

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra Biochemie**



**Vliv benzo[a]pyrenu, Sudanu I a jejich společného působení na  
expresi cytochromu P450 1A1**

*The influence of application of benzo[a]pyrene, Sudan I and their  
combinations on the expression*

*of cytochrome P450 1A1*

**Bakalářská práce**

Sandra Kleinová

Vedoucí práce: RNDr. Helena Dračínská, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Heleny Dračínské, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne:

Podpis:

#### Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Heleně Dračínské Ph.D. za její ochotu, trpělivost, připomínky a za všechnen čas, který mi věnovala během práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Lucii Bořek-Dohalské Ph.D., která mi radila a pomáhala. RNDr. Františku Bártovi za pomoc při HPLC a Zuzaně Klusoňové za její spolupráci a zpříjemňování času v laboratoři.

## Abstrakt

Jedním z nejrozšířenějších prokázaných lidských karcinogenů je polycyklický aromatický uhlovodík benzo[a]pyren, který je přítomen ve všech složkách životního prostředí. Vzniká zejména při nedokonalém spalování a nachází se v cigaretovém kouři. Sudan I je průmyslově využívaným azobarvivem, které bylo v minulosti používáno i k barvení potravin, a je schopen u laboratorních zvířat vyvolat kancerogenezi. Je také potencionálním karcinogenem pro člověka. Přeměna obou látek cytochromy P450 1A vede k jejich aktivaci ve směru tvorby kovalentních aduktů s DNA.

Cílem této práce je studium vlivu benzo[a]pyrenu a Sudanu I podávaných samostatně nebo v kombinaci na proteinovou expresi cytochromu P450 1A1 v játrech, ledvinách a plicích laboratorních potkanů. Pomocí imunodetekce CYP1A1 bylo zjištěno, že dochází ke zvýšení exprese tohoto enzymu ve všech zkoumaných orgánech. K nejvýznamnějšímu zvýšení hladiny CYP1A1 došlo v játrech a plicích všech premedikovaných potkanů, ve kterých byl nejvyšší nárůst exprese CYP1A1 pozorován v případě kombinovaného podání obou látek. V ledvinách nebyl zaznamenán podobně výrazný rozdíl mezi indukčním vlivem samostatně podávaných látek a jejich kombinované aplikace na expresi CYP1A1. Indukční potenciál BaP, Sudanu I a jejich kombinací na expresi CYP1A1 byl potvrzen i významně zvýšenou aktivitou tohoto enzymu v játrech premedikovaných potkanů. Zvýšená exprese CYP1A1 způsobena indukčním působením benzo[a]pyrenu a Sudanu I může významně zasahovat do jejich vlastního metabolismu a tím měnit jejich kancerogenní potenciál.

**Klíčová slova:** exprese proteinů, cytochromy P450, Sudan I, benzo[a]pyren

## **Abstract**

One of the extended humans' carcinogens is benzo[a]pyrene, which is ubiquitous in environment. BaP is formed by incomplete combustion and is part of cigarette smoke. Sudan I is widely used azo-dye, which was formerly used as an orange food colouring. Sudan I causes tumors in experiment animals and is potential carcinogen for human. Both compounds require metabolic activation by cytochrome P450 1A which can lead to DNA adduct formation.

The aim of this Bachelor thesis was to compare the effect of application of benzo[a]pyrene and Sudan I administrated individually or in combination to rats on protein expression of cytochrome P450 1A1 in livers, kidneys and lungs. Using immunodetection, the expression of CYP1A1 was found to be increased in all examined organs. The most distinct enhancement in induction of protein expression of CYP1A1 was observed in livers and lungs of rats of all treatment groups. The highest increase in the expression of CYP1A1 in livers and lungs was caused by combined application of the studied compounds. However, there wasn't found such difference between induction potential of co-treatment with both compounds and their individual application on expression CYP1A1 in kidney. Induction potential of BaP, Sudan I and their combinations on the expression of CYP1A1 was confirmed by significant enhancement of activity of this enzyme in livers. The increased expression of CYP1A1 by BaP and Sudan I might lead to mutual influence on their own metabolism and therefore change their own carcinogenic potential.

(In Czech)

**Key words:** expression of proteins, cytochrome P450, Sudan I, benzo[a]pyrene

## Obsah

1.	Úvod.....	10
1.1.	Xenobiotika .....	10
1.2.	Kancerogeneze .....	10
1.2.1	Karcinogeny .....	11
1.3.	Biotransformace xenobiotik .....	12
1.4.	Cytochromy P450.....	13
1.4.1	Struktura cytochromu P450.....	13
1.4.2	Nomenklatura cytochromů P450.....	14
1.4.3	Inducibilita cytochromů P450 .....	14
1.4.4	Účast cytochromů na metabolismu karcergenů.....	15
1.4.5	Cytochromy P450 1A1 .....	16
1.5.	Polycyklické aromatické uhlovodíky .....	17
1.5.1	Benzo[a]pyren .....	17
1.5.1.1	Metabolismus benzo[a]pyrenu .....	18
1.6.	Azobarviva .....	19
1.6.1	Sudan I.....	19
1.6.1.1	Metabolismus Sudanu I .....	20
2.	Cíl práce .....	22
3.	Materiály a metody .....	23
3.1.	Použité materiály a chemikálie .....	23
3.2.	Použité přístroje .....	23
3.3.	Použité metody.....	26
3.3.1	Premedikace experimentálních zvířat .....	26
3.3.2	Izolace mikrosomů .....	27

3.3.3	Stanovení množství proteinů .....	28
3.3.4	Stanovení množství cytochromu P450 .....	28
3.3.5	SDS-PAGE elektroforéza.....	29
3.3.6	Metoda přenosu proteinů „Westernblotting“ a imunodetekce CYP1A1 .....	30
3.3.7	Oxidace Sudanu I – stanovení aktivity CYP1A1 .....	31
3.3.8	O-deethylace 7-ethoxyresorufinu – stanovení aktivity CYP1A.....	32
4.	Výsledky .....	34
4.1.	Charakterizace izolovaných mikrosomů .....	34
4.2.	Imunodetekce CYP 1A1 .....	36
4.3.	Stanovení aktivity CYP1A1 oxidací Sudanu I.....	38
4.4.	Stanovení aktivity CYP1A metodou EROD.....	39
5.	Diskuse.....	41
6.	Závěr .....	44
7.	Seznam použité literatury.....	45

## Seznam použitých zkratek

A	absorbance
AhR	receptor pro polycyklické aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor)
APS	peroxodisíran amonný
BaP	benzo[a]pyren
BCA	bicinchoninová kyselina
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát/ nitro blue tetrazolium
BSA	hovězí sérový albumin
CAR	konstitutivní androstanový receptor (constitutive androstane receptor)
CBBR	Coomassie Brilliant Blue R-250
CYP	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EROD	ethoxy-resorufin <i>O</i> -deethylační aktivita
g	tíhové zrychlení (9,8 m/s <sup>2</sup> )
GAPDH	glyceraldehyd-fosfát-dehydrogenasa
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
IgG	savčí imunoglobulin typu G
MFO	mikrosomální systém monooxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)
NADPH	redukováná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky



PBS	fosfátový pufr s přídavkem NaCl
PVDF	polyvinylidenfluorid
PXR	pregnanový X receptor (pregnane X receptor)
RPM	otáčky za minutu
SDS	dodecylsírán sodný
SudI	Sudan I
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialové záření
w/v	hmotnostní/objemový zlomek

# 1. Úvod

V ekonomicky vyspělých zemích jsou nádorová onemocnění jednou z nejběžnějších příčin úmrtí. Nejčastěji postihují starší jedince, nicméně v poslední době se začínají objevovat i u nižších věkových kategorií. Mezi hlavní příčiny těchto onemocnění patří karcinogenní složky v životním prostředí, stres, špatný životní styl (konzumace alkoholu, kouření) a nekvalitní stravování (strava bohatá na tuky a cukry)<sup>1</sup>.

Podle České onkologické společnosti, České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně, každý třetí obyvatel ČR v průběhu svého života rakovinou onemocní a každý čtvrtý na ni zemře<sup>2</sup>.

## 1.1. Xenobiotika

Xenobiotika jsou látky cizího původu, které se v organismu běžně nevyskytují a nejsou nutné pro jeho zdravý vývoj, ani neslouží jako zdroj energie. Mezi xenobiotika řadíme jak látky průmyslové výroby, tak i přírodní povahy jako jsou léčiva, průmyslové chemikálie, pesticidy, alkaloidy, sekundární metabolity rostlin apod.<sup>3</sup>.

Do těla se tyto látky dostávají třemi hlavními způsoby: trávicím ústrojím (žaludek, střeva), respiračním systémem (plíce, průdušky, nosní sliznice) a pokožkou. Způsob vstupu xenobiotik závisí zejména na zdroji, ve kterém se vyskytují, a na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech a to zejména na rozpustnosti ve vodě. Po vstupu do organismu se většinou látky jako první dostávají do krevního řečiště, kde mohou interagovat s plasmatickými proteiny, které mohou sloužit jako transportéry, a až poté dochází ke vstupu do jednotlivých tělních buněk<sup>3</sup>.

Působení xenobiotik na organismus nesouvisí pouze s jejich toxikologickými vlastnostmi, ale také závisí na koncentraci a době působení<sup>3</sup>.

## 1.2. Kancerogenese

Kancerogenese neboli karcinogenese je dlouhodobý proces vzniku nádorů, který je ovlivněn pohlavím, rasou a genetickým polymorfismem řady enzymů a proteinů<sup>1,4</sup>. Při karcinogenese dochází ke kumulaci poruch určitých genů, které vedou k narušení normální funkce jimi kódovaných proteinů podílejících se zejména na regulaci dělení, diferenciaci buňky a stabilitě genomu. Nejzávažnější jsou poruchy genů pro proteiny, které se podílejí na přenosu signálů, kontrole exprese genů, kontrole správnosti replikace DNA a

chromosomů, regulaci buněčného cyklu atd. Je-li porucha některého z genů vrozená, může být karcinogenese značně urychlena<sup>1</sup>.

Proces karcinogenese se skládá ze tří fází: iniciační, promoční a progresní. V iniciační fázi dochází ke změnám genetické informace zdravých buněk, které vedou ke tvorbě prekarcinogenní léze. Ta je vyvolána především rozličnými modifikacemi molekul DNA (kovalentní vazba karcinogenu na báze či deoxyribosu DNA). Při promoční fázi dochází zejména ke zvýšené proliferaci primárně pozmeněných buněk. V důsledku toho vznikají nezhoubné nádory<sup>4</sup>. Klíčovými faktory promoční fáze jsou především aktivity proteinkinasy a fosfatasy a jejich regulace. Progresní fázi můžeme přirovnat k fázi iniciační. Procesy modifikace jsou tu však efektivnější. Při této fázi dochází k tvorbě maligně pozmeněných buněk<sup>4,5</sup>.

### **1.2.1 Karcinogeny**

Karcinogeny jsou obvykle anorganické nebo organické sloučeniny, které jsou zpravidla schopny přímo nebo po metabolické přeměně vytvářet adukty s DNA, případně jejich metabolismem vznikají kyslíkové radikály, které mohou reagovat s DNA<sup>1</sup>.

Podle mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) jsou chemické látky rozděleny do několika skupin podle nebezpečnosti. V první skupině jsou lidské karcinogeny s prokázaným karcinogenním účinkem na člověka. Do této skupiny patří např. složky tabákového kouře (benzo[a]pyren), uhelný dehet, saze, benzen, azbest, atd. Druhá skupina obsahuje látky pravděpodobně karcinogenní (např. barviva na bázi benzidinu)<sup>6</sup>.

Karcinogeny můžeme rozdělit podle mechanismu působení do několika skupin. První skupinou jsou genotoxické karcinogeny, které tvoří kovalentní adukty s DNA. Do této skupiny patří tzv. primární karcinogeny, které přímo reagují s DNA, bez metabolické aktivace (např. ethylenamin), sekundární karcinogeny, které se v organismu přeměňují na aktivní karcinogen (např. nitrosaminy) a anorganické karcinogeny, které ovlivňují replikaci DNA (např. nikl). Druhou skupinou jsou karcinogeny, které způsobují změny struktury molekul DNA, jako jsou jedno- a dvou-řetězové zlomy. Třetí skupinou jsou epigenetické karcinogeny, které vytváří nekovalentní vazby s DNA (různé interkaláty), nebo s DNA nereagují vůbec (pevné karcinogeny, kokarcinogeny)<sup>4,7</sup>.

### 1.3. Biotransformace xenobiotik

Odstranění xenobiotik z organismu probíhá procesem zvaným biotransformace, který je katalyzovaný enzymy nacházejícími se převážně v játrech, plicích, ledvinách, střevech, kůži ale i dalších tkáních<sup>3</sup>.

Během evoluce se u jednotlivých organismů vyvinulo mnoho detoxifikačních mechanismů. Tyto procesy probíhají ve všech živých organismech a jsou důležité pro zachování jedince. Protože při velmi vysoké koncentraci nebo dlouhé době působení toxické látky dochází k ireverzibilnímu poškození organismu a tím i k jeho zániku. U eukaryotických organismů se rozlišují dvě fáze eliminace xenobiotik<sup>3</sup>.

#### První fáze detoxikace xenobiotik:

Při první fázi biotransformace dochází ke zvýšení rozpustnosti látky ve vodě, aby mohlo být xenobiotikum lépe vyloučeno z organismu a nemohlo dojít k jeho akumulaci. První fáze biotransformace (derivatizační fáze) xenobiotik zahrnuje tyto chemické pochody: oxidaci postranního řetězce, hydroxylaci aromatů, deaminaci, tvorbu epoxidů, sulfooxidaci, N-hydroxylaci, redukci a hydrolytické reakce. Tyto reakce molekulu xenobiotika modifikují tak, aby byla schopna účastnit se II. fáze detoxikace<sup>3,8</sup>.

Enzymy, které se nejvíce uplatňují v této fázi, jsou cytochromy P450, mono- a dioxygenasy, peroxidasy, fosfatasy a jiné další hydrolasy<sup>3,8</sup>.

#### Druhá fáze detoxikace xenobiotik:

Úkolem druhé fáze biotransformace jsou konjugiční reakce. Jedná se o skupinu metabolických reakcí, při kterých xenobiotikum reaguje s endogenní sloučeninou nebo funkční skupinou za vzniku konjugátu, který je více rozpustný ve vodě než původní látka. Sloučenina, která vstupuje do konjugiční reakce, musí ve své struktuře obsahovat skupinu vhodnou pro reakci s konjugičním činidlem za vzniku stabilního produktu. Tato skupina je buď v xenobiotiku přítomna, nebo se vytvoří během první fáze biotransformace. Příkladem reakcí II. fáze biotransformace jsou: konjugace se sacharidy, vznik glukosidouronátů, peptidová konjugace, acetylace a konjugace s glutathionovým systémem<sup>3</sup>.

Většina reakcí z druhé fáze biotransformace xenobiotik je katalyzována enzymy ze třídy transferas, které jsou málo specifické vůči endogenní sloučenině<sup>3</sup>.

## 1.4. Cytochromy P450

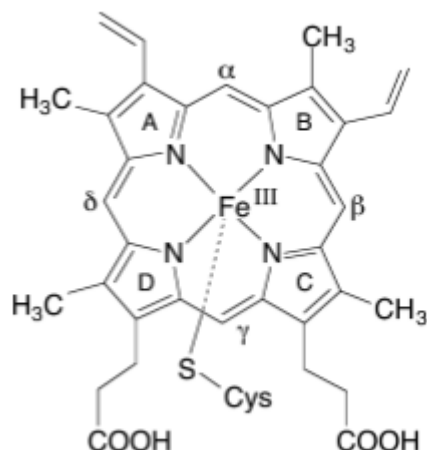
Cytochromy P450 jsou jedny z nejdůležitějších enzymů, které se účastní metabolismu xenobiotik. Cytochromy P450 jsou evolučně starší než jiné hemoproteiny<sup>5</sup>. Vyskytují se ve všech organismech, bakteriích, rostlinách i v živočiších<sup>9,10</sup>. V lidském těle se vyskytují především ve játrech, v značné míře jsou zastoupeny i v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku i nadledvinkách. V buňkách jsou cytochromy lokalizovány především v membránách hladkého endoplasmatického retikula a některé i v membránách mitochondrií<sup>3,5</sup>.

Cytochromy P450 jsou součástí systému mikrosomálních monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO) a jsou konkrétně terminální oxidasou tohoto systému<sup>5,9,11</sup>. Jsou zodpovědné za reakce I. fáze biotransformace xenobiotik, kde katalyzují převážně oxidační, peroxidační, ale také redukční reakce. Katalyzují také přeměnu endogenních látek a uplatňují se též v biosyntéze mastných kyselin, steroidních hormonů, vitamínu D a prostaglandinů<sup>3,5,12</sup>.

Název cytochrom P450 vychází z toho, že redukovaný cytochrom v komplexu s oxidem uhelnatým má absorpční maximum při vlnové délce 450 nm<sup>13</sup>.

### 1.4.1 Struktura cytochromu P450

Cytochrom P450 je hemthiolátový protein, který ve své struktuře obsahuje protoporfyrin IX, který je vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu. Tato thiolátová síra je pátým ligandem iontu železa hemu. Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody. Toto uspořádání (obrázek 1, strana 14) umožňuje výjimečné chování a odlišuje cytochromy od ostatních hemoproteinů<sup>3,5,11,14</sup>.



Obrázek 1: Struktura hemu b cytochromu P450. Ion železa je vázaný dusíky pyrolových jader a prostřednictvím síry je vázán k cysteinu, převzato z cit<sup>6</sup>

### 1.4.2 Nomenklatura cytochromů P450

Cytochromy se vyskytují v různých formách, které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle stupně homologie jejich primární struktury (pořadí aminokyselin) proteinových molekul. Pro zjednodušení bylo zavedeno systematické názvosloví cytochromů P450, ve kterém se označují zkratkou CYP. Rodiny se označují arabskou číslicí za zkratkou CYP. Dále následuje velké písmeno, které označuje podrodinu a jednotlivé isoformy cytochromů se značí arabskou číslicí za písmenem podrodiny. Např. CYP1A1 je prvním členem v podrodině A, která patří do první rodiny<sup>5</sup>.

Aby cytochromy patřily do jedné rodiny, musí vykazovat alespoň 40% homologii v sekvenci aminokyselin. Aby patřily do podrodiny, musí vykazovat homologii v sekvenci aminokyselin 60 %<sup>5</sup>.

### 1.4.3 Inducibilita cytochromů P450

Cytochromy P450 patří v závislosti na konkrétních izoformách jak mezi konstitutivní tak mezi inducibilní enzymy. To, že je daný enzym inducibilní, znamená, že i když je v organismu přítomen v mizivém množství, může jeho koncentrace extrémně narůst v závislosti na přítomnosti induktoru. Konstitutivní enzymy udržují svoji hladinu stále konstantní, syntéza nezávisí na přítomnosti induktoru (příkladem konstitutivního enzymu je CYP2A6). K silně inducibilním enzymům patří většina izoenzymů cytochromů P450<sup>5</sup>.

Z hlediska indukce můžeme cytochromy P450 rozdělit do čtyř tříd, které jsou indukovány rozdílnými skupinami endogenních či exogenních látek. Syntéza cytochromů

z první třídy je indukována polyaromatickými uhlovodíky, pomocí tzv. Ah receptoru. Cytochromy druhé třídy jsou indukovány fenobarbitalem a látkami fenobarbitalového typu. Deoxamethason vyvolává zvýšenou expresi cytochromů třetí třídy. A cytochromy čtvrté třídy jsou indukovány peroxisomovými proliferátory<sup>3,15</sup>.

Indukce cytochromů P450 probíhá přes transkripční faktory, které jsou aktivovány příslušnými buněčnými receptory. Mezi receptory mohou patřit: receptor pro polycyklické aromatické uhlovodíky (AHR), pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní receptor pro adrostan (CAR). Po navázání ligandu na receptor, je tento komplex přesunut do jádra, kde se váže na transkripční faktory a spouští transkripci příslušného enzymu<sup>16</sup>.

Podstatnou roli při variabilitě obsahu jednotlivých cytochromů P450 hraje kromě jejich indukovatelnosti i genetický polymorfismus. Genetický polymorfismus je důvodem vrozených změn v DNA, které mohou vést k absenci cytochromu P450, k nemožnosti indukce, nebo ke tvorbě formy cytochromu P450, který má změněnou katalytickou aktivitu<sup>5</sup>.

Příklady inducibilních cytochromů P450 a jejich induktory: CYP1A1 a CYP1A2, kde induktorem je kouření, množství enzymu může vzrůst 40x – 100x. CYP2D6, induktorem jsou barbituráty a hladina může vzrůst více než 100x<sup>5</sup>. Další příklady jsou uvedené v tabulce 1 (str. 16).

#### 1.4.4 Účast cytochromů na metabolismu kancerogenů

Cytochromy P450 se podílejí jak na aktivačních tak detoxikačních reakcích organismu<sup>17</sup>. V případě detoxikace dochází k transformaci substrátů za vzniku polárnějších produktů, které mohou být dále vyloučeny z těla, a tak nedochází k jejich bioakumulaci. Vedle toho může dojít k tomu, že se prekarcinogeny mohou aktivovat a vázat na endogenní látky, jako například nukleové kyseliny a proteiny, což může vést ke změně jejich fyziologické funkce. Tyto systémy mohou také poškodit buňku tvorbou radikálů, aktivních forem kyslíku, peroxidace lipidů apod. Stěžejní cytochromy pro aktivaci karcinogenních substrátů jsou především CYP 1A1, 1A2, 2E1 a 3A4<sup>5,12,17,18</sup>. Příklady cytochromů a jejich substrátů a induktorů jsou uvedeny v tabulce 1 (str. 16).

**Tabulka 1:** *Lidské cytochromy P450 aktivující karcinogenní sloučeniny a příklady takových sloučenin, upraveno a převzato z cit<sup>5</sup>*

P450	Substrát	Induktor
1A1	Benzo-a-pyren a jiné polycyklické aromatické uhlovodíky aj.	Kouření, benzo-a-pyren a 3-methylcholantren aj.
1A2	Heterocyklické a aromatické aminy aj.	Heterocyklické aminy aj.
2B6	Nikotin, aflatoxin	Barbituráty, dexamethason
2E1	Benzen, styren, vinylbromid, vinylchlorid	Ethanol, aceton a toluen
3A4	Aflatoxin B1, 17-estradiol aj.	Rifampicin, dexamethason a fenobarbital aj

Cytochromy P450 se kromě biotransformace podílejí také na metabolismu dalších látek, které mohou potencovat karcinogenezi. Cytochromy P450 se také podílejí na přeměně steroidních látek a protinádorových léčiv – např. CYP1A1, 1A2, 3A4 a 2C. Na katalýze těchto reakcí se podílí cytochromy s větší substrátovou specifitou pro metabolismus steroidů, do této skupiny patří především CYP19 a CYP21. Přičemž nejvýznamnější je CYP19, který je označován jako aromatasa a ovlivňuje vývoj nádorů (např. nádor prsu)<sup>5</sup>.

#### 1.4.5 Cytochromy P450 1A1

Pro lidské cytochromy podrodiny 1A jsou známy dvě isoformy: CYP1A1 a CYP1A2<sup>12,18</sup>. Rodina CYP1 je velmi významná v I. fázi biotransformace xenobiotik a to polycyklických aromatických uhlovodíků, heterocyklických a aromatických aminů a amidů. Přeměna těchto xenobiotik cytochromy P450 1A často vede k aktivaci jejich mutagenních a karcinogenních vlastností<sup>19</sup>.

Tyto dva enzymy (CYP1A1 a CYP1A2) jsou si podobné, katalyzují i podobné reakce, avšak liší se výskytem v organismu<sup>5,12</sup>. Lidský cytochrom P450 1A1 je obsažen nejvíce v tkáních jako jsou kůže, plíce, ledviny, hrtan, dále pak v placentě, plodu a embryu<sup>20</sup>. Exprese na proteinové úrovni byla nicméně prokázána i v játrech<sup>21</sup>. CYP1A1 je nejaktivnější



enzym z hlediska přeměny prokarcinogenů, kdy přeměňuje tyto látky na vysoce reaktivní meziprodukty. Tyto látky se mohou dále vázat na DNA a tvořit s ní adukty, což může vést k mutagenезi a tvorbě nádorů<sup>22</sup>. CYP1A1 je indukován polycyklickými aromatickými uhlovodíky, které jsou nejvíce zastoupeny v cigaretovém kouři. U kuřáků byla zjištěna zvýšená koncentrace CYP1A1 v plicích<sup>5</sup>.

CYP1A2 se naopak nejvíce vyskytuje v játrech. Lidský 1A2 můžeme najít také v nosním epitelu, plicích, ledvinách, mozku, prostatě a kůži. Hraje významnou roli v metabolismu kofeinu a léčiv, jako je například melatonin, lidokain, olanzapin, takrin, teofylin, triamteren a zolmitriptan<sup>23</sup>.

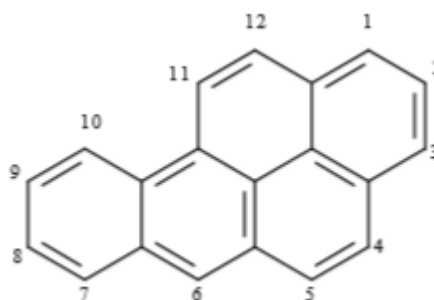
## 1.5. Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) jsou organické látky, které se vyskytují v životním prostředí. Vznikají nedokonalým spalováním organického materiálu, například při spalování nafty, dřeva a fosilních paliv. Nachází se v tabákovém kouři a také v jídle<sup>24</sup>. Používají se například pro syntézu detergentů a pesticidů<sup>24</sup>.

Polycyklické aromatické uhlovodíky mají karcinogenní nebo mutagenní účinky. Při jejich aktivaci mohou vznikat více karcinogenní produkty<sup>24</sup>. Jedním z příkladů je benzo[a]pyren.

### 1.5.1 Benzo[a]pyren

Benzo[a]pyren (BaP) je příkladem polycyklických aromatických uhlovodíků. Skládá se z pěti kondenzovaných benzenových kruhů (obrázek 2)<sup>25</sup>.



Obrázek 2: Struktura benzo(a)pyrenu, převzato a upraveno z cit.<sup>24</sup>

Jedná se o lidský karcinogen, který podle IARC můžeme zařadit do první skupiny karcinogenů, tedy mezi prokázané lidské karcinogeny. Stejně jako ostatní PAH vzniká při nedokonalém spalování organického materiálu a je přítomný ve všech složkách životního

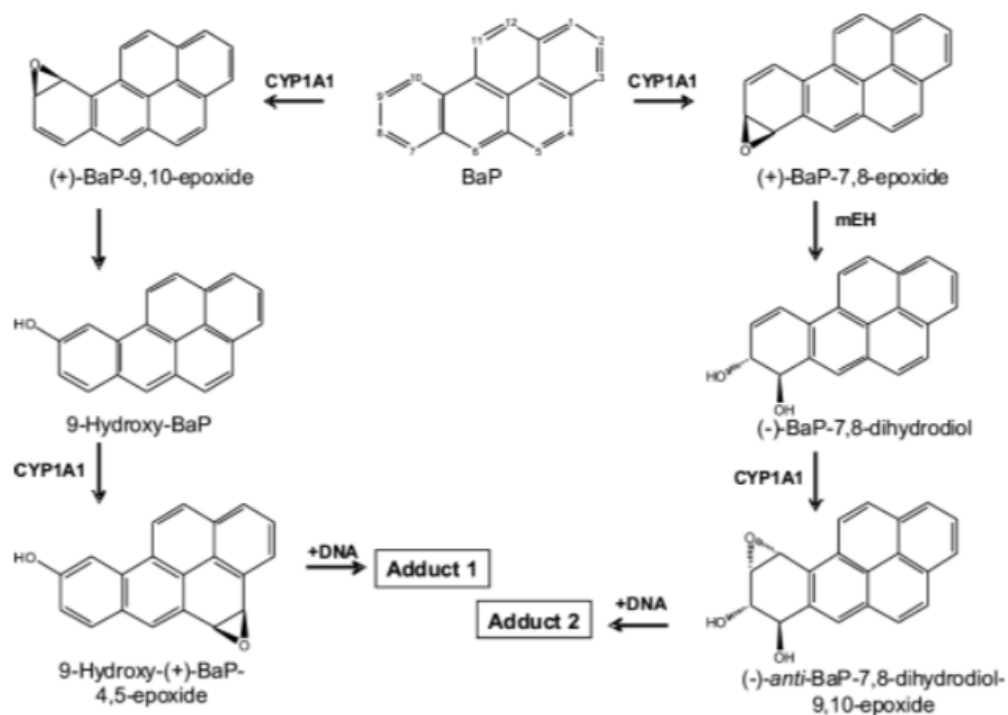
prostředí. Ve vysoké koncentraci se nachází v cigaretovém kouři, vzhledem k tomu se jedná o nejvýznamnější karcinogen při vzniku rakoviny plic u kuřáků<sup>26</sup>.

BaP u člověka vyvolává rakovinu plic, kůže, jater a tlustého střeva. U laboratorních zvířat je spojován s rakovinou plic a žaludku<sup>26,27</sup>. BaP je přeměňován mikrosomální epoxidhydrolasou a cytochromy P450 za vzniku karcinogenních metabolitů, které s DNA vytváří adukty. BaP je odpovědný za zvýšení exprese cytochromů P450 1A1 vazbou na Ah receptor<sup>26,27</sup>.

### 1.5.1.1 Metabolismus benzo[a]pyrenu

Benzo[a]pyren je prokarcinogen, který je aktivován na karcinogen. Přeměna BaP je závislá na biotransformaci, která vede k tvorbě hydroxylovaných meziproductů, epoxidů, chinonů a dihydrodiolů<sup>28</sup>. BaP je metabolizován ve dvou drahách. V první dráze je BaP přeměňován pomocí cytochromů P450 a v druhé dráze pomocí aldo-ketoreduktas, které katalyzují přeměnu dihydrodiolu na chinon. Hlavní dráha je popsána na obrázku 3 (str. 19).

Jak již bylo řečeno výše, na metabolismu BaP se podílí převážně cytochromy P450 1A1 a mikrosomální epoxidhydrolasy. BaP je nejdříve oxidován CYP1A1 na epoxid (BaP-7,8-epoxid), který je dále přeměňován mikrosomální epoxidhydrolasou na BaP-7,8-dihydrodiol. Poté dochází k další reakci s CYP1A1, která vede ke vzniku reaktivního BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxidu (BPDE), který vytváří s DNA adukty. Epoxidy reagují především s purinovými bázemi v DNA (deoxyguanosinem a deoxyadenosinem). 10-(deoxyguanosin-N<sup>2</sup>-yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyren (dG-N<sup>2</sup>-BPDE) vzniká při reakci epoxidu s DNA. Mimo to může být BaP oxidován na BaP-9,10-epoxid a dále na 9-hydroxy-BaP-4,5-epoxid, který také reaguje s DNA (obrázek 3, str. 19), za tvorby kovalentních aduktů<sup>26</sup>.



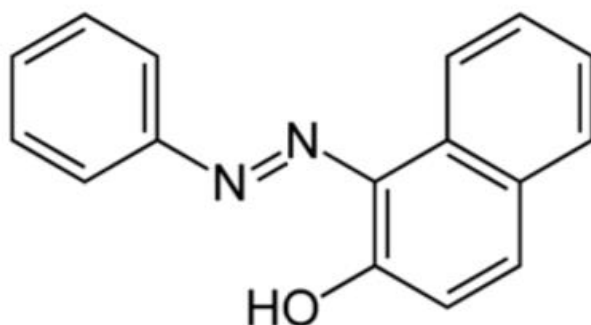
Obrázek 3: Metabolická aktivace BaP, převzato a upraveno z cit<sup>26</sup>.

## 1.6. Azobarviva

Azobarviva patří mezi syntetická organická barviva. Tato barviva mají vysoké využití v textilním, papírenském a potravinářském průmyslu a v chemických laboratořích. Tyto látky jsou špatně odbourávány za aerobních podmínek, a proto mohou znečišťovat životní prostředí<sup>29</sup>. Některé z těchto látek mohou vykazovat karcinogenní a alergenní účinky<sup>30</sup>. Jedním z příkladů takových látek je Sudan I.

### 1.6.1 Sudan I

Sudan I (1-(fenylazo)-2-hydroxynaftol) patří mezi azobarviva právě díky vazbě N=N, která je typická pro tyto sloučeniny<sup>31</sup>. Strukturu Sudanu I můžeme vidět na obrázku 4 (str. 20).



Obrázek 4: Struktura Sudanu I, převzato a upraveno z cit<sup>32</sup>

Sudan I se v přírodě se přirozeně nevyskytuje a dodnes se používá k barvení různých materiálů (například uhlovodíková rozpouštědla, oleje, tuky, vosky, plasty, tiskařské barvy, boty, podlahová leštidla a benzín)<sup>30</sup>. Dříve byl Sudan I používán i jako oranžové potravinářské barvivo, což bylo později vyhodnoceno jako nebezpečné z důvodu jeho karcinogenity. Sudan I je prokázaným karcinogenem u potkanů, myši a králíků. U lidí se jedná o potenciální karcinogen. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) zařadila Sudan I do 3. kategorie karcinogenů<sup>6</sup>. Výzkumy prokázaly, že se jedná o silný alergen, který při kontaktu s kůží vyvolává pigmentaci<sup>30</sup>.

I přes zákaz používání této látky v potravinářském průmyslu byla v několika zemích Evropské Unie v roce 2003 zjištěna přítomnost Sudanu I v potravinách obsahující chilli, kari a kurkumu<sup>30,33</sup>.

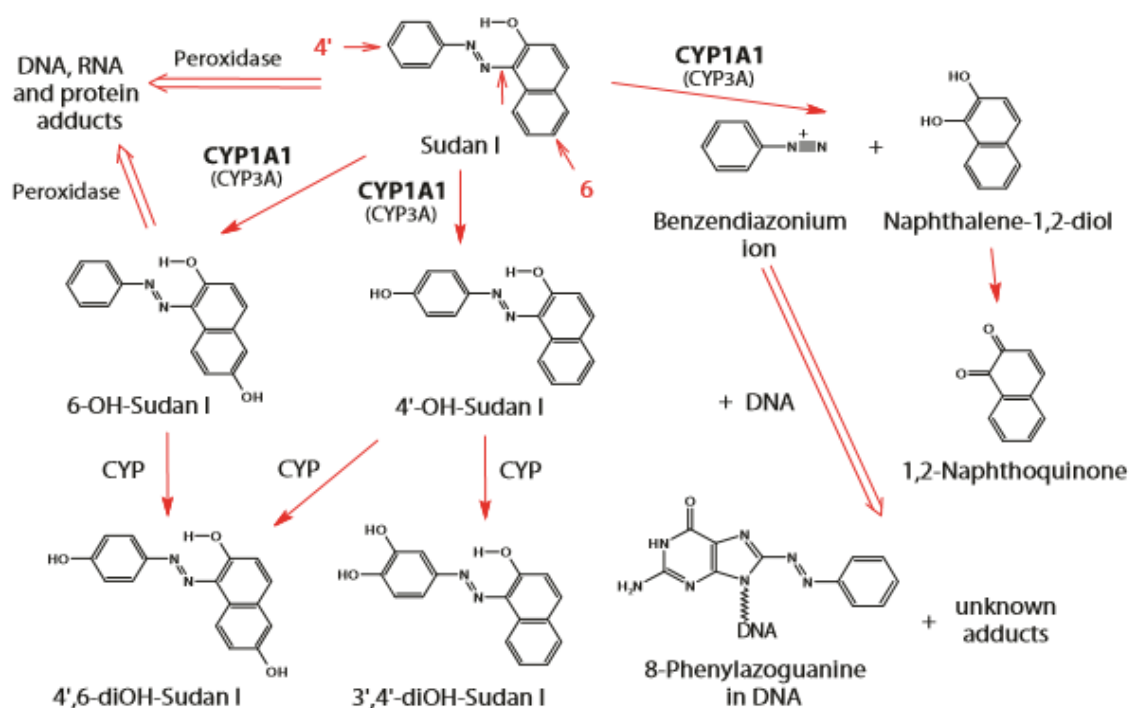
Sudan I má mutagenní účinek na bakteriální a savčí buňky. Genotoxický účinek byl prokázán po metabolické aktivaci jaterními cytochromy P450 a peroxidasami *in vitro* a u laboratorních potkanů, myši a králíků v játrech a močovém měchýři *in vivo*<sup>30</sup>.

### 1.6.1.1 Metabolismus Sudanu I

Metabolismus Sudanu I (obrázek 5, str. 21) je charakterizován pro potkany a králíky, u kterých probíhá především v játrech pomocí oxidačních a redukčních reakcí. Výzkumem byly zjištěny hlavní produkty oxidační přeměny Sudanu I, vedoucí k tvorbě hydroxylovaných metabolitů. V poloze 4' benzenového kruhu vzniká 1-[(4'-hydroxyfenyl)azo]-2-naftol a v poloze 6 naftalenové části vzniká 1-(fenylazo)naftalen-2,6-diol. Tyto produkty byly nalezeny v moči a žluči a považují se za detoxikační metabolity vzniklé C-hydroxylací. Jako detoxikační jsou označeny díky jejich snadnému vyloučení<sup>30,34</sup>.

Další produkty C-hydroxylace jsou 1-(3,4'-dihydroxyfenylazo)-2-naftol (3,4'-diOH-Sudan I) a 1-(4'-fenylazo)-naftalen-2,6-diol (4',6-diOH-Sudan I). Produktem oxidačního štěpení je benzendiazoniový ion, vznikající enzymatickým štěpením azoskupiny Sudanu I, který tvoří adukty s DNA. Jako jeden z hlavních aduktů metabolismu Sudanu I byl identifikován 8-(fenylazo)guaninový adukt uvedený na obrázku 5<sup>34</sup>.

Výzkum Sudanu I prokázal jeho vliv na indukci cytochromů P450 1A a jejich aktivitu v játrech myši a potkanů, kde působí nejspíš jako ligand AhR receptoru<sup>30</sup>.



Obrázek 5: Schéma metabolismu Sudanu I, převzato z cit<sup>34</sup>.

## 2. Cíl práce

Bakalářská práce byla součástí projektu Laboratoře molekulární karcinogenese a vývoje léčiv, zabývajícího se vlivem zvýšené exprese vybraných biotransformačních enzymů na genotoxicitu benzo[a]pyrenu *in vivo*. V rámci projektu bylo potřeba porovnat změny v expresi biotransformačních enzymů v orgánech laboratorního potkana vyvolané samostatným nebo společným působením Sudanu I, jako významného induktoru CYP1A1, a BaP.

Úkolem této bakalářské práce je studium vlivu uvedených látek (BaP a Sudan I) podávaných laboratorním potkanům samostatně nebo kombinovaně na proteinovou expresi a aktivitu CYP1A1 a porovnání indukčního potenciálu jednotlivých premedikací s kontrolními vzorky z potkanů bez premedikace.

Hlavní cíle bakalářské práce:

1. Izolovat mikrosomy z jater, ledvin a plic laboratorních potkanů kontrolních a potkanů premedikovaných BaP, Sudanem I a jejich kombinacemi.
2. Pomocí imunodetekce porovnat množství CYP1A1 přítomné v izolovaných orgánech potkanů nepremedikovaných a premedikovaných BaP, Sudanem I a jejich kombinacemi
3. Stanovit specifickou aktivitu CYP1A1 v mikrosomálních frakcích získaných ze všech premedikačních skupin laboratorních potkanů

### 3. Materiály a metody

#### 3.1. Použité materiály a chemikálie

Použité chemikálie a rozpouštědla pocházejí z těchto zdrojů:

BIO-RAD, USA: Marker Precision Plus Protein Western C

Gentest BD Bioscience, USA: potkaní rekombinantní cytochrom P450 1A1 v Supersomech™

GmbG, Německo: NADPH,

Lachema/Lach-Ner, ČR: KCl, HCl, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, glycin, PONCEAU červeně, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, Sudan I, glycerol, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, kyselina octová, ethylacetát, methanol, persíran amonný, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, bromfenolová modř, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O

Linde, ČR: kapalný dusík

Penta, ČR: ethanol, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

P-lab, ČR: Triton

Serva, USA: akrylamid, bisakrylamid, dodecylsírán sodný (SDS), N,N,N',N'-tetraethylendiamin (TEMED), Coomassie Brilliant Blue R 250, Triton X-100, hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma-Aldrich, USA: APS, NBT, BCIP, kozí protilátka proti cytochromu 1A1, králíčí protilátka proti GAPDH, kuřecí protilátka proti kozímu IgG značená alkalickou fosfatázou, a kozí protilátka proti králíčímu IgG značená alkalickou fosfatásou, resorufin, 7-ethoxyresorufin,

THERMO Scientific, USA: Microplate BCA Protein Assay Kit

#### 3.2. Použité přístroje

Analytické váhy

40 SM-200 A

Pesa, Švýcarsko

Automatické pipety

Eppendorf, Německo

Nichipet EX	America, Japonsko
<u>Centrifugy</u>	
K-23, výkyvný rotor	Janetzki, Německo
K-24, úhlový rotor	Janetzki, Německo
Ultracentrifuga LE-80 K, úhlový rotor, Ti 45 a Ti 70	Beckman Coulter, USA
Centrifuga EBA 270 Hettich, výkyvný rotor	Hettich, Německo
Spectrafuge™, Mini centrifuga	Labnet, Japonsko
<u>Čistička destilované vody:</u>	
Simplicity 185	Milipore, USA
<u>Homogenizátory</u>	
Dle Pottera a Elvehjema	
<u>Inkubátory</u>	
Thermomixer Compact	Eppendorf , Německo
IR 1500	Flow Laboratories, Německo
Mini Dry Bath Incubator	MIULAB, Čína
<u>Luminiscenční spektrofotometr</u>	
LS55	Perkin Elmer USA
<u>Magnetické míchačky</u>	
KMO 2 Basic	IKA, Německo
<u>pH metr</u>	
ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou	HANNA instruments, USA



Předvážky:

KERN EW 600-2M

Kern & Sohn GmbH,  
Německo

Přístroj pro přenos proteinů na membránu

Biometra, Německo

PVDF membrána

BIO RAD, USA

Sonikátor:

ELMAsonic E 30 H

P-Lab, Česká republika

Spektrofotometry:

Sunrise Absorbance Reader

TECAN, Švýcarsko

Specord 250 PLUS

Analytik Jena AG,

Systém HPLC:

Pumpa: Dionex pump P580

ASI-100 Automated Sample Injector

UV/VIS Detector UVD 170S/340S

Degasys DG-1210 Dionex

Termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101

Předkolona: Nucleosil 100-5 C18

Kolona: Nucleosil 100-5 C18 - 250/4

Macherey-Nagel

Program: Chromeleon™ 6.11 build 490

Třepačky:

Yellow Line os basic

IKA, Německo

Vakuové odparka:

CentriVap Benchtop vakuuum concentrator

LABCONCO, USA

Vodní lázeň:

TW8 Water Bath

JULABO Labortechnik  
GmbH, Německo

### Vortex:

Vortex 3 genius	IKA, Německo
MS1 minishaker	IKA, Německo
VX-200 Lab Vortexer	LABNET, USA

### Zdroje napětí:

PowerPac™ Basic Power Supply	BIO RAD, USA
Electrophoresis Power Supply-EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech, USA

## **3.3. Použité metody**

### **3.3.1 Premedikace experimentálních zvířat**

Potkani kmene Wistar byli vystaveni účinku azobarviva Sudanu I, které bylo podáváno intraperitoneálně, benzo[a]pyrenu podávanému žaludeční sondou, a jejich kombinacím dle tabulky 2. Obě látky byly rozpuštěny v potravinářském slunečnicovém oleji. V každé premedikační skupině byli tři laboratorní potkani.

**Tabulka 2:** *Schéma aplikace látek laboratorním potkanům*

Dávka: Sudan I – 50 mg/kg váhy potkana; Benzo[a]pyren – 150 mg/kg váhy potkana

Skupina	Premedikace	1. den	2. den
S	Sud I	Olej	Sud I
B	BaP	Olej	BaP
SB	Sud I + BaP	Sud I	BaP
BS	BaP + Sud I	BaP	Sud I
K	Kontrola	Olej	Olej

Třetí den byla zvířata usmrcena a byly z nich odebrány orgány, které byly ihned zamrazeny v tekutém dusíku a uchovány při teplotě -80°C.

Experimenty byly realizovány v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (č. 409/2008 Sb.) a vyhláškou O chovu a využití pokusných zvířat č. 419/2012 Sb. v prostoru Centra pro experimentální biomodely 1. LF UK (U Nemocnice 478/5, Praha 2).

Tato experimentální část, premedikace potkanů, nebyla prováděna v rámci této bakalářské práce. Pracovalo se tedy s již odebranými orgány (plícemi, játry a ledvinami).

### **3.3.2 Izolace mikrosomů**

Izolace mikrosomů byla prvním krokem bakalářské práce. Vše se provádělo v chlazené místnosti.

Izolace byla uskutečněna ze spojených jater, ledvin nebo plic potkanů jednotlivých premedikačních skupin. Nejdříve byli zmrazené orgány nejmenno nastříhány do pufru P1 (150 mmol/l KCl, 50 mmol/l Tris, pH 7,4). Tímto pufrem byla nastříhaná tkáň několikrát promyta a přefiltrována přes gázu. Následně byla homogenizována v těsném homogenizátoru s teflonovým pístem na motorový pohon s objemem roztoku P1 odpovídajícímu čtyřnásobné hmotnosti izolovaného orgánu. Homogenát byl následně odstředěn 10 minut při 600 g (centrifuga Janetzki K-23 s výkyvným rotorem 4x 70 ml, 3000 RPM). Supernatant byl uchován na ledu a sediment byl rehomogenizován v ¼ původního objemu roztoku P1. Vzniklý homogenát byl opět zpracován za stejných podmínek, jak je uvedeno výše.

Spojené supernatanty byly odstředěny 20 minut při 15000 g (centrifuga Janetzki K-24, úhlový rotor 6x 35 ml, 13 000 RPM). Vzniklé supernatanty byly následně přelity přes sediment bez kontaminace lehce usazenou vrstvou mitochondrií.

Ze získaného supernatantu byla připravena cytosolární frakce centrifugací 65 minut při 100000 g (Centrifuga Beckman, úhlový rotor 45 Ti 6x 70 ml, 45 000 RPM). Vzniklá cytosolární frakce byla slita a peleta byla seškrábnuta špachtlí, homogenizována a resuspendována s roztokem pufru P2 (100 mmol/l Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.10 H<sub>2</sub>O, pH 7,2), jehož objem odpovídal dvojnásobku hmotnosti tkáně.

Homogenní suspenze byla opět odstředěna 65 minut při 100000 g (centrifuga Beckman, 70 Ti 8x 28 ml, 60 000 RPM). Po odstranění supernatantu byla vzniklá mikrosomální frakce seškrábnuta a homogenizována v roztoku P3 (150 mmol/l KCl, 50 mmol/l Tris, 20% glycerol, pH 7,4) s objemem odpovídajícím ¼ hmotnosti tkáně. Následně

byla mikrosomální frakce rozpipetována na alikvoty, zmražena v tekutém dusíku a uskladněna v hlubokomrazícím boxu (-80°C).

### **3.3.3 Stanovení množství proteinů**

Koncentrace proteinů v izolovaných mikrosomálních frakcích byla stanovena pomocí metody využívající bicinchoninovou kyselinu (BCA)<sup>35,36</sup>.

Tato metoda využívá schopnosti proteinů redukovat ionty  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^+$ , která je zvýrazněna reakcí s kyselinou bicinchoninovou v alkalickém prostředí za vzniku fialového komplexu, který je spektrofotometricky měřen při 562 nm. Naměřená absorbance je pak přímo úměrná koncentraci proteinů.

Nejdříve byly vzorky mikrosomálních frakcí vhodně naředěny vodou a následně zpracovány podle návodu komerčního setu Microplate BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA).

Do mikrotitrační destičky byly pipetovány vzorky v „tripletech“ (vhodně naředěné mikrosomy) a „dubletech“ (standardy). Do mikrotitrační destičky byl pipetován slepý vzorek (destilovaná voda), standardy (BSA) o koncentracích 2, 1,5, 1, 0,75, 0,5, 0,25, 0,125 mg/ml a řaděné vzorky mikrosomů o objemu 5  $\mu\text{l}$ . Následně bylo přidáno 195  $\mu\text{l}$  činidla, které bylo připraveno neprodleně před použitím. Tento roztok obsahoval 50 dílů činidla A (2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,95%  $\text{NaHCO}_3$ , 0,4%  $\text{NaOH}$ , 0,16% vínan sodno-draselný), a 1 díl činidla B (4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Dále byly vzorečky zamíchány na třepačce po dobu 1 minuty a poté byly inkubovány 30 minut při teplotě 37 °C. Po inkubaci se destička nechala 5 minut odstát při pokojové teplotě a následně byly proměřeny absorbance při vlnové délce 562 nm na přístroji Tecan Sunrise.

Z kalibrační křivky standardů byly vypočítány koncentrace proteinů v mikrosomálních frakcích jater, plic a ledvin.

### **3.3.4 Stanovení množství cytochromu P450**

Koncentrace cytochromu P450 v mikrosomálních preparátech byla stanovena pomocí absorpce komplexu cytochromu P450 v redukovaném stavu s CO při vlnové délce 450 nm<sup>37</sup>. Mikrosomální frakce byla vhodně naředěna puforem (0,1 mol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ , 20 % glycerol, pH 7,4) na celkový objem 2 ml. Následně byl přidán  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (na špičku špachtle), aby došlo k redukci. Po pěti minutách stání při laboratorní teplotě byl vzorek

rozdělen do dvou maskovaných semimikrokyvet o optické dráze 1 cm a byla změřena základní linie pomocí spektrofotometru Specord 250 plus. Obsah vzorkové kyvety byl 2 minuty probubláván oxidem uhelnatým a následně bylo proměřeno spektrum v rozsahu 400-490 nm. Ze získaných spekter byla vypočítána koncentrace cytochromu P450:

$$c_{CYP} = \frac{A_{450} - A_{490}}{\varepsilon \cdot l} * \text{ředění} \quad [c] = \mu M$$

$c_{CYP}$ : molární koncentrace cytochromu P450

$A_{450} - A_{490}$ : absorbance cytochromu P450

$l$ : optická dráha kyvety [cm]

$\varepsilon$ : molární extinkční koeficient [ $0,091 (\mu\text{mol/l})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]

### 3.3.5 SDS-PAGE elektroforéza

Použité roztoky:

**4x koncentrovaný vzorkový pufr** – 0,063 mol/l Tris/HCl, 2 % SDS (w/v), 10 % glycerol, 0,003 % bromfenolová modř, 5 % 2-merkapt ethanol (pH 6,8)

**Elektrodový pufr** – 0,192 mol/l glycin, 0,025 mol/l Tris, 0,1 % SDS (pH 8,3)

**Barvicí lázeň** – 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250 - CBBR (w/v), 46 % ethanol, 9,2 % kyselina octová

**Odbarvovací lázeň** – 10 % kyselina octová a 25 % ethanol

**Spodní separační gel (10%)** – 4 ml destilovaná voda, 3,3 ml 30% akrylamid (29 % akrylamid + 1 % bisakrylamid), 2,5 ml 1,5M Tris (pH 8,8), 100  $\mu$ l 10 % SDS, 4  $\mu$ l TEMED, 100  $\mu$ l 10 % APS

**Vrchní zaostřovací gel (4%)** – 2,2 ml destilovaná voda, 400  $\mu$ l 30 % akrylamid (29 % akrylamid, 1 % bisakrylamid), 380  $\mu$ l 1,5M Tris (pH 6,8), 30  $\mu$ l 10 % SDS, 3  $\mu$ l TEMED, 30  $\mu$ l 10 % APS

Skla a hřebeny pro elektroforézu byly umyty ethanollem. Byl připraven spodní separační gel, který byl převrstven destilovanou vodou a ponechán 30 minut stát pro ztuhnutí. Po ztuhnutí gelu byla voda odsáta filtračním papírem a byl připraven vrchní zaostřovací gel, na který byl aplikován hřeben pro vytvoření jamek, a byl ponechán stát 30 minut pro

ztuhnutí. Dále byly připraveny vzorky (mikrosomy + vzorkový pufr + destilovaná voda). Vzorky byly promíchány a povařeny (100 °C, 6 minut). Po ztuhnutí gelu byl hřeben odstraněn a vzorky byly pomocí mikrostříkačky Hamilton s tupou jehlou aplikovány po 20 µl do jamek. Množství proteinů aplikovaných na jamku bylo 75 µg.

Do připravené elektroforetické aparatury byly umístěn elektrodotový pufr a gely. Elektroforéza probíhala při napětí 200 V po dobu 70 minut, dokud čelo nedošlo na spodek gelu. Následně byl jeden gel po dobu 45 minut barven v barvicí lázni a druhý se použil pro přeblovování.

Po barvení byl gel umístěn do odbarvovací lázně, kde byl ponechán přes noc. Nakonec byly gely umístěny do destilované vody.

### **3.3.6 Metoda přenosu proteinů „Westernblotting“ a imunodetekce CYP1A1**

Použité roztoky

**Pufr PBS-Triton X100** – 0,134 mol/l NaCl, 1 mmol/l NaHPO<sub>4</sub>, 1,8 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 % Triton (pH 7,2)

**Přenosový pufr** – 0,192 mol/l glycin, 0,025 mol/l Tris (pH 8,3)

**Roztok PONCEAU** – 0,5 % PONCEAU červeň v 1% kyselině octové

**Blokovací roztok** – 5 % sušené odtučněné mléko + PBS Triton X100

**Vyvýjecí pufr ALP** – 100 mmol/l Tris/HCl, 150 mmol/l NaCl, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (pH 9)

Po ukončení elektroforézy byl gel inkubován 30 minut v přenosovém pufru.

Byla nastříhána PVDF membrána odpovídající velikosti gelu, která byla smáčena po dobu 30 sekund v methanolu, 1 minutu v destilované vodě a následně 5 minut v přenosovém pufru. V přenosovém pufru byly také smáčeny předem nastříhané chromatografické papíry (Whatman). Do blotovacího zařízení byly umístěny tři chromatografické papíry, na ně membrána, poté gel a nakonec tři chromatografické papíry. Nejdříve se blotovací zařízení zapojilo na dobu 10 minut na 0,8 mA/ 1 cm<sup>2</sup> gelu a poté na dobu 45 minut na 3,5 mA/ 1 cm<sup>2</sup> gelu.

Po blotování byla membrána pro kontrolu přenosu proteinů ponechána po dobu 20 sekund v roztoku PONCEAU. Následně byla membrána promyta destilovanou vodou a byla smáčena po dobu 1 hodiny v blokovacím roztoku. Po blokování byla membrána rozstříhnutá podle standardu molekulových hmotností (Marker Precision Plus Protein Western C) nad hodnotou 37kDa, aby jedna část membrány obsahovala CYP1A1, který má molární hmotnost přibližně 59 000 Da a druhá glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasu (GAPDH) o molekulové hmotnosti 35 600 Da. Imunodetekce GAPDH, proteinu s konstitutivní expresí, byla použita jako kontrola, zda bylo aplikováno stejné množství mikrosomálních proteinů do všech jamek. Dále byla membrána inkubována v primární protilátce - koží protilátka proti cytochromu 1A1 (ředění 1:2500) a králičí protilátka proti GAPDH (ředění 1:5000). Membrány byly ponechány v roztoku primární protilátky v chlazené místnosti přes noc.

Druhý den byly membrány promyty 4x 5 minut v blokovacím roztoku. Poté byly inkubovány po dobu 1 hodiny v sekundární protilátce. Byla použita kuřecí protilátka proti kozímu IgG značená alkalickou fosfatásou (ředění 1:5000) pro CYP1A1 a koží protilátka proti králičímu IgG (ředění 1:20000) pro GAPDH. Následně byla membrána promyta 2x 5 minut v blokovacím roztoku, 2x 5 minut v pufru PBS-Triton X100 a 5 minut v destilované vodě.

Na závěr byla membrána vložena do vyvíjecího roztoku (5 ml pufr ALP, 33 µl NBT, 16,5 µl BCIP) a ponechána inkubovat dokud se na membráně neobjevily proužky detekovaných proteinů. Reakce byla zastavena vložení membrány do destilované vody. Intenzita proužků byla vyhodnocena programem ImageJ.

### **3.3.7 Oxidace Sudanu I – stanovení aktivity CYP1A1**

Ke stanovení specifické aktivity CYP1A1 byla použita metoda oxidace Sudanu I jako „markerového“ substrátu tohoto enzymu<sup>38</sup>. Byly použity jaterní mikrosomy z premedikovaných potkanů. Inkubační směsi o celkovém objemu 500 µl byly připraveny ve dvou paralelních vzorcích ve skleněných zkumavkách.

Složení inkubačních směsí bylo následující:

- 50mM fosfátový pufr (pH 7,4)
- 1 mmol/l NADPH (zásobní roztok 10mM)
- 0,1 mmol/l Sudan I (zásobní roztok 5mM v methanolu)
- Jaterní mikrosomy o koncentraci proteinů 0,5 mg/ml

Reakce byla zahájena přidáním 50  $\mu\text{l}$  1mM roztoku NADPH do každé směsi a inkubace probíhala 30 minut při teplotě 37  $^{\circ}\text{C}$  za třepání. Kontrolní inkubační směs neobsahovala NADPH, obsahovala pouze fosfátový pufr, Sudan I a mikrosomy.

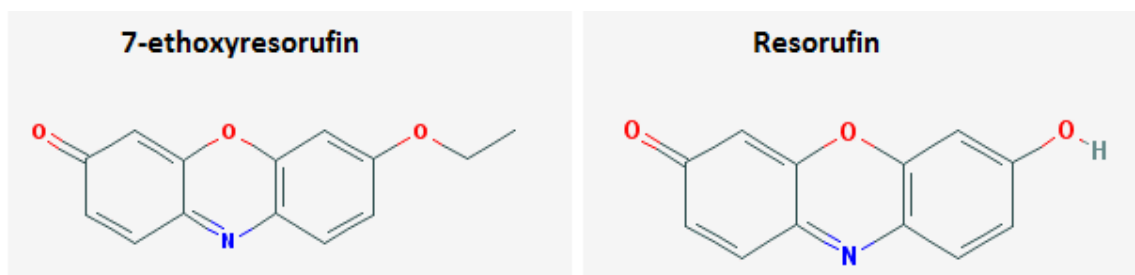
Probíhající reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a intenzivním protřepáním. Poté byla směs odstředěna 5 minut při 3000 RPM. Vrchní organická část byla odebrána kapátkem a zbytek vzorku byl znovu extrahován do 900  $\mu\text{l}$  ethylacetátu. Následně byly vzorky odpařeny ve vakuové odparce. Vzorky byly před analýzou HPLC rozpuštěny v 30  $\mu\text{l}$  methanolu a stočeny na mikrocentrifuze.

Metabolity byly separovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s UV/VIS detekcí. Nástřik na kolonu (Nucleosil 100-5 C18 - 250/4, Macherey-Nagel) činil 20  $\mu\text{l}$ . Složení mobilní fáze bylo 0,1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 8,5) a methanol v poměru 1:9. Mobilní fáze byla před použitím sonikována. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou byla nastavena na 0,7 ml/min. Detekce metabolitů probíhala při vlnové délce 480 nm.

Množství C-hydroxylovaných produktů bylo z chromatogramů vyhodnoceno pomocí kalibrační křivky jednotlivých metabolitů Sudanu I.

### 3.3.8 *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu – stanovení aktivity CYP1A

*O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu (EROD) aktivita byla použita jako „markerová“ reakce pro sledování aktivity enzymů podrodiny CYP1A (CYP1A1 a CYP1A2). Tyto enzymy jsou hlavními enzymy, které katalyzují deethylaci 7-ethoxyresorufinu na jeho fluorescenční produkt resorufin<sup>39</sup>. Struktura resorufinu a 7-ethoxyresorufinu je znázorněna na obrázku 6. Ke stanovení *O*-deethylační aktivity byly použity jaterní mikrosomy z premedikovaných potkanů.



Obrázek 6: Struktura ethoxyresorufinu a resorufinu, převzato z cit<sup>40,41</sup>



Složení inkubační směsi bylo následující:

- 100 mmol/l fosfátový pufr (pH 7,4)
- 2 mmol/l 7-ethoxyresorufin (zásobní roztok 0,2mM v methanolu)
- 0,5 mmol/l NADPH (zásobní roztok 5mM)
- Vhodně naředěné mikrosomy o různých koncentracích, viz níže

Mikrosomy byly naředěny pufrům tak, aby enzymová reakce probíhala kinetikou 0. řádu a nárůst fluorescence způsobený tvorbou produktu byl v čase lineární. Koncentrace proteinů kontrolních mikrosomů činila 0,5 mg/ml. Mikrosomální frakce z potkanů premedikovaných BaP musela být kvůli vysoké fluorescenci produktu ředěna na koncentraci 0,0025 mg/ml u premedikací SudI, SudI+BaP a BaP+SudI na koncentraci přibližně 0,0017 mg/ml. Ze vzorkového pufru, vhodně naředěných mikrosomů a 7-ethoxyresorufinu byla nejprve připravena preinkubační směs pro tři paralelní měření na každý vzorek mikrosomální frakce. Směs byla po zamíchání ponechána 10 minut inkubovat při 37°C a poté rozpipetována po 180  $\mu$ l do tří jamek mikrotitrační destičky. Ke každému vzorku bylo přidáno 20  $\mu$ l 0,5mM NADPH. Ihned byla měřena fotoluminiscence resorufinu (Luminiscence Spectrometr Pelkin Elmer LS-55) po dobu 10 minut v jednodominutových intervalech při excitační a emisní vlnové délce 530 nm a 585 nm. Množství resorufinu bylo odečteno z kalibrační křivky naměřené pro kalibrační roztoky resorufinu (0, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 60, 80, 100, 120, 160 pmol/jamka) připravené z 10 $\mu$ M zásobního roztoku resorufinu v methanolu ředěním vzorkovým pufrům.

## **4. Výsledky**

### **4.1. Charakterizace izolovaných mikrosomů**

Mikrosomální frakce získané izolací z jater, plic a ledvin laboratorních potkanů kontrolních a premedikovaných benzo[a]pyrenem, Sudanem I a jejich kombinacemi byly charakterizovány z hlediska koncentrací proteinů a obsahu cytochromu P450 (tabulka 3, strana 35). Důležitou charakteristikou získaných mikrosomálních frakcí je specifický obsah cytochromů v mikrosomální frakci. Pro jeho výpočet bylo potřeba určit koncentraci cytochromů (měření absorpčních spekter redukováného CYP s CO, viz kapitola 3.3.4 str. 28) a koncentraci proteinů (metodou BCA, viz kapitola 3.3.3 str. 28).

**Tabulka 3:** *Koncentrace proteinů, koncentrace CYP a specifický obsah CYP v mikrosomálních frakcích z jater, plic a ledvin potkanů kontrolních a premedikovaných benzo[a]pyrenem, Sudanem I a jejich kombinacemi*

	Premedikace	C <sub>prot.</sub> [mg/ml]	c <sub>CYP</sub> [μmol/l]	Specifický obsah CYP [nmol <sub>CYP</sub> /mg <sub>prot.</sub> ]
Játra	Kontrola	11,8	8,44	0,72
	BaP	8,40	23,30	2,77
	SudI	19,2	27,21	1,42
	SudI+ BaP	13,1	12,84	0,98
	BaP+SudI	20,9	40,00	1,91
Plíce	Kontrola	7,30		
	BaP	6,90		
	SudI	7,20		
	SudI+ BaP	4,80		
	BaP+SudI	6,10		
Ledviny	Kontrola	4,40	0,44	0,10
	BaP	8,20	2,53	0,31
	SudI	4,10	0,84	0,20
	SudI+ BaP	0,81	0,22	0,27
	BaP+SudI	4,00	0,59	0,15

C<sub>prot.</sub> ... koncentrace proteinů v mikrosomální frakci, c<sub>CYP</sub> ... koncentrace aktivní formy cytochromu P450.

Při stanovení koncentrace CYP bylo u jaterních vzorků pozorováno maximum absorbance při vlnové délce 450 nm, což odpovídá detekci aktivní formy cytochromu P450. U ledvinných vzorků byla ovšem maximální absorbance naměřena při vlnové délce 420 nm, což mohlo být způsobeno tím, že velká část obsažených cytochromů P450 byla

pravděpodobně v neaktivní formě (tzv. cytochrom P420), která vzniká strukturní změnou enzymu. Tato změna se projeví právě posunem absorpčního maxima komplexu redukovaného CYP s oxidem uhelnatým z hodnoty 450 nm na 420 nm<sup>37</sup>. V plicích mikrosomálních vzorcích se nepodařilo obsah cytochromů P450 určit, neboť nebyly neměřeny žádné rozdíly ve spektrech mikrosomálních vzorků před a po probublávání CO.

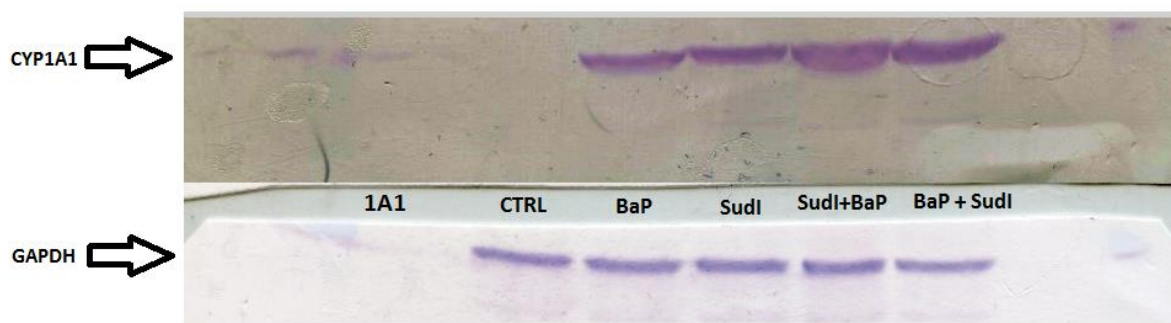
Z porovnání specifického obsahu CYP v mikrosomální frakci jater a ledvin je patrné, že množství cytochromu v jaterní frakci je několikanásobně vyšší. Z tabulky 3 (str. 35), můžeme vyčíst, že nejvyšší hodnota specifického obsahu byla zjištěna u mikrosomálních frakcí jater premedikovaných samotným benzo[a]pyrenem, kdy nárůst oproti kontrole byl až čtyřnásobný. U kombinovaných premedikací je specifický obsah CYP až 3x větší v jaterních mikrosomech potkanů, kterým byl benzo[a]pyren podáván před Sudanem I. U druhé kombinované premedikace byl nárůst oproti kontrole pouze 1,5x větší.

Ze stanovení specifického obsahu CYP vyplývá, že dostatek cytochromu P450 se v aktivní formě vyskytoval pouze v jaterních mikrosomech. Proto v nich mohla být dále kromě exprese studována i aktivita CYP1A1. Vzhledem k nízkému obsahu aktivního cytochromu P450 v ledvinách a jeho nedetekovatelnému obsahu v plicích byla ke zjištění změny exprese CYP1A1 použita v ledvinách a plicích vzorcích pouze metoda Westernblot s následnou imunodetekcí.

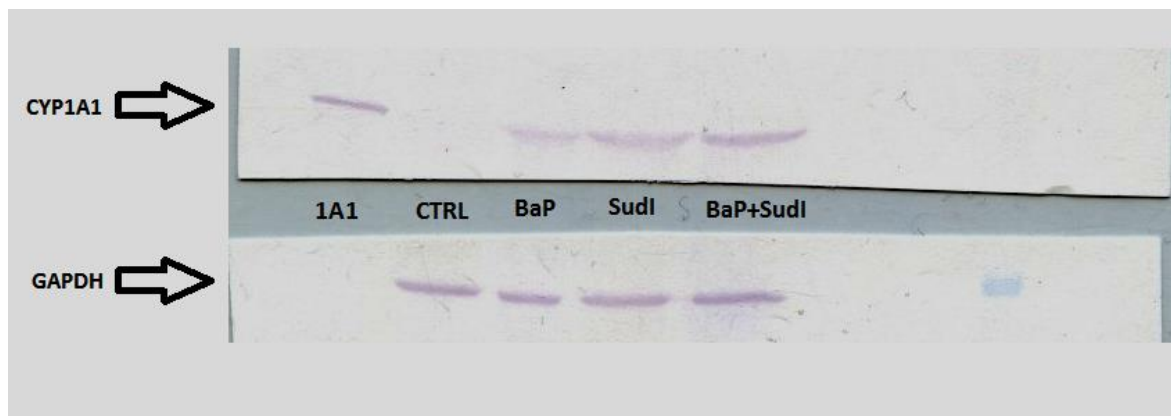
## **4.2. Imunodetekce CYP 1A1**

Nejprve byly proteiny z mikrosomálních frakcí rozděleny v SDS-polyakrylamidovém gelu podle molekulových hmotností. Po přenosu proteinů na PVDF membránu metodou Western blot bylo následnou imunodetekcí polyklonální protilátkou proti CYP1A1 zjištěno relativní zastoupení CYP1A1 v játrech, ledvinách a plicích jednotlivých premedikačních skupin potkanů.

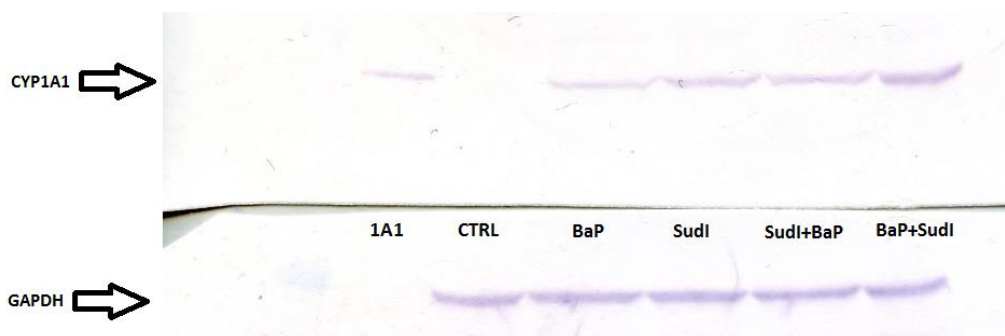
Jako kontrola stejné nanášky proteinů z každého mikrosomálního vzorku do jamek gelu při SDS-PAGE byla použita glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH), která je v buňkách produkována konstitutivně. Na obrázcích 8, 9 a 10 (str. 37) jsou zobrazeny vyvolané membrány pro jednotlivé mikrosomální frakce izolované z jater, plic a ledvin.



Obrázek 7: Imunodetekce CYP1A1 v mikrosomálních frakcích jater potkanů kontrolních (CTRL) a premedikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), Sudanem I (SudI) a jejich kombinacemi (BaP+SudI, SudI+BaP), 1A1 odpovídá standardu potkaního rekombinantního CYP1A1 v Supersomech<sup>TM</sup>



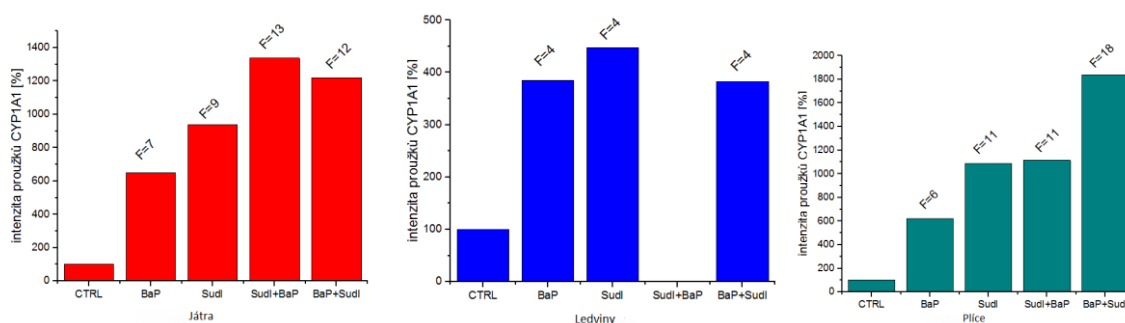
Obrázek 8: Imunodetekce CYP1A1 v mikrosomálních frakcích ledvin potkanů kontrolních (CTRL) premedikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), Sudanem I (SudI) a jejich kombinacemi (BaP+SudI, SudI+BaP), 1A1 odpovídá standardu potkaního rekombinantního CYP1A1 v Supersomech<sup>TM</sup>



Obrázek 9: Imunodetekce CYP1A1 v mikrosomálních frakcích plic potkanů kontrolních (CTRL) premedikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), Sudanem I (SudI) a jejich kombinacemi (BaP+SudI, SudI+BaP), 1A1 odpovídá standardu potkaního rekombinantního CYP1A1 v Supersomech<sup>TM</sup>

Mikrosomální vzorky ledvin z potkanů premedikovaných kombinací SudI+BaP nebyly použity k imunodetekci z důvodu nízké koncentrace proteinů a nedostatku daného vzorku.

Membrány byly vyhodnoceny pomocí programu ImageJ, ve kterém byla zjištěna intenzita jednotlivých proužků detekovaných proteinů (obrázek 10). Hodnoty intenzit byly vztaheny ke vzorkům z kontrolních potkanů, ve kterých bylo nalezenému množství CYP1A1 přiřazeno zastoupení 100%.



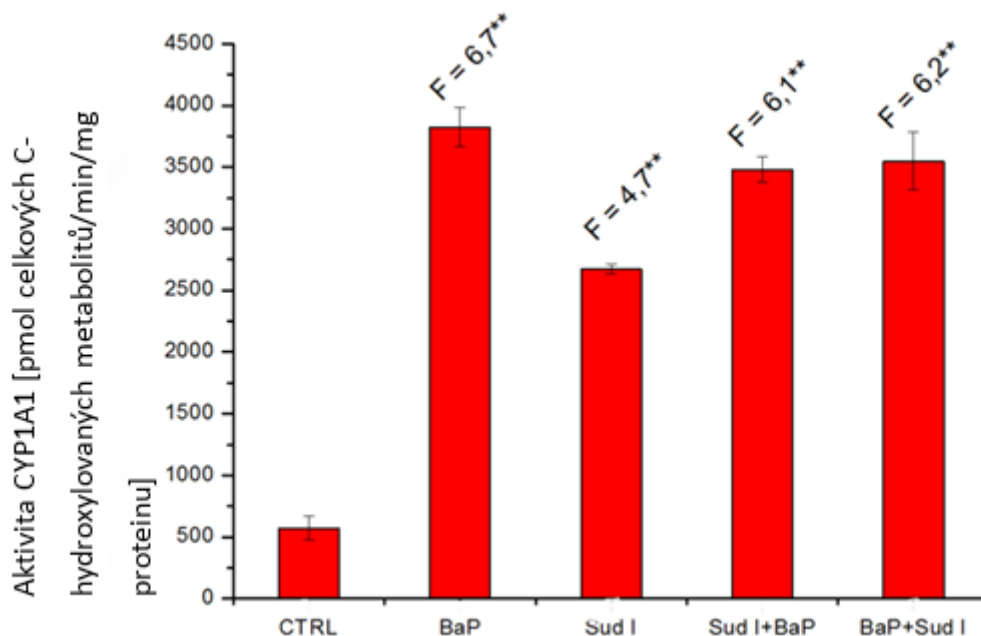
Obrázek 10: Expze CYP1A1 v jaterních, ledvinných a plicních mikrosomech potkanů kontrolních (CTRL) a premedikovaných studovanými látkami - benzo[a]pyren (BaP), Sudan I (SudI) a jejich kombinacemi (SudI+BaP, BaP+SudI). Hodnoty intenzit jsou vztaheny ke kontrolní skupině (100%). „F“=nárůst aktivity CYP1A1 oproti kontrole.

Z obrázků 7-10 je patrné, že k nárůstu expze CYP1A1 došlo u všech premedikací ve všech orgánech, přičemž výraznější změny byly vidět v játrech a plicích. U jaterních mikrosomů byl sledován vyšší indukční vliv kombinované premedikace před samostatně podávanými látkami. V ledvinných mikrosomech byl detekován u všech premedikací stejný nárůst. V plicních mikrosomech byl zaznamenán v porovnání se samostatným působením BaP anebo SudI až aditivní nárůst proteinové expze CYP1A1 po kombinovaném podání benzo[a]pyrenu před Sudanem I.

### 4.3. Stanovení aktivity CYP1A1 oxidací Sudanu I

Pro sledování aktivity CYP1A1 v mikrosomálních frakcích byla použita metoda oxidace Sudanu I, který je specifickým substrátem CYP1A1<sup>38</sup>. Vzhledem k nízkým hodnotám specifických obsahů CYP mikrosomálních frakcích ledvin a plic (viz tabulka 3, str. 35), byly pro stanovení specifické aktivity CYP1A1 použity pouze jaterní mikrosomální

frakce. Metabolity byly detekovány pomocí metody HPLC s UV-detekcí (postup viz kapitola 3.3.7 str. 31) v programu Chromeleon™ 6.11 build 490. Na obrázku 11 jsou vyhodnoceny aktivity CYP1A1 v jednotlivých jaterních mikrosomálních frakcích.



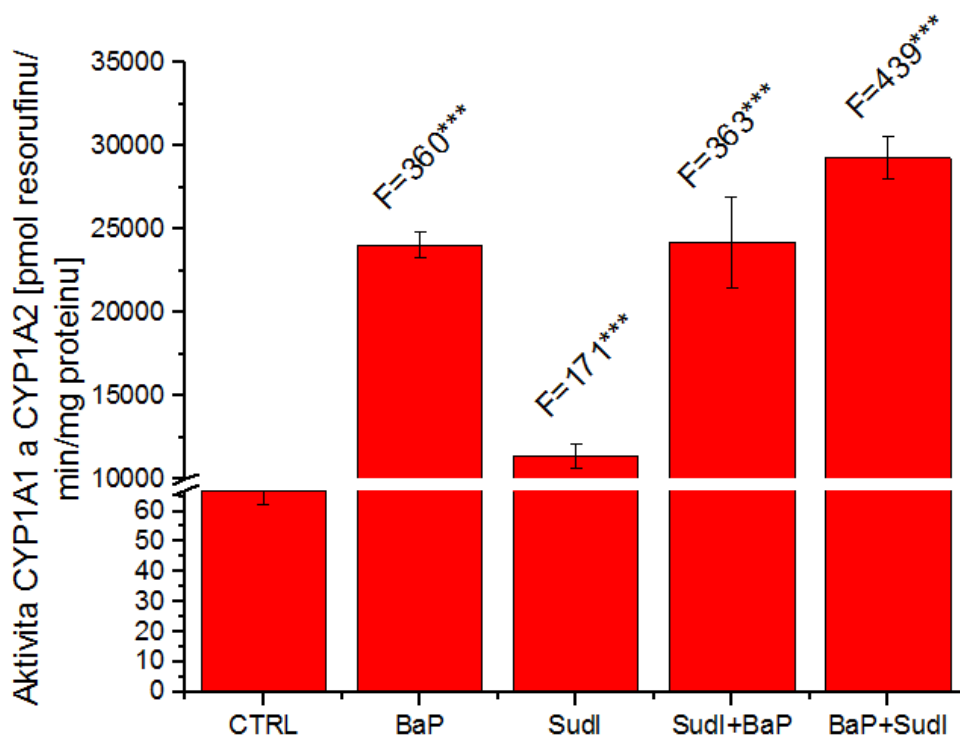
Obrázek 11: Specifická aktivita CYP1A1 v jaterních mikrosomálních frakcích potkanů kontrolních (CTRL) a premdikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), Sudanem I (SudI) nebo jejich kombinacemi (SudI+BaP a BaP + SudI). Specifická aktivita CYP1A1 byla stanovena pomocí oxidace Sudanu I. Statistická významnost výsledků byla vyhodnocena pomocí T-testu (dvě paralelní měření). „F“ = nárůst aktivity CYP1A1 oproti kontrole. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  a \*  $p < 0,05$ .

Jak samostatná tak kombinovaná aplikace studovaných látek vedla u laboratorních potkanů k významnému nárůstu tvorby hydroxylovaných metabolitů při oxidaci Sudanu I jaterními mikrosomy. Indukční potenciál BaP na aktivitu CYP1A1 byl vyšší než indukční potenciál Sudanu I. Vliv BaP na aktivitu CYP1A1 byl velmi podobný jak v případě samostatného podání tak při jeho aplikaci v obou kombinacích se SudI.

#### 4.4. Stanovení aktivity CYP1A metodou EROD

7-Ethoxyresorufin-*O*-deethylasová (EROD) aktivita byla použita jako „markerová“ reakce pro sledování aktivity CYP1A1 společně s CYP1A2. Oba tyto enzymy katalyzují deethylaci 7-ethoxyresorufinu na jeho fluorescenční produkt resorufin.

Vzhledem k nízkým hodnotám koncentrací CYP v mikrosomálních frakcích ledvin a plic (tabulka 3, str. 35), byly pro stanovení specifické aktivity CYP1A1 opět použity jen jaterní mikrosomální frakce. Nárůst fluorescence resorufinu byl měřen na fluorimetru Luminiscence Spectrometr Pelkin Elmer LS-55 pomocí programu FL WINLAB. Na obrázku 12 jsou zobrazeny aktivity CYP1A v jednotlivých mikrosomálních frakcích jater kontrolních a premedikovaných potkanů.



Obrázek 12: Specifická aktivita CYP1A1 a CYP1A2 v jaterních mikrosomech potkanů kontrolních (CTRL) a premedikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), Sudanem I (SudI) nebo jejich kombinacemi (SudI+BaP a BaP + SudI). Specifická aktivita CYP1A1 a CYP1A2 byla stanovena měřením *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu. Statistická významnost výsledků byla vyhodnocena pomocí *T*-testu (tři paralelní měření). „*F*“ = nárůst aktivity CYP1A oproti kontrole. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  a \*  $p < 0,05$ .

Výsledky ukazují, že ve srovnání s kontrolní skupinou byla *O*-deethylasová aktivita CYP1A1 a CYP1A2 signifikantně indukována u všech premedikovaných potkanů. K největšímu nárůstu aktivity došlo při podání BaP před Sudanem I. Stejně jako při měření aktivity CYP1A1 metodou oxidace Sudanu I byla nejmenší změna naměřena v jaterních mikrosomech potkanů premedikovaných Sudanem I.



## 5. Diskuse

V rámci bakalářské práce byl studován vliv benzo[a]pyrenu a Sudanu I podávaných laboratorním potkanům samostatně nebo společně v různém pořadí aplikace na míru proteinové exprese a enzymovou aktivitu cytochromu P450 1A1. Mikrosomální frakce izolované z jater, ledvin a plic potkanů kontrolních, nepremedikovaných, a premedikovaných BaP, Sudanem I či jejich kombinacemi byly nejprve charakterizovány z hlediska obsahu celkového cytochromu P450. Ve všech skupinách premedikovaných potkanů byly v porovnání se vzorky z kontrolních zvířat zjištěny zvýšené hodnoty specifického obsahu CYP, což poukazuje na nárůst množství některých izoform tohoto enzymu.

Pomocí imunodetekce specifickou protilátkou proti potkanímu CYP1A1 bylo zjištěno, že vlivem BaP a Sudanu I podávaných jak samostatně tak v kombinaci dochází k viditelnému zvýšení exprese CYP1A1 ve všech studovaných orgánech. Vzhledem k tomu, že CYP1A1 je primárně extrahepatálním enzymem<sup>20</sup>, byla v kontrolních vzorcích jater nalezena jen velmi nízká hladina CYP1A1, které odpovídal na membráně velmi slabý proužek detekovaného CYP1A1. K nejvyššímu nárůstu množství CYP1A1 došlo v játrech a plicích potkanů premedikovaných oběma látkami. V ledvinných vzorcích byl oproti tomu indukční vliv jednotlivých premedikací stejný. Již dříve byl prokázán významný indukční vliv obou studovaných látek i na genovou expresi CYP1A1, a to jak v případě samostatného tak kombinovaného podání. Ve všech případech docházelo k významnému zvýšení množství mRNA pro CYP1A1<sup>42</sup>. Výsledky z genové a proteinové exprese CYP1A1 mohou společně potvrzovat schopnost BaP a Sudanu I vázat se na Ah receptor, který je zodpovědný za indukci exprese CYP1A1<sup>3</sup>.

V jaterních mikrosomálních frakcích byla v jednotlivých premedikačních skupinách potkanů porovnávána i aktivita CYP1A1. Trend vlivu jednotlivých premedikací na specifickou enzymovou aktivitu byl stejný jak při měření oxidace Sudanu I, „markerového“ substrátu CYP1A1, tak *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu, „markerového“ substrátu pro oba cytochromy podrodiny CYP1A (CYP1A1 a CYP1A2). K nejnižšímu, nicméně statisticky významnému, zvýšení aktivity došlo v jaterních mikrosomech potkanů premedikovaných samotným Sudanem I. K vyššímu nárůstu specifické aktivity CYP1A1 nebo CYP1A1/2 došlo v jaterních mikrosomech potkanů premedikovaných samotným BaP nebo kombinacemi BaP a Sudanu I, mezi kterými se hodnoty jednotlivých specifických aktivit

výrazně nelišily. Nezanedbatelný vliv na změny v měřených aktivitách může ovšem mít obsah aktivních forem CYP přítomných v mikrosomálních frakcích jater potkanů z jednotlivých premedikačních skupin. Při přepočtu specifických aktivit na aktivity vztažené na množství CYP v reakční směsi je v obou měřených reakcích výrazně nejúčinnější mikrosomální frakce z jater potkanů premedikovaných nejdříve Sudanem I a pak BaP. To odpovídá i nejvyšší míře proteinové exprese CYP1A1 v játrech potkanů premedikovaných Sudanem I před BaP nalezené metodou imunodetekce. Důvod rozdílu indukčního vlivu jednotlivých premedikací na enzymovou aktivitu, který se u stanovení EROD a oxidace Sudanu I lišil o dva řády, lze ze získaných výsledků těžko odhadovat. Na výraznější změny při *O*-deethylaci 7-ethoxyresorufinu může mít podíl společná účast izoformy CYP1A2 na této reakci.

CYP1A1 přeměňují širokou řadu látek s karcinogenními vlastnostmi a indukce tohoto enzymu může vést k interakci s jinými xenobiotiky<sup>43</sup>. Jedním z důvodů vzniku nádorového bujení je tvorba kovalentních aduktů chemických karcinogenů s DNA, která je podmíněná jejich metabolickou aktivací<sup>44</sup>. Takovými karcinogenními látkami, které způsobují vznik rakoviny, jsou i sloučeniny popsány v této práci – prokázaný lidský karcinogen benzo[*a*]pyren<sup>26</sup> a Sudan I, který je prokázaným karcinogenem u laboratorních potkanů, myši a králíků<sup>6</sup>. CYP1A1 hraje velmi důležitou roli při biotransformaci benzo[*a*]pyrenu i Sudanu I. Sudan I může být za účasti CYP1A1 aktivován na reaktivní metabolit schopný se kovalentně vázat na DNA<sup>22</sup>. Navíc Sudan I působí jako významný induktor exprese a aktivity podrodiny CYP1A na proteinové úrovni v játrech, plicích a ledvinách potkanů<sup>26</sup>. Stejným způsobem zasahuje do svého metabolismu benzo[*a*]pyren, který je také prokázaným induktorem CYP1A<sup>26</sup>. Prozatím není známa výsledná role CYP1A1 v jeho metabolismu. Studie prováděné *in vitro* ukazují, že se CYP1A1 podílí na aktivaci BaP, která vede přes epoxid, dihydrodiol až k tvorbě reaktivních derivátů benzo[*a*]pyrenu, schopných tvořit kovalentní adukty s DNA<sup>45</sup>. Výsledky experimentů prováděných *in vivo* na myších s deletovaným genem pro NADPH:cytochrom P450 reduktasou však ukazují, že CYP1A1 hraje detoxikační roli při přeměně BaP<sup>27</sup>. Novější studie opět prokázaly, že CYP1A1 hraje v lidských játrech jak aktivační tak detoxikační roli<sup>46</sup>.

Výsledky bakalářské práce potvrzují indukční vliv BaP i Sudanu I na expresi CYP1A1 na proteinové úrovni a ukazují, že vystavení organismu oběma látkám najednou

může vést k významným změnám v expresi CYP1A1, a tím k většímu vzájemnému ovlivnění jejich genotoxického potenciálu zvýšenou aktivitou enzymu podílejícího se na jejich aktivaci či detoxikaci.

## 6. Závěr

V rámci této bakalářské práce byly izolovány a charakterizovány mikrosomální frakce z jater, ledvin a plic potkanů kontrolních a premedikovaných benzo[a]pyrenem, Sudanem I a jejich kombinacemi. Mikrosomy byly charakterizovány stanovením specifického obsahu cytochromu P450 a pomocí imunodetekce protilátkou proti CYP1A1. Specifická aktivita CYP1A1 v játrech byla stanovena jak metodou oxidace Sudanu I, tak měřením *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu. Všechny premedikace vedly ke zvýšené expresi CYP1A1 v jednotlivých orgánech laboratorních potkanů.

V játrech a plicích byl pozorován vyšší nárůst exprese CYP1A1 v případě kombinované aplikace obou látek, zatímco v ledvinách nebyl detekovaný žádný významný rozdíl v indukčním potenciálu jednotlivých premedikací. V mikrosomálních frakcích z jater byla aktivita CYP1A1 významně zvýšena jak při samostatném tak kombinovaném podání obou studovaných látek.

## 7. Seznam použité literatury

1. Stratil, P. & Kubáň, V. Chem. Listy. **98**, 379–387 (2004).
2. Česká republika a rakovina v číslech » Linkos.cz. Dostupné z:  
<http://www.linkos.cz/co-musite-vedet/ceska-republika-a-rakovina-v-cislech/>. (5. května 2016)
3. Knejzlík, Z., Káš, J. & Ruml, T. Chem. Listy. **94**, 913–914 (2000).
4. Stiborová, M. & Mikšanová, M. Živa. **4**, 146–148 (1999).
5. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P. & Frei, E. Chem. Listy. **93**, 229–237 (1999).
6. IARC Monograph. Agents Classified by the IARC. (2016), dostupné z:  
<http://monographs.iarc.fr/> (27. dubna 2016).
7. Knejzlík, Z. & Ruml, T. Chem. listy. **93**, 607–615 (1999).
8. Stiborová, M. Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace.  
Dostupné z: <http://docplayer.cz/4300408-Studium-enzymu-biotransformujicichxenobiotika-jako-nastroj-k-poznani-mechanismu-pusobeni-karcinogenu-a-konstrukce-kancerostatik-nove-generace.html> (25. dubna 2016).
9. Meunier, B., de Visser, S. P. & Shaik, S. Chem. Rev. **104**, 3947–3980 (2004).
10. Nebert, D. W. & Russell, D. W. The Lancet. **360**, 1155–1162 (2002).
11. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J. & Martínek, V. Chem. Listy. **98**, 876–890 (2004).
12. Zanger, U. M. & Schwab, M. Pharmacology & Therapeutics. **138**, 103–141 (2013).
13. Omura, T. & Sato, R. J. Biol. Chem. **239**, 2370–2378 (1964).
14. Anzenbacher, P. & Anzenbacherová, E. Cellular and Molecular Life Sciences. **58**, 737–747 (2001).
15. Uno, S., Dalton, T. P., Dragin, N., Curran, Ch. P., Derkenne, S., Miller, M. L., Shertzer, H. W., Gonzales, F. J. & Nebert, D. W. Mol. Pharm. **69**, 1103–1114 (2006).

16. Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J. & Raunio, H. Arch. Toxicol. **82**, 667–715 (2008).
17. Rendic, S. & Guengerich, F. P. Chem. Res. Toxicol. **25**, 1316–1383 (2012).
18. Peterson, D. D., McKinney, C. E., Ikeya, K., Smith, H. H., Bale, A. E., McBride, O. W. & Nebert, D. W. Am. J. Hum. Genet. **48**, 720–725 (1991).
19. Lewis, D. F. V., Lake, B. G., George, S. G., Dickins, M., Eddershaw, P. J., Tarbit, M. H., Beresford, A. P., Goldfarb, P. S. & Guengerich, F. P. Toxicology. **139**, 53–79 (1999).
20. Walsh, A. A., Sklarz, G. D. & Scott, E. E. J. Biol. Chem. **288**, 12932–12943 (2013).
21. Mercurio, M. G., Shiff, S. J., Galbraight, R. A. & Sassa, S. Bioch. Biophys. Res. Comm. **210**, 350–355 (1995).
22. Meng, Fan-dong, Sui, Cheng-guang, Tian, Xin & Jiang, You-hong. Sci. Rep. **5** 1–6 (2015).
23. Sachse, Ch., Brockmöller, J., Bauer, S. & Roots, I. J. Clin. Pharm. **47**, 445–449 (1999).
24. Sudip, K. S., Singh, O. V., & Jain, R. K. TRENDS in biotechnology. **20**, 243 – 248 (2002).
25. Benzo(a)pyren, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk. (2012).
26. Stiborová, M., Moserová, M., Černá, V., Indra, R., Dračínský, M., Šulc, M., Henderson, C. J., Wolf, C. R., Schmeiser, H. H., Phillips, D. H., Frei, E. & Artl, V. M. Toxicology. **318**, 1–12 (2014).
27. Artl, V. M., Poirier, M. C., Sykes, S. E., John, K., Moserová, M., Stiborová, M., Wolf, C. R., Henderson, C. J. & Phillips, D. H. Tox. Let. **213**, 160–166 (2012).
28. Barhoumi, R., Mouneimne, Y., Ramos, E., v, Hammock, B. D., Safe, S., Parrish, A. R., & Burghardt, R. C. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1–29 (2009).
29. Chung, K.T. & Stevens, S. E, Jr. Environ. Toxicol. Chem. **12**, 2121–2132 (1993).

30. Stiborová, M., Dračínská, H., Martínek, V., Svášková, D., Hodek, P., Milichovský, J., Hejduková, Ž., Brotánek, J., Schmeiser, H. H. & Frei, E. *Chem. Res. Toxicol.* **26**, 290–299 (2013).
31. Sudan I, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Some aromatic azo compounds. **Vol. 8**, 225–232 (1975).
32. Sudan I. *Wikipedia, the free encyclopedia* (2016).
33. The EFSA Journal. **263**, 19–23 (2005).
34. Stiborová, M., Martínek, V., Hodek, P., Dračínský, M., Cvačka, J., Schmeiser, H. H. & Frei, E. *Interdiscip. Toxicol.* **2**, 195–200 (2009).
35. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85 (1985).
36. Wiechelman, K. J., Braun, R. D. & Fitzpatrick, J. D. *Anal. Biochem.* **175**, 230–231 (1988).
37. Omura, T. & Sato, R. J. *Biol. Chem.* **239**, 2379–2385 (1964).
38. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, Helena, Hodek, P. & Frei, E. *Cancer. Res.* **62**, 5678–5684 (2002).
39. Burke, M. D. & Mayer, R. T. *Drug Metab. Dispos.* **2**, 583 (1974).
40. 7-Ethoxyresorufin | C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> - PubChem. Available at:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7-Ethoxyresorufin#section=Top>.  
(Accessed: 9th May 2016)
41. Resorufin | C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub> - PubChem. Available at:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resorufin#section=Top>. (Accessed: 9th May 2016)
42. Gajdík, Z. *Bakalářská práce.* (2015).

43. Ma, Q. & Lu, A. Y. H. *Drug Metab. Dispos.* **35**, 1009–1016 (2007).
44. Artl, V. M., Poirier, M. C., Sykes, S. E., John, K., Moserová, M., Stiborová, M., Wolf, C. R., Henderson, C. J. & Phillips, D. H. *Toxicol. Lett.* **213**, 160–166 (2012).
45. Artl, V. M., Stiborová, M., Henderson, C. J., Theimann, M., Frei, E., Aimová, D., Singh, R., Gamboa da Costa, G., Schmitz, O., Farmer, P. B., Wolf, C. R. & Phillips, D. H. *Carcinogenesis*. **29**, 656–665 (2008).
46. Šulc, M., Indra, R., Moserová, M., Schmeiser, H. H., Frei, E., Artl, V. M. & Stiborová, M. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **57**, 229–235 (2016).



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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka