlin L.A., Ronseaux, S., Finn, R.D., Henderson, C.J., Roland, Wolf. C. (2010): *Transgenic Res*, 20(3), 491-502.
- Menn J.J. (1978): *Environ Health Perspect*, 27 113-124.
- Moserova M., Kotrbova V., Rupertova M., Naiman K., Hudecek J., Hodek P., Frei E. and Stiborova M. (2008): *Neuro Endocrinol Lett*, 29(5), 728-732.
- Moserova M., Kotrbova V., Aimova D., Sulc M., Frei E. and Stiborova M. (2009): *Interdiscip Toxicol*, 2(4), 239-244.
- Murray G.I., Weaver, R.J., Paterson, P.J., Ewen, S.W., Melvin, W.T., Burke, M.D. (1993): *J Pathol*, 169(3), 347-353.

- Nadler S.G. and Strobel H.W. (1988): *Arch Biochem Biophys*, 261(2), 418-429.
- Nebert D.W., Nelson D.R. and Feyereisen R. (1989): *Xenobiotica*, 19(10), 1149-1160.
- Nebert D.W., Nelson D.R., Coon M.J., Estabrook R.W., Feyereisen R., Fujii-Kuriyama Y., Gonzalez F.J., Guengerich F.P., Gunsalus I.C. and Johnson E.F. (1991): *DNA Cell Biol*, 10(1), 1-14.
- Nelson D.R., Kamataki T., Waxman D.J., Guengerich F.P., Estabrook R.W., Feyereisen R., Gonzales F.J., Coon M.J., Gunsalus I.C., Gotoh O., Okada K. and Nebert D.W. (1993): *DNA Cell Biol*, 12(1), 1-51.
- Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C. and Nebert D.W. (1996): *Pharmacogenetics*, 6(1), 1-42.
- Němečková A. (1991). *Lékařská chemie a biochemie*. Praha, Avicenum.
- Ng S., Smith M.B., Smith H.T. and Millett F. (1977): *Biochemistry*, 16(23), 4975-4978.
- Ogishima T., Kinoshita J.Y., Mitani F., Suematsu M. and Ito A. (2003): *J Biol Chem*, 278(23), 21204-21211.
- Ohashi M., Sugikawa E. and Nakanishi N. (1995): *Jpn J Cancer Res.*, 86(9), 819-827.
- Omura T. and Sato R. (1964): *J Biol Chem*, 239 2370-2378.
- Omura T. and Takesue S. (1970): *J Biochem*, 67(2), 249-257.
- Oshino N., Imai Y. and Sato R. (1971): *J Biochem*, 69(1), 155-167.
- Paltauf F., Prough R., Masters B. and Johnson J. (1974): *J. Biol. Chem.*, 249(8), 2661-2662.
- Pfeil W. (1993): *Protein Sci.*, 2(9), 1497-1501.
- Phillips D.H. (2005): Macromolecular adducts as biomarkers of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Carcinogenic Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Imperial College Press, London, 137–169.
- Poljakova J., Dracinsky M., Frei E., Hudecek J. and Stiborova M. (2006): *Collect Czech Chem Commun*, 71(81), 1169-1185.
- Poljakova J., Frei E., Gomez J.E., Aimova D., Eckschlager T., Hrabeta J. and Stiborova M. (2007): *Cancer Lett*, 252(2), 270-279.
- Poljakova J., Eckschlager T., Hrabeta J., Hrebackova J., Smutny S., Frei E., Martinek V., Kizek R. and Stiborova M. (2009): *Biochem Pharmacol*, 77(9), 1466-1479.
- Poljakova J., Hrebackova J., Dvorakova M., Moserova M., Eckschlager T., Hrabeta J., Gotlicherova M., Kopejtkova B., Frei E., Kizek R. and Stiborova M. (2011): *Neuro Endocrinol Lett*, in press.

- Qian W., Sun Y.L., Wang Y.H., Zhuang J.H., Xie Y. and Huang Z.X. (1998): *Biochemistry*, 37(40), 14137-14150.
- Reed J.R. and Hollenberg P.F. (2003): *J Inorg Biochem*, 97(3), 265-275.
- Reid T.M., Morton K.C., Wang C.Y. and King C.M. (1984): *Environ Mutagen*, 6(5), 705-717.
- Rendic S. and Di Carlo F.J. (1997): *Drug Metab Rev*, 29(1-2), 413-580.
- Rodgers K.K. and Sligar S.G. (1991): *J Mol Biol*, 221(4), 1453-1460.
- Roffo A.H. (1940): *Bull World Health Organ*. 84(6):497-502
- Rosypal S. (2002): *Úvod do molekulární biologie, 2. díl*, Stanislav Rosypal, Brno
- Rouësse J.G., Le Chevalier T., Caille P., Mondesir J.M., Sancho-Garnier H., May-Levin F., Spielmann M., De Jager R. and Amiel J.L. (1985): *Cancer Treat Rep*, 69(6), 707-708.
- Saarikoski S.T., Rivera S.P., Hankinson O. and Husgafvel-Pursiainen K. (2005): *Toxicol Appl Pharmacol*, 207(2 Suppl), 62-69.
- Saito T. and Strobel H.W. (1981): *J Biol Chem*, 256(2), 984-988.
- Salemme F.R. (1976): *J Mol Biol*, 102(3), 563-568.
- Sharples D., Hajos G., Riedl Z., Csanyi D., Molnar J. and Szabo D. (2001): *Arch Pharm (Weinheim)*, 334(8-9), 269-274.
- Schacter B.A., Nelson E.B., Marver H.S. and Masters B.S. (1972): *J Biol Chem*, 247(11), 3601-3607.
- Schenkman J.B. and Jansson I. (1999): *Drug Metab Rev*, 31(2), 351-364.
- Schenkman J.B. and Jansson I. (2003): *Pharmacol Ther*, 97(2), 139-152.
- Schwaller M.A., Allard B., Lescot E. and Moreau F. (1995): *J Biol Chem*, 270(39), 22709-22713.
- Singh M.P., Hill G.C., Peoc'h D., Rayner B., Imbach J.L. and Lown J.W. (1994): *Biochemistry*, 33(34), 10271-10285.
- Sottocasa G.L., Kuylenstierna B., Ernster L. and Bergstrand A. (1967): *J Cell Biol*, 32(2), 415-438.
- Spatzenegger M. and Jaeger W. (1995): *Drug Metab Rev*, 27(3), 397-417.
- Staron K. and Kaniuga Z. (1974): *Acta Biochim Pol*, 21(1), 61-66.
- Stayton P.S., Poulos T.L. and Sligar S.G. (1989): *Biochemistry*, 28(20), 8201-8205.

- Stiborova M., Frei E., Schmeiser H.H., Wiessler M. and Hradec J. (1990): *Carcinogenesis*, 11(10), 1843-1848.
- Stiborova M., Asfaw B., Frei E., Schmeiser H.H. and Wiessler M. (1995): *Chem Res Toxicol*, 8(4), 489-498.
- Stiborova M., Frei E. and Schmeiser H.H. (1997): *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 62 971-980.
- Stiborova M. and Miksanova M. (1999): *Živa*, 4 146-149.
- Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999): *Chemické Listy*, 93 229-237.
- Stiborova M. and Frei E. (2001): *Chem. listy*, 95 549-555.
- Stiborova M., Bieler C.A., Wiessler M. and Frei E. (2001a): *Biochem Pharmacol*, 62(12), 1675-1684.
- Stiborova M., Hájek M., Frei E. and Schmeiser H.H. (2001b): *Gen Physiol Biophys*, 20(4), 375-392.
- Stiborová M. (2002a): *Chemické Listy*, 96 784-791.
- Stiborova M., Martinek V., Rydlova H., Hodek P. and Frei E. (2002b): *Cancer Res*, 62(20), 5678-5684.
- Stiborova M., Frei E., Sopko B., Wiessler M. and Schmeiser H.H. (2002c): *Carcinogenesis*, 23(4), 617-265.
- Stiborova M., Breuer A., Aimova D., Stiborova-Rupertova M., Wiessler M. and Frei E. (2003a): *Int J Cancer*, 107(6), 885-890.
- Stiborova M., Stiborova-Rupertova M., Borek-Dohalska L., Wiessler M. and Frei E. (2003b): *Chem Res Toxicol*, 16(1), 38-47.
- Stiborova M., Sejbal J., Borek-Dohalska L., Aimova D., Poljakova J., Forsterova K., Rupertova M., Wiesner J., Hudecek J., Wiessler M. and Frei E. (2004a): *Cancer Res*, 64(22), 8374-8380.
- Stiborova M., Rupertova M., Hodek P., Frei E. and Schmeiser H.H. (2004b): *Collect Czech Chem Commun*, 69(3), 476-498.
- Stiborová M., Hudeček J., Paca Jr., J., Martinek, V., Paca, J. (2004c): *Chemické Listy*, 98 876-890.
- Stiborova M., Frei E., Hodek P., Wiessler M. and Schmeiser H.H. (2005a): *Int J Cancer*, 113(2), 189-197.
- Stiborova M., Martinek V., Rydlova H., Koblas T. and Hodek P. (2005b): *Cancer Lett*, 220(2), 145-154.

- Stiborova M., Borek-Dohalska L., Aimova D., Kotrbova V., Kukackova K., Janouchova K., Rupertova M., Ryslava H., Hudecek J. and Frei E. (2006a): *Gen Physiol Biophys*, 25(3), 245-261.
- Stiborova M., Martinek V., Schmeiser H.H. and Frei E. (2006b): *Neuro Endocrinol Lett*, 27 Suppl 2 35-39.
- Stiborova M., Poljakova J., Ryslava H., Dracinsky M., Eckschlager T. and Frei E. (2007a): *Int J Cancer*, 120(2), 243-251.
- Stiborova M., Rupertova M., Aimova D., Ryslava H. and Frei E. (2007b): *Toxicology*, 236(1-2), 50-60.
- Stiborova M., Arlt V.M., Henderson C.J., Wolf C.R., Kotrbova V., Moserova M., Hudecek J., Phillips D.H. and Frei E. (2008): *Toxicol Appl Pharmacol*, 226(3), 318-327.
- Stiborova M., Moserova M., Mrazova B., Kotrbova V. and Frei E. (2010): *Neuro Endocrinol Lett*, 31(Suppl 2), 26-35.
- Strittmatter P. and Velick S.F. (1956): *J Biol Chem*, 221(1), 253-264.
- Strittmatter P., Hackett C.S., Korza G. and Ozols J. (1990): *J Biol Chem*, 265(35), 21709-21713.
- Sugikawa E., Hosoi T., Yazaki N., Gamanuma M., Nakanishi N. and Ohashi M. (1999): *Anticancer Res*, 19(4B), 3099-3108.
- Škárka B. and Ferenčík M. (1987): *Biochémiá*, Alfa Bratislava, SNTL PRAHA.
- Šulc M. (2002): *Disertační práce*, PřF UK, Praha
- Tamburini P.P. and Schenkman J.B. (1986): *Mol Pharmacol*, 30(2), 178-185.
- Taniguchi H., Imai Y. and Sato R. (1984): *Arch Biochem Biophys*, 232(2), 585-596.
- Turek B., Hrubý S. and Černá M. (1994): *Nutriční toxikologie*, Knížnice IDVFL, Praha
- Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky (2011): *Novotvary 2008 ČR*, ÚZIS ČR, Praha
- Večerková J. (1997): *Biotransformace léčiv a její význam pro toxikologickou praxi*, Karolinum, Praha
- Vergeres G., Ramsden J. and Waskell L. (1995): *J Biol Chem*, 270(7), 3414-3422.
- Vergeres G. and Waskell L. (1995): *Biochimie*, 77(7-8), 604-620.
- Vermilion J.L. and Coon M.J. (1978): *J Biol Chem*, 252(8), 2694-2704.
- Vokurka M. (1994): *Praktický slovník medicíny*, Maxdorf, Praha
- Von Jagow G. and Sebald W. (1980): *Annu Rev Biochem*, 49 281-314.

- Wang M., Roberts D.L., Paschke R., Shea T.M., Masters B.S. and Kim J.J. (1997): *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(16), 8411-8416.
- Waxman D.J. (1999): *Arch Biochem Biophys*, 369(1), 11-23.
- Weinberg R.A. (2003): *Jediná odrodilá buňka*, Academia, Praha
- Wiechelman K.J., Braun R.D. and Fitzpatrick J.D. (1988): *Anal Biochem*, 175(1), 231-237.
- Williams J.A. and Phillips D.H. (2000): *Cancer Res*, 60(17), 4667-4677.
- Yamazaki H., Johnson W.W., Ueng Y.F., Shimada T. and Guengerich F.P. (1996): *J Biol Chem*, 271(44), 27438-27444.
- Yang M.X. and Cederbaum A.I. (1994): *Arch Biochem Biophys*, 315(2), 438-444.
- Yasukochi Y., Peterson J.A. and Masters B.S. (1979): *J Biol Chem*, 254(15), 7097-7104.
- Zhang H., Myshkin E. and Waskell L. (2005): *Biochem Biophys Res Commun*, 338(1), 499-506.
- Zhang H., Hamdane D., Im S.C. and Waskell L. (2008): *J Biol Chem*, 283(9), 5217-5225.

SEZNAM PŘÍLOH*Příloha 1*

Tabulka: Tvorba aduktů s DNA vzniklých aktivací ellipticinu potkaními jaterními, plicními a ledvinnými mikrosomy

Příloha 2

Marie Stiborová, Volker M. Arlt, Colin. J. Henderson, C. Roland Wolf, Věra Kotrbová, Michaela Moserová, Jiří Hudeček, David H. Phillips and Eva Frei: **Role of hepatic cytochromes P450 in bioactivation of the anticancer drug ellipticine: studies with the hepatic NADPH: cytochrome P450 reductase null mouse.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 226: 318-327, 2008. **IF₂₀₀₇ = 3.846**

Příloha 3

Michaela Moserová, Věra Kotrbová, Martina Rupertová, Karel Naiman, Jiří Hudeček, Petr Hodek, Eva Frei and Marie Stiborová: **Isolation and partial characterization of the adduct formed by 13-hydroxyellipticine with deoxyguanosine in DNA.** *Neuro Endocrinol. Letters*, 29(5), 728-732, 2008. **IF₂₀₀₇ = 1.443**

Příloha 4

Dagmar Aimová, Jitka Poljaková, Věra Kotrbová, Michaela Moserová, Eva Frei, Volker M. Arlt and Marie Stiborová: **Ellipticine and benzo(a)pyrene increase their own metabolic activation via modulation of expression and enzymatic activity of cytochromes P450 1A1 and 1A2.** *Interdisc. Toxicol.*, 1(2): 160-168, 2008. **Dosud bez IF**

Příloha 5

Michaela Moserová, Věra Kotrbová, Miroslav Šulc, Eva Frei, Marie Stiborová: **Analysis of benzo[a]pyrene metabolites formed by rat hepatic microsomes using high pressure liquid chromatography: optimization of the method.** *Interdisc. Toxicol.*, 2(4): 101-106, 2009. **Dosud bez IF**

Příloha 6

Marie Stiborová, Michaela Moserová, Barbora Mrázová, Věra Kotrbová, Eva Frei: **Role of cytochromes P450 and peroxidases in metabolism of the anticancer drug ellipticine: additional evidence of their contribution to ellipticine activation in rat liver, lung and kidney.** *Neuro Endocrinol. Letters*, 31(Suppl.2):101–110, 2010. **IF₂₀₁₀=1.621**

Příloha 7

Kateřina Levová, Michaela Moserová, Věra Kotrbová, Miroslav Šulc, Colin J. Henderson, Roland C. Wolf, David H. Phillips, Eva Frei, Heinz H. Schmeiser, Jan Mareš, Marie Stiborová: **Role of cytochromes P450 1A1/2 in detoxication and activation of carcinogenic aristolochic acid I: studies with the NADPH:cytochrome P450 reductase null (HRN) mouse model.** *Toxicol Sci.*, 121(1):43-56, 2011. **IF₂₀₁₀=5.093**

Příloha 8

Věra Kotrbová, Barbora Mrázová, Michaela Moserová, Václav Martínek, Petr Hodek, Jiří Hudeček, Eva Frei, Marie Stiborová: **Cytochrome b₅ shifts oxidation of the anticancer drug ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to activation, thereby modulating its pharmacological efficacy.** *Biochem Pharmacol.*, 2011 v tisku. **IF₂₀₁₀=4.889**

