

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Zuzana Klusoňová

Vliv vybraných endokrinních disruptorů na cytochromy P450 1A1 a 2C

The effect of selected endocrine disruptors on the cytochromes P450 1A1 and 2C

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: **RNDr. Lucie Bořek-Dohalská, Ph.D.**

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky **RNDr. Lucie Bořek-Dohalské, Ph.D.** a že jsem všechny literární prameny a informační zdroje, které jsem v práci použila, řádně citovala.

V Praze dne.....

Podpis.....

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lucii Bořek-Dohalské, Ph.D. za laskavé jednání, trpělivost, ochotu a čas, který mi věnovala po celou dobu naší spolupráce a za cenné připomínky a rady, které mi poskytla při sepisování této práce. Mé poděkování patří také RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D. za pomoc při experimentální práci a Mgr. Františku Bártovi za všestrannou pomoc a užitečné poznámky při měření na HPLC.

Ráda bych poděkovala také své kolegyni Sandře Kleinové za spolupráci a podporu v laboratoři. V neposlední řadě děkuji celé laboratoři 219 a 221 za ochotné zodpovídání dotazů a pomoc při experimentální práci.

Abstrakt

Mnohé v současnosti produkované chemické látky patří do skupiny tzv. endokrinních disruptorů (ED). Jde o sloučeniny vykazující exogenní hormonální aktivitu. Ty zpravidla působí jako antagonisté nebo agonisté endogenních hormonů. Mezi zástupce exogenních ED studovaných v této práci patří 17 α -ethinylestradiol (EE2) a benzo[a]pyren (BaP). Pro srovnání byl navíc zařazen 17 β -estradiol (E2), jako zástupce látky endogenního typu.

V bakalářské práci byl studován vliv těchto endokrinních disruptorů a jejich kombinací na expresi a specifické aktivity cytochromů P450 (CYP) 1A1 a 2C. V rámci této práce byla izolována mikrosomální frakce (MF) jater, ledvin a plic potkanů nepremedikovaných a premedikovaných uvedenými sloučeninami. Ve vzorcích MF byla stanovena míra exprese CYP metodou Western blot a pomocí přeměny specifických substrátů uvedených izoform CYP stanovena jejich aktivita. Bylo potvrzeno, že BaP indukuje expresi CYP1A1 ve všech zmiňovaných orgánech a to i v kombinaci s exogenním EE2 a endogenním E2. Avšak samotný EE2 a E2 míru exprese tohoto enzymu prakticky neovlivňuje. Dále bylo zjištěno, že dochází k mírnému zvýšení exprese i specifické aktivity CYP2C11 u vzorků mikrosomální frakce jater potkanů premedikovaných EE2 a jeho kombinací s BaP. Premedikace laboratorního potkana BaP významně zvyšuje expresi CYP2C11 u vzorků mikrosomální frakce ledvin. V případě aktivity CYP2C6 bylo zjištěno, že působení E2, EE2 a jejich kombinace vede k mírnému zvýšení jeho aktivity, naproti tomu BaP a kombinace BaP a EE2 specifickou aktivitu tohoto enzymu snižuje.

Změna exprese CYP1A a 2C způsobená studovanými ED a jejich kombinacemi může vést k ovlivnění metabolismu a genotoxickému působení těchto látek v organismu a posléze jejich dalšímu účinku na životní prostředí. Konkrétní genotoxická aktivace BaP způsobená CYP1A1 by tedy mohla být ovlivněna endokrinními disruptory EE2 a E2.

Klíčová slova: 17 α -ethinylestradiol, benzo[a]pyren, 17 β -estradiol, endokrinní disruptory, cytochrom P450, mikrosomální frakce, exprese, specifická aktivita

Abstract

Many currently produced chemicals reveal specific properties which allow them to be referred to as endocrine disruptors (ED). These substances exhibit an exogenic hormone activity and usually act as antagonists or agonists of endogenic hormones. The exogenic EDs studied in this work were 17 α -ethinylestradiol (EE2) and benzo[a]pyrene (BaP). 17 β -estradiol (E2), a typical endogenic hormone, was also included to the study.

In the presented work, the effect of these EDs and their combinations on the expression and specific activities of cytochromes P450 (CYP) 1A1 and 2C was determined. First, the microsomal fraction (MF) of liver, kidney and lung of rats premedicated with these compounds or without premedication was isolated. CYP expression was assessed by the Western blot analyses in these MF samples. Moreover, CYP1A1 and CYP2C specific activities were evaluated. It was found that premedication of rats with BaP increased CYP1A1 expression in all above mentioned organs. Whereas BaP strongly induced rat CYP1A1, EE2 and E2 were almost without this effect. But, when these disruptors were administered to rats with BaP, they supported its potency to induce CYP1A1. Further, CYP2C11 expression and its specific activity was gently increased by premedication of rat with EE2 and its combination with BaP. Premedication of rat with BaP also significantly increased the expression of CYP2C11 in kidney. On the contrary, premedication of rat with BaP and its combination with EE2 decreased the CYP2C6 specific activity in liver. E2, EE2 and its combination lead to increasing of this specific activity.

Different expression of the CYP1A and 2C affected by the studied EDs and their combinations may modulate their metabolic pathways and genotoxic activity in organism, as well as their environment effects.

(In Czech)

Keywords: 17 α -ethinylestradiol, benzo[a]pyrene, 17 β -estradiol, endocrine disruptors, cytochrome P450, microsomal fraction, expression, specific activity

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1 ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY	10
1.1 ENDOKRINNÍ DISRUPTORY	10
1.1.1 <i>Endogenní a exogenní hormony</i>	11
1.1.2 <i>17α-ethinylestradiol</i>	12
1.1.2.1 <i>Metabolismus 17α-ethinylestradiolu a jeho biodegradace</i>	13
1.1.3 <i>Benzo[<i>a</i>]pyren</i>	15
1.1.3.1 <i>Metabolismus benzo[<i>a</i>]pyrenu a jeho biodegradace</i>	16
1.2. CYTOCHROMY P450	17
1.2.1 <i>Struktura cytochromů P450</i>	17
1.2.2 <i>Katalytický mechanismus cytochromů P450</i>	18
1.2.3 <i>Cytochromy P450 1A a 2C a jejich vztah k ED EE2 a BaP</i>	20
2 CÍL PRÁCE.....	22
3 MATERIÁL A METODY.....	23
3.1 MATERIÁL	23
3.1.1 <i>Použité chemikálie a rozpouštědla</i>	23
3.1.2 <i>Použité přístroje</i>	24
3.2 METODY	27
3.2.1 <i>Premedikace potkanů</i>	27
3.2.2 <i>Izolace mikrosomální frakce</i>	28
3.2.3 <i>Stanovení koncentrace proteinů</i>	29
3.2.4 <i>Stanovení koncentrace cytochromu P450</i>	29
3.2.5 <i>Diskontinuální elektroforéza SDS-PAGE</i>	30
3.2.6 <i>Metoda Western blot</i>	31
3.2.7 <i>Stanovení specifické aktivity CYP2C11: 16α-hydroxylace testosteronu</i>	34
3.2.7.1 <i>Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)</i>	34
3.2.8 <i>Stanovení specifické aktivity CYP2C6: 4'-hydroxylace diklofenaku</i>	35
3.2.8.1 <i>Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)</i>	35
3.2.9 <i>Stanovení specifické aktivity CYP1A1: oxidace Sudanu I</i>	36
3.2.9.1 <i>Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)</i>	37
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1 CHARAKTERIZACE IZOLOVANÉ MIKROSOMÁLNÍ FRAKCE.....	38
4.2. STUDIUM Vlivu E2, EE2, BAP A JEJICH KOMBINACÍ NA MÍRU EXPRESE CYP1A1	39
4.3 STUDIUM Vlivu E2, EE2, BAP A JEJICH KOMBINACÍ NA SPECIFICKOU AKTIVITU CYP1A1	42
4.4 STUDIUM Vlivu E2, EE2, BAP A JEJICH KOMBINACÍ NA MÍRU EXPRESE CYP2C11.....	44
4.5 STUDIUM Vlivu E2, EE2, BAP A JEJICH KOMBINACÍ NA SPECIFICKOU AKTIVITU CYP2C11	46

4.6 STUDIUM VLIVU E2, EE2, BAP A JEJICH KOMBINACÍ NA SPECIFICKOU AKTIVITU CYP2C6	48
5 ZÁVĚR	50
6 SEZNAM LITERATURY	51

Seznam použitých zkratek

2-OH-EE2	2-hydroxyethinylestradiol
AhR	aryl hydrocarbon receptor; receptor aromatických uhlovodíků
ALP	alkalická fosfatáza
APS	persíran amonný
ARNT	AhR nuclear translocator
BaP	benzo[a]pyren
BCA	bicinchoninová kyselina
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamidem
BPDE	BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid
BSA	bovine serum albumin; hovězí sérový albumin
CYP	cytochromy P450
CTRL	kontrolní premedikační skupina
Dic	diklofenak
E1	estron
E2	17 β -estradiol
E3	estriol
EE2	17 α -ethinylestradiol
EPA	Environmental Protection Agency; Agentura pro ochranu životního prostředí (USA)
ED	endokrinní disruptory
EDSP	Endocrine Disruptor Screening Program
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasa
GS	NADPH generující systém
HPLC	high-performance liquid chromatography; vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IgG-AP	sekundární protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou
KHPA	kombinovaná hormonální perorální antikoncepce
MF	mikrosomální frakce
MFO	monooxygenasy se smíšenou funkcí
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (redukováná forma)
NBT	nitro blue tetrazolium chlorid

PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PBS-Triton	phosphate-buffered saline with Triton; fosfátový pufr se zvýšenou iontovou silou
PVDF	polyvinyliden fluorid
RPM	revolutions per minute; otáčky za minutu
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid
TST	testosteron
WB	Western blotting; metoda Western blot
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem

1 Úvod a přehled literatury

Zvýšená produkce syntetických látek, mezi které patří nově vytvářená léčiva, či chemické sloučeniny hojně se využívající v zemědělství a průmyslu, souhrnně označované jako endokrinní disruptory (ED), má negativní vliv na životní prostředí a ve svém důsledku i na zdravotní stav lidské populace¹. Velké riziko představuje schopnost ED ovlivňovat hormonální systém živočichů. V posledních letech je v této souvislosti sledován především účinek některých antibiotik a hormonální antikoncepce². Tyto látky se po vyloučení z lidského organismu velmi často bioakumulují v živých tkáních a začleňují do životního cyklu ostatních organismů. Ovlivňují například reprodukční schopnosti a pohlaví ryb³. Již v 70. letech minulého století bylo detekováno zvýšené množství lidských hormonů a léčiv v odpadních vodách⁴. Této skutečnosti však nebyla věnována velká pozornost. Na začátku 21. století se produkce syntetických přípravků zvýšila a nebezpečí s tím spojené vzrostlo. Proto se mnoho laboratoří po celém světě začalo zabývat působením endokrinních disruptorů na metabolismus živočichů a jejich možnou degradaci a detoxikaci⁵.

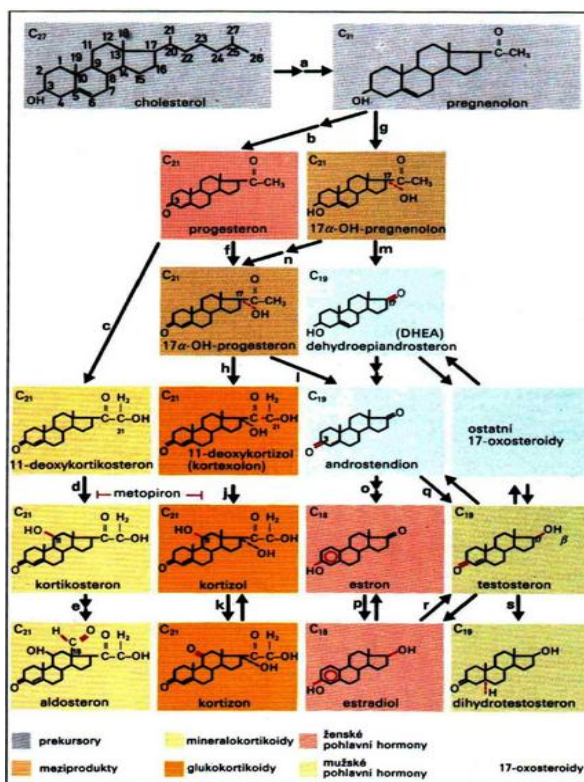
1.1 Endokrinní disruptory

Endokrinní disruptory jsou Agenturou pro ochranu životního prostředí (Environmental Protection Agency, EPA) definovány jako exogenní hormonálně aktivní látky, které napodobují přirozeně se vyskytující hormony v organismu⁶. Mechanismus jejich působení je velice pestrý. Mohou se vázat na receptory a působit jako antagonisté či agonisté endogenních hormonů nebo narušovat jejich transport, syntézu, eliminaci a metabolismus⁵. Charakteristickými vlastnostmi ED jsou vysoká účinnost již při velmi nízkých koncentracích, schopnost bioakumulace a dlouhá doba působení, která může způsobovat chronické poruchy. ED primárně narušují fyziologické funkce endokrinního systému vedoucí k imunitním a nervovým poruchám, dále zvyšují riziko vzniku rakoviny a jsou zodpovědné i za neplodnost, u ryb pak za feminizaci samců. Je prokázán také vliv těchto látek na chování živočichů^{5,7}. V 90. letech minulého století EPA založila tzv. Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP), ve kterém vytváří seznam potenciálních látek vykazujících endokrinní aktivitu. Databáze obsahuje mnoho tisíc molekul a zahrnuje také jejich charakterizaci, popis screeningových metod a testy toxicity, pomocí nichž lze snadněji tyto látky rozpoznat a popřípadě eliminovat z životního prostředí^{8,9}.

Předkládaná práce se zabývá endogenním ED 17β -estradiolem (E2) a dvěma exogenními ED, 17α -ethinylestradiolem (EE2) a benzo[a]pyrenem (BaP).

1.1.1 Endogenní a exogenní hormony

Steroidní hormony se řadí do široké skupiny steroidních látek přirozeně se vyskytujících v organismu. Jejich struktura a biosyntéza je odvozena od cholesterolu (obrázek 1). Mezi steroidní hormony patří glukokortikoidy, mineralokortikoidy, progestiny, mužské pohlavní hormony (androgeny) a ženské pohlavní hormony (estrogeny)¹⁰.



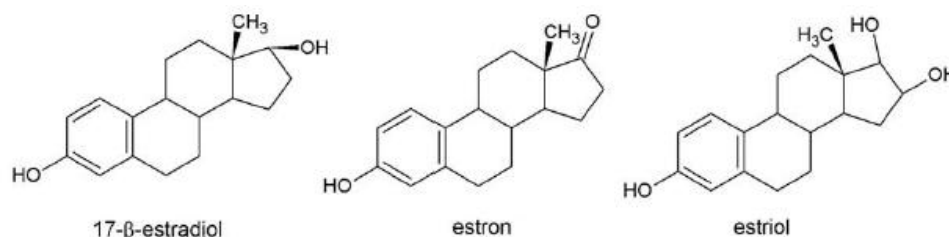
Obrázek 1: Biosyntéza steroidních hormonů.

Biosyntéza estrogenů vychází z androgenů¹⁰.

Estrogeny jsou tvořeny 18-ti atomy uhlíku (jedno aromatické jádro, dva cyklohexanové kruhy a jeden cyklopentanový cyklus) a jejich biosyntéza je odvozena od mužských pohlavních hormonů. V thekálních buňkách ve folikulech vaječníků se tvoří androgeny, které se v granulosaových buňkách aromatizují na estrogeny. Jejich další biosyntéza probíhá v placentě či kůře nadledvin^{10,11}.

Mnoho ED, které byly nalezeny ve znečištěných vodách, vykazovaly vysokou estrogení aktivitu, díky které bylo zřejmé, že se tyto látky dokážou vázat na receptory (typu α i β) ženských pohlavních hormonů a napodobovat jejich účinek^{7,12}.

Estrogeny lze rozdělit na přírodní a syntetické. Mezi endogenní estrogeny patří 17 β -estradiol (E2), estron (E1) a estriol (E3), které vykonávají funkce nezbytné pro správný vývoj a reprodukci organismu. Liší se oxidačními stavy na konci pětiuhlíkatého cyklu (obrázek 2)¹¹. Mezi exogenní estrogeny se řadí uměle syntetizované látky podobající se svou strukturou i vlastnostmi přirozeně se vyskytujícím steroidům, dále fytoestrogeny (isoflavonoidy, lignany), mykoestrogeny (zearaelon) a xenoestrogeny (farmaka, pesticidy, vedlejší produkty průmyslové výroby). Jejich účinek je obdobný, avšak často provázený negativním vlivem na metabolismus hormonů. Tyto látky se specificky váží na receptory pro endogenní estrogeny a mohou působit jako jejich agonisté či antagonisté. Nejznámějším uměle připraveným estrogenem odvozeným od přirozeného E2, je 17 α -ethinylestradiol (EE2). Tento syntetický hormon se začleňuje do hormonálního metabolismu organismu a spolu s progesteronem je složkou perorální antikoncepce^{11,13}.



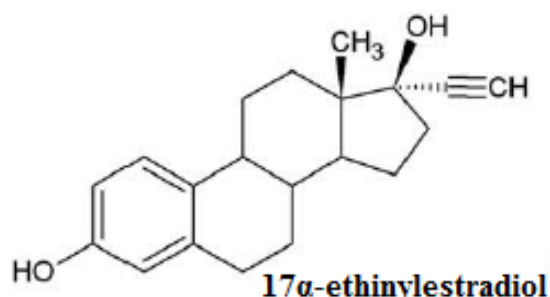
Obrázek 2: Struktura endogenních estrogenů¹¹.

Endogenní estrogeny E2, E1 a E3 se liší oxidačním stavem na konci cyklopentanového cyklu. Nejdůležitějším estrogenem je E2, jehož hlavním produktem odbourávání je E3¹⁰.

1.1.2 17 α -ethinylestradiol

Odlišnost exogenního 17 α -ethinylestradiolu a endogenního E2 spočívá v přítomnosti ethinylové skupiny na C17 uhlíku (obrázek 3, str. 13)¹¹. Tento syntetický steroid je hlavní složkou kombinované hormonální perorální antikoncepce (KHPA). Obsah EE2 v jedné dávce, který původně činil 50 μ g, se postupem času snížil až na 15 μ g, čímž bylo eliminováno mnoho kardiovaskulárních rizik spojených s užíváním KHPA¹⁴. Důvodem proč se v antikoncepčních pilulkách přirozený E2 nahrazuje syntetickým EE2 je jeho vysoká odolnost vůči degradaci a orální aktivita¹⁵. EE2 poprvé syntetizovali v roce 1938 Hans Herloff Inhoffen a Walter Hohlweg ve společnosti Schering AG v Berlíně¹⁶. Kromě antikoncepčních přípravků je EE2 přítomen i v léčivech používajících se při hormonální substituční léčbě osteoporózy, menstruačních poruchách a rakovině prostaty¹⁵.

Hlavním důvodem zvýšené pozornosti spojené s EE2 je jeho přítomnost v povrchových vodách, kam se dostává po průchodu čistíčkami odpadních vod. Mnoho studií jasně prokazuje škodlivý vliv EE2 na životní prostředí¹⁷.



Obrázek 3: Struktura 17α-ethinylestradiolu.

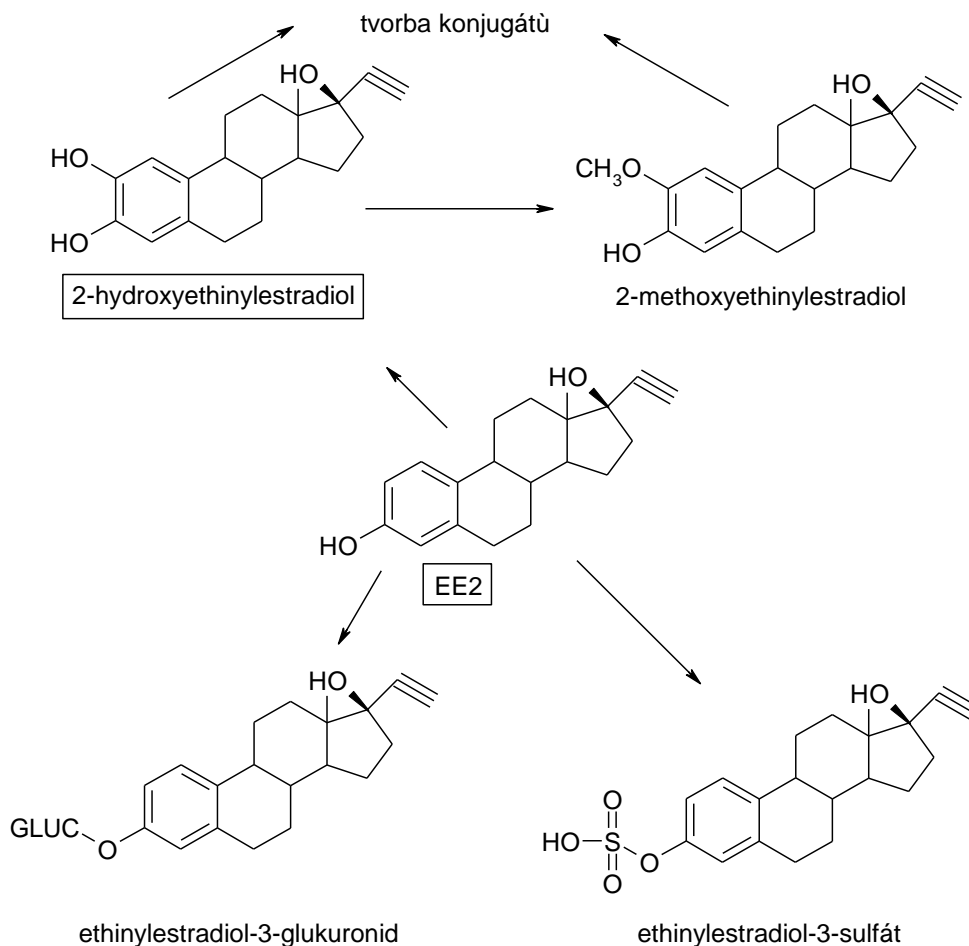
EE2 se od E2 liší ethinylovou skupinou na C17 uhlíku¹¹.

1.1.2.1 Metabolismus 17α-ethinylestradiolu a jeho biodegradace

Vzhledem k negativnímu působení EE2 a jeho vysoké schopnosti bioakumulace v živých tkáních, je znalost metabolismu a působení tohoto syntetického hormonu, i v kombinaci s dalšími ED, velmi důležitá. Biotransformace EE2 probíhá v játrech¹⁰. Prvním krokem přeměny EE2 jsou hydroxylační reakce, ke kterým dochází na steroidním jádře v pozici 2, 4, 6 a 16α. Hlavním produktem je 2-hydroxyethinylestradiol (2-OH-EE2), který může být dále přeměňován na 2-methoxyethinylestradiol připojením methylové skupiny. Méně zastoupené jsou hydroxylované produkty vznikající v poloze 4, 6 a 16α¹⁸. K hydroxylaci EE2 na pozici C16 nedochází tak často z důvodu sterické zábrany ethinylové skupiny na C17 uhlíku. Právě omezení 16α-hydroxylace je příčinou rozdílu v metabolismu syntetického EE2 a přirozeně se vyskytujícího E2¹⁵.

Nepřeměněný EE2 a jeho hydroxylované metabolity jsou v játrech konjugovány s kyselinou glukuronovou v pozici 3 a 17 pomocí uridin difosfát glukuronosyltransferasy 1A1¹⁹ a sulfatovány v pozici 3 za katalýzy sulfottransferasou 1E1²⁰ (obrázek 4, str. 14). Tyto nově vzniklé sloučeniny rozpustné ve vodě jsou spolu se zbytkovým EE2 vylučovány močí a v menší míře i stolicí. Takto se dostávají do odpadních vod, kde mohou být pomocí mikroorganismů opět aktivovány. Příkladem mikroorganismu, který je za tuto zpětnou aktivaci zodpovědný, je bakterie *Escherichia coli*, hojně přítomná ve splaškové vodě. Obsahuje enzym glukuronidasu, který dokáže konjugáty kyseliny glukuronové hydrolyzovat za vzniku aktivního estrogenu^{21,22}. Hydroxylace je jednou ze stěžejních

reakcí první fáze biotransformace. Mezi nejvýznamnější enzymy katalyzující tyto reakce patří cytochromy P450²³ (viz dále, kapitola 1.2.3).



Obrázek 4: Metabolické přeměny EE2 v lidském organismu.

Zvýrazněn je hlavní produkt hydroxylačních reakcí: 2-OH-EE2¹⁷.

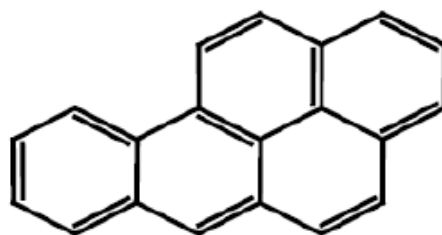
Čističky odpadních vod nejsou schopny tento syntetický hormon zachytit, a proto se v poměrně velkém množství objevuje v povrchových vodách^{5,21}. Obtížná odstranitelnost EE2 ze splaškových vod opět souvisí s jeho strukturou. Odolnost vůči degradačním enzymům je dána zejména přítomností ethinylové skupiny na C17 uhlíku a mimo jiné i jeho silnými hydrofobními vlastnostmi¹⁵. EE2 lze degradovat působením mikroorganismů přítomných v aktivovaném vodním kalu (*Spingobacterium* JCR5, *Pseudomonas aeruginosa* TJ1)²⁴. Velmi rychle EE2 degradují nitrifikační bakterie, heterotrofní bakterie a

bakterie oxidující amoniak^{25,26}. Další možností přeměny EE2 je degradace pomocí ligninolytických hub, například *Pleurotus ostreatus* (hlíva ústřičná)²⁷.

1.1.3 Benzo[a]pyren

Benzo[a]pyren (BaP) patří mezi polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a je dalším významným ED přítomným ve značné míře ve všech sférách lidského působení²⁸. PAH nejčastěji vznikají při spalování fosilních paliv, při zpracování potravin nebo jako vedlejší produkty průmyslové výroby. Jsou detekovány při rozsáhlých požárech, ve znečištěné vodě a ovzduší, v cigaretovém kouři a mimo jiné i v potravinách²⁹. Riziko těchto látek spočívá převážně v jejich biologické aktivitě a dlouhodobé expozici v životním prostředí²⁸.

BaP je nízkomolekulární aromatická sloučenina (obrázek 5)²⁸, která je agenturou EPA charakterizována jako látka podezřelá na karcinogenní, mutagenní a teratogenní aktivitu s vysokým stupněm toxicity³⁰. Nejvíce se vyskytuje ve vzduchu a často se používá jako indikátor kontaminace PAH v životním prostředí³¹. Studie prokázaly, že koncentrace BaP v ovzduší se zvyšuje v zimních měsících, kdy se ve větší míře využívá spalování paliva, zejména dřeva a uhlí³⁰. BaP je hlavní složkou cigaretového kouře a představuje tak jeden z primárních karcinogenů zodpovědných za vznik rakoviny plic. Dále je prokázáno, že způsobuje tumorové nádory v játrech. Do organismu se dostává převážně inhalační cestou ze znečištěného ovzduší nebo perorálně z některých potravin²⁸. Tato kontaminace je velmi častá. Například při tepelné úpravě masa (grilování), kdy je potravina vystavena vysokým teplotám, dochází na jejím povrchu k endogenní tvorbě BaP²⁹.



BaP

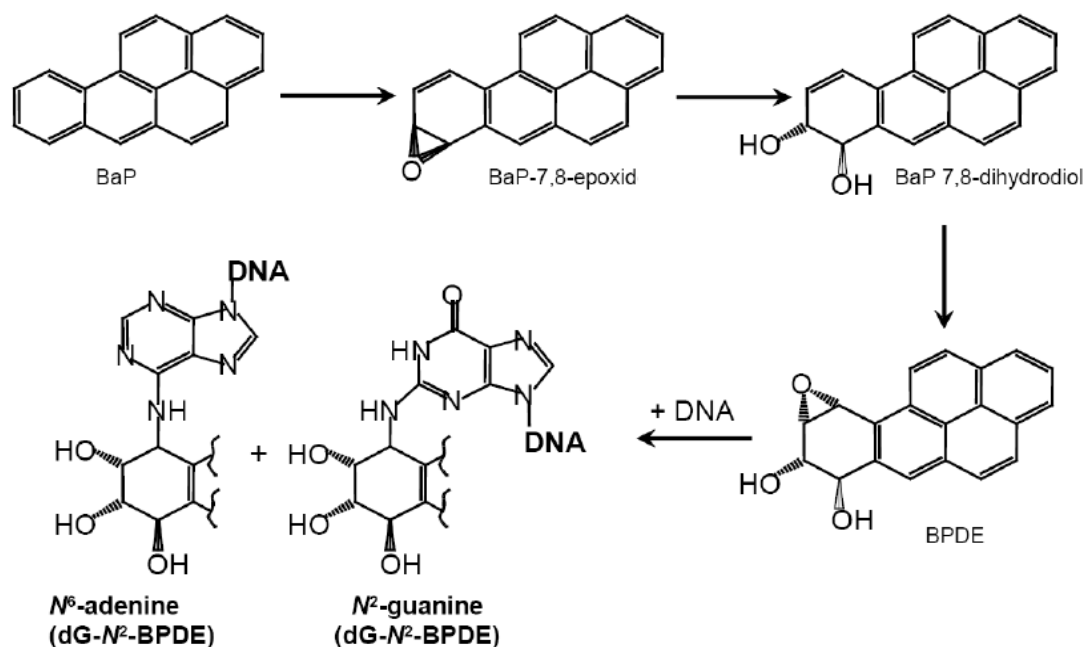
Obrázek 5: Struktura benzo[a]pyrenu.

BaP je aromatická sloučenina skládající se z pěti kondenzovaných benzenových jader³⁰.

1.1.3.1 Metabolismus benzo[a]pyrenu a jeho biodegradace

Stěžejním krokem metabolismu BaP je jeho aktivace, která vede ke vzniku karcinogenních metabolitů. Ty mohou interagovat s DNA za tvorby kovalentních aduktů. Hlavní enzymy katalyzující metabolickou přeměnu BaP jsou cytochromy P450³² (viz dále, kapitola 1.2.3). Metabolická aktivace BaP probíhá v typickém tříkrokovém uspořádání (obrázek 6)²⁸. V první fázi dochází k oxidaci BaP za vzniku BaP-7,8-epoxidu, který je následně přeměňován na BaP-7,8-dihydrodiol. Tento meziprodukt podléhá druhé oxidační reakci, při které epoxidací vzniká velmi toxický metabolit BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE)³¹. Takto vytvořené diepoxidy vstupují do jádra a interagují s DNA za tvorby kovalentních aduktů. BPDE reaguje především s deoxyguanosinem³².

K odstranění BaP z životního prostředí se využívá mikrobiální degradace. Existuje velké množství bakterií, které jsou schopny BaP účinně biotransformovat za vzniku netoxických metabolitů. Příkladem bakterie schopné této degradace je *Sphingomonas paucimobilis*³³. Dalšími způsoby odstranění BaP je degradace pomocí řas (*Selanastum capricornutum*) nebo hub (*Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus ochraceus*). Limitujícím faktorem bývá především správné dodržení podmínek, za kterých degradační reakce probíhají³⁰.



Obrázek 6: Schéma třístupňové metabolické aktivace benzo[a]pyrenu a tvorba aduktů s DNA³⁰.

BaP značí benzo[a]pyren. BPDE představuje vysoce toxický metabolit benzo[a]pyrenu BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid.

1.2. Cytochromy P450

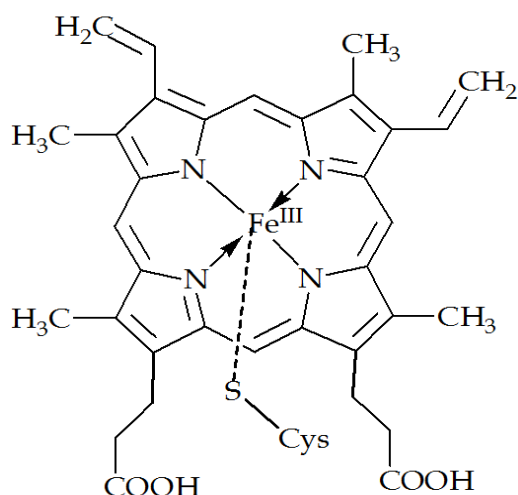
Cytochromy P450 (CYP) hrají významnou roli v metabolismu cizorodých látek³⁴. Jsou zodpovědné za oxidační, peroxidační a redukční reakce I. fáze biotransformace xenobiotik, vedoucí k jejich detoxikaci a následné eliminaci z organismu. Dále katalyzují metabolické přeměny léčiv na farmakologicky účinné metabolity a jsou součástí biosyntézy významných molekul, například steroidních hormonů. Riziko představují nově syntetizované látky, které mohou být CYP metabolizovány na toxické, mutagenní či karcinogenní deriváty³⁵. CYP spadají do širokého systému monooxygenas se smíšenou funkcí (z angl. „mixed function oxidases“, MFO), ve kterém fungují jako terminální oxidasy³⁶. Do této skupiny enzymů patří i jejich reductasy, například NADPH:CYP reductasa, která dodává elektrony příslušným cytochromům P450¹. CYP jsou lokalizovány v membráně hladkého endoplazmatického retikula nebo v membráně mitochondrií. Vyskytují se převážně v játrech, plicích, ledvinách a v menší míře také v mozku, kůži a tenkém střevě³⁶.

CYP byly objeveny na konci 50. let 20. století a definovány jako pigment vyskytující se v jaterních mikrosomech³⁷. V 60. letech byla objasněna jejich struktura a hemoproteinový charakter³⁸. Jejich název byl odvozen od charakteristické absorpce redukovaného CYP v komplexu s oxidem uhelnatým při vlnové délce 450 nm. Písmeno P značí původní označení těchto systémů jako pigmentů³⁸. Rozdělují se na základě homologie jejich primární struktury, tedy aminokyselinové sekvence, do rodin (podobnost větší než 40%) a podrodin (podobnost větší než 55%)³⁹. Po zkratce CYP následuje číslice, která značí do které rodiny příslušný cytochrom P450 náleží (např. CYP2). Velké písmeno za číslem rodiny určuje podrodinu enzymu (např. CYP2C) a další číslice v pořadí konkrétní izoformu daného cytochromu P450 (např. CYP2C6)³⁵.

1.2.1 Struktura cytochromů P450

CYP jsou hemové enzymy (EC 1.14.14.1), které ve své struktuře obsahují neproteinovou složku hem b (protoporfyrin IX)³⁴. Centrálním atomem porfyrinového skeletu je železitý kationt, Fe^{3+} , který je zde vázán čtyřmi atomy dusíku pyrolových jader (obrázek 7, str. 18)⁴⁰. Na proteinovou část enzymu je hem b připojen pomocí hydrofobních vazeb a také přes thiolátovou síru sulfhydrylové skupiny aminokyseliny cysteinu, která představuje pátý ligand centrálního atomu železa v protoporfyrinu IX. Šestým ligandem je atom kyslíku z molekuly vody^{1,36}, který hraje významnou roli při katalytickém

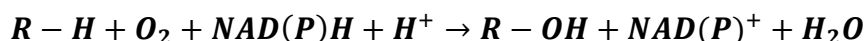
mechanismu cytochromů P450³⁵. Charakteristické uspořádání významně ovlivňuje chování a vlastnosti popisovaných enzymů a odlišuje je od ostatních hemoproteinů. Ve fosfolipidové dvojvrstvě membrány endoplasmatického retikula či mitochondrií jsou CYP zakotveny svým N-koncem. Do cytosolu směřuje C-konec, na kterém je lokalizováno aktivní centrum zodpovědné za katalytickou činnost těchto enzymů³⁴.



Obrázek 7: Struktura hemu b⁴².

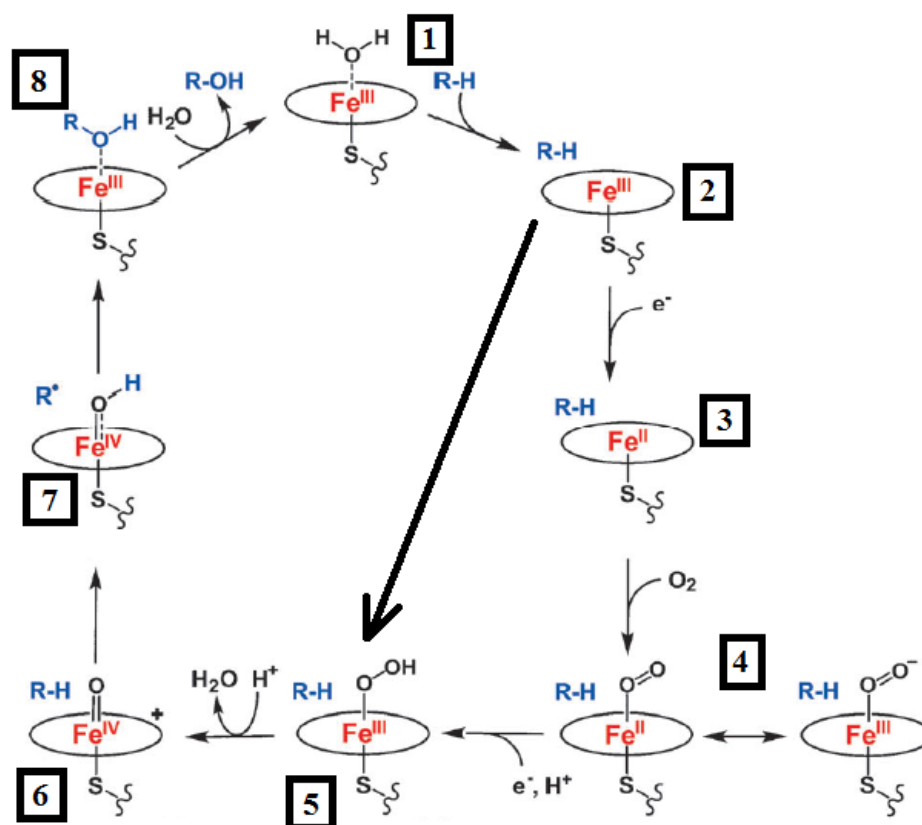
1.2.2 Katalytický mechanismus cytochromů P450

Většinu reakcí katalyzovaných CYP lze zapsat dle následující sumární rovnice, ve které R-H značí substrát a R-OH hydroxylovaný produkt reakce³⁴:



Katalytický mechanismus CYP probíhá v cyklu, který sestává minimálně ze sedmi kroků (obrázek 8, str. 19)³⁴. Na počátku se železo nachází v klidovém stavu, v tzv. ferri formě s oxidačním číslem III a se všemi vazebnými místy obsazenými ligandem⁴¹. Prvním krokem mechanismu je navázání substrátu (R-H) do aktivního místa enzymu [1]. Tato reakce vyvolá odstranění molekuly vody z vazebného místa na centrálním atomu železa a konformační změnu v molekule enzymu [2]. Díky navázání substrátu dochází k přijetí jednoho elektronu od NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy, čímž se hemové železo redukuje na železnatý kationt a dostává se do tzv. ferro formy [3]. V této konformaci je

hemové železo schopno vázat molekulární kyslík za vzniku nestabilního komplexu [4], který je opět redukován přijmutím jednoho elektronu od NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy nebo NADPH: cytochrom b_5 oxidoreduktasy. Touto reakcí dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion [5]. V šestém kroku se vazba O-O začíná štěpit za současné redukce jednoho atomu kyslíku, který přijme dva protony a dojde k uvolnění molekuly vody. Druhý atom kyslíku zůstává navázaný na centrálním atomu za vzniku ferrioxenového komplexu [6]. Následuje odtrhnutí atomu vodíku z navázaného substrátu za vzniku substrátového radikálu (R^\bullet) a hydroxylového radikálu, který zůstává stále připojený na centrálním atomu železa [7]. Tyto radikály mají tendenci interagovat za současné tvorby nativní formy CYP a produktu ($R-OH$), který je poté z enzymu uvolněn [8]^{1,41}. Pokud jsou přítomna oxidační činidla (například peroxidy), může docházet ke zjednodušení (naznačeno šipkou), kdy po konformační změně [2] přímo vzniká peroxidový anion [5]. Tato reakce bývá označována jako peroxidasová aktivita CYP, avšak její účinnost je nižší než při reakci za přítomnosti NADPH¹.



Obrázek 8: Schéma katalytického mechanismu CYP³⁶.

$R-H$ značí substrát, $R-OH$ produkt reakce, čísla představují jednotlivé kroky cyklu a šipka naznačuje peroxidasovou aktivitu CYP³⁹.

1.2.3 Cytochromy P450 1A a 2C a jejich vztah k ED EE2 a BaP

V rámci předkládané práce byly studovány cytochromy P450 1A a 2C. CYP1A1 hraje významnou roli v metabolismu karcinogenních PAH, zejména pak BaP³⁵. Tento enzym je přítomný především v extrahepatálních tkáních (kůže, GIT, plíce)⁴². Jak již bylo naznačeno v kapitole 1.1.3.1 CYP1A1 katalyzuje aktivaci BaP vedoucí ke vzniku polárních metabolitů schopných vazby na DNA. Tato interakce ve svém důsledku představuje počátek vzniku rakoviny plic³². V prvním kroku CYP1A1 oxiduje BaP za vzniku epoxidu, který je poté enzymem epoxidhydrolásou přeměňován na dihydrodiol. Tento meziprodukt je substrátem pro druhou CYP-dependentní oxidační reakci, při které se tvoří BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE)³¹. Tyto metabolity jsou vysoce nebezpečné především pro svoji schopnost interagovat s dvoušroubovicí DNA za vzniku kovalentních aduktů³².

CYP1A jsou inducibilní enzymy, které jsou za normálních podmínek v buňkách zastoupeny ve velmi nízkých koncentracích a teprve setkáním s příslušnými substráty dochází ke zvýšení jejich množství (indukci). K indukci CYP1A dochází prostřednictvím receptoru aromatických uhlovodíků (AhR), který dokáže specificky vázat zejména halogenové a polycyklické aromatické látky⁴². Volný, neaktivovaný AhR se nachází v cytosolu. Po navázání ligandu dochází k jeho aktivaci, která vede ke konformační změně proteinu a následné translokaci do jádra, kde dochází k interakci s ARNT proteinem (AhR nuclear translocator) za vzniku komplexu AhR-ARNT. Tento komplex se váže na specifické části DNA a pomocí kofaktorů dochází ke změně v expresi genů kódujících enzymy první fáze biotransformace⁴³. Bylo prokázáno, že BaP indukuje expresi CYP1A1. Jeho navázáním na AhR dochází k transkripční aktivaci tohoto enzymu³².

Další studovanou skupinou cytochromů P450 v této práci je podrodina CYP2C. CYP2C11 a CYP2C6 se vyskytují především v játrech, ve kterých jsou exprimovány konstitutivně. CYP2C11 katalyzuje hydroxylační reakce metabolismu důležitých endogenních hormonů, testosteronu a progesteronu. Mezi inhibitory CYP2C11 patří například diklofenak a cimetidin⁴⁴ a mezi induktory patří například aceton⁴⁵.

Bylo zjištěno, že potkaní izoformy CYP2C11 a CYP2C6 katalyzují přeměnu EE2 na 2-OH-EE2, jenž je hlavním produktem hydroxylace této sloučeniny. Přeměnu EE2 na minoritní metabolit katalyzují cytochromy P450 podrodin CYP3A a CYP2A^{18,23}. EE2 může působit nejen jako substrát CYP, ale také jako jeho inhibitor. Při oxidaci acetylenové skupiny EE2 za katalýzy CYP3A a CYP2C může docházet ke vzniku acetylen-oxidu, který

má silné nukleofilní účinky a je schopen se zpětně kovalentně vázat na protein cytochromu P450 nebo alkylovat prostetickou skupinu enzymu a působit jako tzv. sebevražedný substrát^{46,47}. Protože jsou CYP hlavními enzymy podílejícími se na reakcích první fáze biotransformace xenobiotik, představuje jejich inaktivace velké riziko spojené se vznikem nežádoucích interakcí v organismu¹⁸. Kromě ireverzibilní inhibice CYP působí EE2 i jako reverzibilní inhibitor 4'-hydroxylace diklofenaku katalyzované CYP2C a 16 α a 6 β -hydroxylace testosteronu katalyzované CYP2C a CYP3A⁴⁸. U lidských CYP zatím nebyla prokázána výrazná indukce EE2, pouze u potkaních CYP bylo zjištěno nepatrné zvýšení jejich aktivity⁴⁹.

2 Cíl práce

Předkládaná bakalářská práce byla součástí grantového projektu Laboratoře molekulární karcinogeneze a vývoje léčiv nazvaného „Organismy a mechanismy určující osud endokrinních disruptorů v životním prostředí“. Cílem bakalářské práce bylo studium vlivu endokrinních disruptorů 17 β -estradiolu (E2), 17 α -ethinylestradiolu (EE2), benzo[a]pyrenu (BaP) a jejich kombinací na expresi a specifické aktivity cytochromů P450 1A1, 2C6 a 2C11 u potkanů *in vivo*.

Hlavní úkoly práce byly:

Izolovat mikrosomální frakci jater, ledvin a plic potkanů nepremedikovaných a premedikovaných výše uvedenými sloučeninami a jejich kombinacemi.

Určit specifický obsah CYP ve vzorcích izolované mikrosomální frakce jater, ledvin a plic potkanů nepremedikovaných a premedikovaných uvedenými endokrinními disruptory a jejich kombinacemi.

Pomocí metody Western blot zjistit míru exprese CYP1A1 a CYP2C11 v daných mikrosomálních vzorcích.

Stanovit specifické aktivity uvedených cytochromů P450 ve vzorcích mikrosomální frakce jater potkanů nepremedikovaných a premedikované 17 β -estradiolem, 17 α -ethinylestradiolem, benzo[a]pyrenem a jejich kombinacemi.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie a rozpouštědla

Chemikálie a rozpouštědla použitá v předkládané bakalářské práci pocházejí z následujících zdrojů:

BIO-RAD, USA: APS, standard molekulových hmotností, TEMED

Fluka, Švýcarsko: akrylamid, BIS, TRIS-HCl, 2-merkaptoethanol, testosteron

Gentest BD Bioscience, USA: potkaní rekombinantní CYP1A/CYP2C11 s exprimovanou NADPH

J.T. Baker, USA: acetonitril (pro HPLC)

Lach:NER, ČR: ethanol, ethylacetát, glycin, KH_2PO_4 , methanol (pro HPLC), trihydrát octanu sodného

Lachema, ČR: bromfenolová modř, diethylether, dithioničitan sodný, glycerol, KCl, kyselina octová, $\text{MgC}_{12}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 , Na_2HPO_4 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$, NH_4HCO_3 , Sudan I,

Laktino, ČR: sušené mléko

Linde, Česká republika: kapalný dusík, oxid uhelnatý

Loba-Chemie, Indie: Ponceau barva

Promega Corporation, USA: BCIP, NBT

Serva, Německo: Coomassie brilliant blue R-250 (CBB), Triton X-100

Sevapharma a.s., ČR: hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma-Aldrich, USA: Anti-GAPDH (primární protilátka), Anti-rabbit (sekundární protilátka), Anti-goat (sekundární protilátka), Anti-chicken (sekundární protilátka), diklofenak, dodecylsulfát sodný (SDS), NADP⁺, glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, NADPH

Thermo Scientific, USA: Microplate BCA Protein Assay Kit

3.1.2 Použité přístroje

Analytické váhy:

40 SM-200 A Pesa, Švýcarsko

Aparatura pro metodu Western blot:

Fastblot B43 Biometra, Německo

Automatické pipety:

Nichiryo Nichipet EX Japonsko

Eppendorf Německo

Elektroforetická aparatura:

BIO-RAD, USA

Centrifugy:

K-23, výkyvný rotor Janetzki, Německo

K-24, úhlový rotor Janetzki, Německo

ultracentrifuga L07, úhlový rotor 45Ti/70Ti Beckman Coulter, USA

centrifuga 5418, úhlový rotor Eppendorf, Německo

minicentrifuga SpectrafugeTM, úhlový rotor Labnet, USA

centrifuga EBA 270, úhlový rotor Hettich, Německo

Inkubátory:

IR 1500 Automatic CO₂ Incubator Flow Laboratories, Německo

Incubator mini Dry Bath MiniB-100
Thermomixer Compact
vodní lázeň TW8

MIULAB, Čína
Eppendorf, Německo
Julabo, Německo

Magnetická míchačka:

Variomag

Monotherm, Německo

pH metr:

HI 2211

HANNA instruments, USA

Třepačky:

Yellow line os 2 basic
třepačka
Mini rocker MR-1

IKA, Německo
ČSAV vývojové dílny, ČR
Biosan, Lotyšsko

Předvážky:

EW 600-2M
440-35N

Kern, Německo
Kern, Německo

Spektrofotometry:

Tecan Sunrise microplate reader
Specord 250 plus

Tecan, Švýcarsko
Analytik Jena, Německo

Systém HPLC:

pumpa: Dionex pump P580
ASI-100 Automated Sample Injector
UV/VIS Detektor UVD 170S/340S
Degasys DG-1210 Dionex
termobox pro kolonu: LCO 101
předkolona: Nukleosil 100-5 C18
kolona: Nukleosil 100-5 C18 HD
program: Chromeleon™ 6.11 build 490

ECOM, ČR
Macherey-Nagel, Německo
Macherey-Nagel, Německo

Vortexy:

Vortex Mixer VX-200

Labnet, USA

Genius 3

IKA, Německo

Další přístroje:

CentriVap DNA Concentrator

Labconco, USA

Elmasonic E 30 H

P-lab, ČR

homogenizátor dle Pottera a Elvehjema

3.2 Metody

3.2.1 Premedikace potkanů

Potkani kmene Wistar byli premedikováni benzo[*a*]pyrenem (BaP), 17 α -ethinylestradiolem (EE2), 17 β -estradiolem (E2) a jejich kombinacemi dle tabulky 1. Látky byly potkanům podávány rozpuštěné ve slunečnicovém oleji pomocí žaludeční sondy (gaváže). V každé premedikované skupině byli tři laboratorní potkani. Kontrolní skupině (CTRL) byl aplikován pouze slunečnicový olej.

Tabulka 1: Premedikace laboratorních potkanů

<u>Dávka:</u>	BaP	150 mg/kg hmotnosti potkana v 0,5 ml oleje
	EE2	20 mg/kg hmotnosti potkana v 0,5 ml oleje
	E2	20 mg/kg hmotnosti potkana v 0,5 ml oleje

Skupina číslo	Premedikační sloučenina
1	kontrola (CTRL)
2	benzo[<i>a</i>]pyren (BaP)
3	17 α -ethinylestradiol (EE2)
4	17 β -estradiol (E2)
5	kombinace BaP a EE2
6	kombinace BaP a E2
7	kombinace EE2 a E2

Třetí den byla zvířata usmrcena a byly z nich odebrány orgány (játra, ledviny, plíce), které byly zmrazeny tekutým dusíkem a uchovány při teplotě -80°C.

Experimenty byly prováděny v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (č. 509/2008 Sb.) a vyhláškou „O chovu a využití pokusných zvířat č. 419/2012 Sb.“ v prostoru Centra pro experimentální biomedicínu 1. LF UK (U nemocnice 478/5, Praha 5). Premedikace potkanů byla uskutečněna před zahájením bakalářské práce. V rámci této práce byly experimenty prováděny s již odebranými orgány.

3.2.2 Izolace mikrosomální frakce

Mikrosomy jsou části endoplasmatického retikula vznikající uměle při homogenizaci tkáně. Obsahují velké množství cytochromu P450⁵⁰. Mikrosomální frakce (MF) jater, ledvin a plic premedikovaných potkanů byla izolována metodou diferenční centrifugace. Izolace probíhala v chladicí místnosti při teplotě 6°C. Veškeré použité přístroje, pomůcky a chemikálie byly na tuto teplotu předem řádně vychlazeny. Byly připraveny tři pufrů, P1, P2 a P3, jejichž složení je uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 2: Složení pufrů pro izolaci mikrosomální frakce

Pufr P1 (2000 ml):	pH 7,4; 150 mM KCl, 50 mM Tris/HCl
Pufr P2 (500 ml):	pH 7; 100 mM Na ₄ P ₂ O ₇ · 10H ₂ O
Pufr P3 (50 ml):	pH 7,4; 150 mM KCl, 50 mM Tris/HCl, 20% (v/v) glycerol

Zmražené orgány (játra, ledviny, plíce) byly zváženy a poté rozstříhány na jemné kousky do kádinky s připraveným pufrem P1. Roztok částečně odkrvené tkáně a pufru byl filtrován přes složenou gázu a následně homogenizován v homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema s objemem pufru P1 odpovídajícím čtyřnásobné hmotnosti izolovaného orgánu. Následně byl homogenát centrifugován 10 minut při 600 g (centrifuga Janetzki K-23, výkyvný rotor 4x70 ml, 3000 RPM, 4°C). Supernatant byl odlit do kádinky a uchován na ledu v chladicí místnosti. Sediment byl rehomogenizován s 1/4 původního objemu pufru P1 a následně opět centrifugován za stejných podmínek jako v předchozím případě. Supernatanty z obou centrifugací byly spojeny a odstředěny 20 minut při 15000 g (centrifuga Janetzki K-24, úhlový rotor 6x35 ml, 13000 RPM, 4°C). Po centrifugaci byl supernatant opatrně odlit, aby nedošlo ke kontaminaci mitochondriální frakcí, a centrifugován 65 minut při 100000 g (ultracentrifuga Beckman L07, úhlový rotor 45Ti – 6x70 ml, 45000 RPM, 4°C). Supernatant (cytosolární frakce) byl uchován na ledu. Peleta mikrosomů byla opatrně seškrábnuta do těsného homogenizátoru a resuspendována s pufrem P2, jehož objem odpovídal dvojnásobku hmotnosti tkáně. Vzniklá suspenze byla centrifugována 65 minut při 100000 g (ultracentrifuga Beckman L07, úhlový rotor 70Ti – 8x28 ml, 60000 RPM, 4°C). Po odstranění supernatantu byla mikrosomální peleta resuspendována s pufrem P3, jehož objem odpovídal 1/4 celkové hmotnosti tkáně. Mikrosomální i cytosolární frakce byla pipetována do mikrozkušavek dle Eppendorfa po 100 µl, zmrazena pomocí kapalného dusíku a uchována v mrazicím boxu při -80°C.

3.2.3 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů v MF jednotlivých orgánů byla stanovena metodou BCA⁵¹. Principem metody je redukce měďnatých iontů na ionty měďné v alkalickém prostředí. Po redukci následuje chelatace, tedy navázání měďného kationtu na kyselinu bicinchoninovou za vzniku fialového komplexu. Tento produkt lze stanovit spektrofotometricky díky charakteristické absorpci při vlnové délce 562 nm.

Vzorky byly naředěny dle schématu uvedeného v tabulce 3 a poté zpracovány pomocí komerčního setu Microplate BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Pro přípravu standardních roztoků o koncentraci 0,125; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50 a 2,00 mg/ml, pomocí nichž byla sestrojena kalibrační přímka, byl použit hovězí sérový albumin (BSA). Do 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno vždy 5 μ l daného vzorku, standardu a slepého vzorku (destilovaná voda). Mikrosomální vzorky byly nanášeny v tripletním a vzorky standardů v paralelním uspořádání. Do každé jamky bylo pomocí vícekanálové pipety přidáno 195 μ l činidla, jež bylo připraveno z 50 dílů reagentu A (*pH* 11,25; 2% (w/v) $Na_2CO_3 \cdot H_2O$, 0,95% (w/v) $NaHCO_3$, 0,4% (w/v) $NaOH$, 0,16% (w/v) *vinan sodno-draselný*) a 1 dílu reagentu B (4% (w/v) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$). Mikrotitrační destička byla 1 minutu třepána (Yellow line os 2 basic) a následně inkubována 30 minut při 37°C (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator). Po inkubaci byla temperována na laboratorní teplotu. Pomocí čtečky mikrotitračních destiček byla změřena absorbance vzorků při 562 nm a poté programem KIM 32 vyhodnocena příslušná koncentrace proteinů.

Tabulka 3: Ředění MF jednotlivých orgánů pro stanovení koncentrace proteinů

Izolovaný orgán	Ředění
játra	50x
plíce	10x
ledviny	10x

3.2.4 Stanovení koncentrace cytochromu P450

Koncentrace CYP byla stanovena pomocí spektrální metody, která využívá vzniku komplexu cytochromu P450 v redukováném stavu s oxidem uhelnatým. Tento komplex charakteristicky absorbuje záření při vlnové délce 450 nm. Redukci cytochromu P450 zajišťuje dithioničitan sodný, $Na_2S_2O_4$ ³⁸.

Koncentrace cytochromu P450 v izolované MF byla měřena pouze u vzorků jater a ledvin. Mikrosomy byly vhodně naředěny (játra: 40x; ledviny: 20x) připraveným fosfátovým pufrům ($pH\ 7,4$; $0,1\ M\ KH_2PO_4$, $20\% (v/v)\ glycerol$). Ke každému vzorku byly přidány cca 2 mg $Na_2S_2O_4$ a po 5 minutách stání při laboratorní teplotě byl roztok rozdělen po 1 ml do dvou maskovaných semimikrokyvet o optické dráze 1 cm. Na spektrofotometru Specord 250 plus byla změřena základní linie. Následně byl obsah vzorkové kyvety 2 minuty probubláván oxidem uhelnatým. Poté byla měřena absorbance v rozsahu vlnových délek 400-490 nm a ze získaných hodnot absorbancí při 450 a 490 nm vypočítána koncentrace cytochromu P450 dle vzorce:

$$c_{CYP} = \frac{A_{450} - A_{490}}{\epsilon_{450} \cdot l} \cdot \text{\textit{\textit{ředění}}[\mu M]}$$

kde c_{CYP} značí molární koncentraci cytochromu P450, l optickou dráhu kyvety a ϵ_{450} extinční molární koeficient cytochromu P450 ($\epsilon_{450} = 0,091\ \mu M^{-1} \cdot cm^{-1}$).

3.2.5 Diskontinuální elektroforéza SDS-PAGE

Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) slouží k separaci proteinů na základě jejich rozdílné molekulové hmotnosti. Dodecylsulfát sodný (SDS) se váže na hydrofobní části proteinů stále ve stejném poměru (1,4 g SDS/g proteinu) a uděluje jim jednotný záporný náboj⁵². Polymerace gelu probíhá radikálovým mechanismem, který iniciuje persíran amonný (APS) a N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED). Tyto látky napomáhají vzniku a stabilizaci volných radikálů, pomocí nichž dochází k polymeraci akrylamidu s N,N-methylen-bis-akrylamidem (BIS) za vzniku trojrozměrné sítě⁵³.

K separaci proteinů izolované mikrosomální frakce byl použit 10% separační gel o složení: voda, 30% (w/v) akrylamid (29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) bisakrylamid), pufr A ($pH\ 8,8$; $1,5\ M\ Tris/HCl$), 10% (w/v) SDS, 10% (w/v) (APS), TEMED a 4% zaostřovací gel: voda, 30% (w/v) akrylamid (29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) bisakrylamid), pufr B ($pH\ 6,8$; $1,0\ M\ Tris/HCl$), 10% (w/v) SDS, 10% (w/v) (APS), TEMED. Mezi 1 mm široká čistá, odmaštěná skla uchycená v elektroforetické soustavě pro tuhnutí gelů (BIO-RAD) byl pipetován roztok pro přípravu separačního gelu přibližně do výšky 6 cm a převrstven 1 cm destilované vody, aby bylo zabráněno nerovnoměrnému ztuhnutí gelu. Po uplynutí 30

minut, během kterých probíhala polymerace, byla voda slita a do sucha odsáta pomocí filtračního papíru. Poté byl na separační gel nanesen roztok pro přípravu zaostřovacího gelu, do kterého byl umístěn deseti-jamkový hřeben. Po ztuhnutí gelu byl hřeben opatrně odstraněn a skla zasunuta do elektroforetického stojánu, který byl vložen do elektroforetické vany (BIO-RAD). Vana i vzniklý prostor mezi skly byly naplněny elektrolytickým pufrům (pH 8,3; 0,192 M *glycin*, 0,025 M *Tris/HCl*, 0,1% (w/v) *SDS*) tak, aby byly jamky pod hladinou.

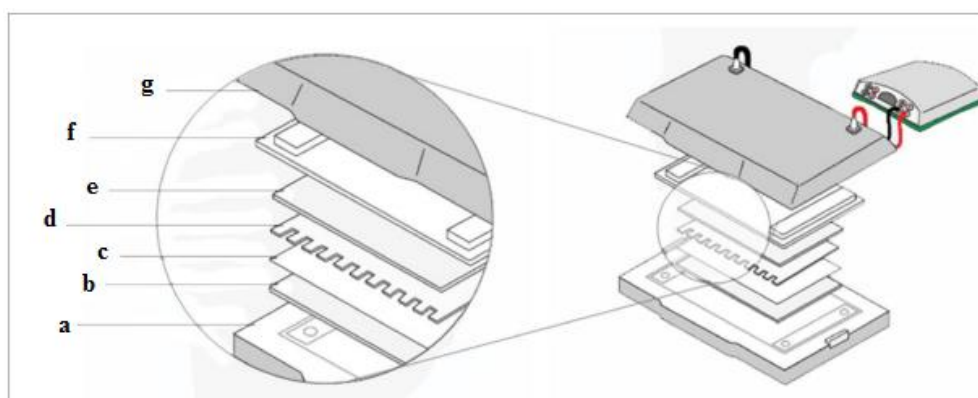
Vzorky mikrosomální frakce jater, ledvin a plic byly vhodně naředěny na koncentraci 75 μ g proteinu destilovanou vodou a 4x koncentrovaným vzorkovým pufrům (pH 6,8; 0,63 M *Tris/HCl*, 2% (w/v) *SDS*, 10% (v/v) *glycerol*, 5% (v/v) *2-merkaptoethanol*, 0,003% (w/v) *bromfenolová modř*). Celkový objem byl v případě mikrosomální frakce jater a ledvin 20 μ l a plic 35 μ l. Jako pozitivní kontrola byli použity roztoky supersomální CYP2C11 a CYP1A1. Vzorky byly 6 minut vařeny (Incubator mini Dry Bath) a pomocí mikrostřičkačky Hamilton s tupou jehlou nanášeny do jamek. Dále bylo pipetováno 5 μ l standardu molekulových hmotností (Marker Precision Plus Protein Dual Color). Elektroforetická aparatura byla uzavřena víkem a připojena ke zdroji napětí (BIO-RAD). Elektroforéza probíhala 75 minut při napětí 200 V.

Po skončení elektroforézy byl gel ponechán 1 hodinu v barvicí lázni (0,25% (w/v) *Coomassie Brilliant Blue R-250*, 46% (v/v) *ethanol*, 9,2% (v/v) *kyselina octová*) za třepání (ČSAV vývojové dílny) a poté přenesen do odbarvovací lázně (25% (v/v) *ethanol*, 10% (v/v) *kyselina octová*), ve které byl ponořen přes noc. Gel byl oskenován.

3.2.6 Metoda Western blot

Metoda Western blot (WB) patří mezi tzv. přenosové techniky a slouží k detekci velikosti či relativního množství určitého proteinu ve směsi proteinů⁵⁰. Metodě proteinového přenosu předchází SDS-PAGE, pomocí které jsou proteiny ve vzorku rozděleny podle své molekulové hmotnosti. Následuje přenos na PVDF membránu a tzv. blokace membrány. Hledané proteiny jsou následně označeny pomocí specifické primární protilátky, na kterou se v dalším kroku váže sekundární protilátka nesoucí enzym umožňující vizualizaci^{50,54}. U WB se jako kontrola správně nanášeného množství využívá proteinu, který je ve vzorcích exprimován konstitutivně. Příkladem je glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenasa (GAPDH)⁵⁴.

Po skončení SDS-PAGE byl označený gel ponechán 30 minut v přenosovém pufru ($pH\ 8,3$; $0,192\ M\ glycin$, $0,05\ M\ Tris/HCl$). Bylo nastříháno šest filtračních papírů Whatman a PVDF membrána. Filtrační papíry byly namočený do přenosového pufru a membrána byla tzv. aktivována: nejprve byla opatrně pinzetou vyjmuta z ochranného obalu a 30 s ponechána v methanolu, poté v destilované vodě a nakonec přibližně 5 minut v přenosovém pufru. Aparatura blotovacího přístroje (Fastblot B43, Biometra) byla sestavena dle obrázku 9 a připojena ke zdroji (EPS 301, Amersham Farmacia Biotech).



Obrázek 9: Kazeta pro přenos proteinů.

Na schématu je znázorněno sestavení blotovací aparatury: tři filtrační papíry (b), membrána (c), gel (d), tři filtrační papíry (f), ochranné pouzdro (g). Spodní díl blotovacího přístroje představuje anodu (a), horní díl katodu (f)⁵³.

Byl spočítán obsah plochy membrány a pomocí následujících úměr nastavena hodnota elektrického proudu:⁵⁵

na $1\ cm^2$ membrány 0,8 mA 10 min

Poté:

na $1\ cm^2$ membrány 3,5 mA 45 min

Celková doba přenosu činila 55 minut. Po skončení elektropřenosu byla membrána smočena přibližně 20 s v červené barvicí lázni PONCEAU pro kontrolu přenosu proteinů ($0,5\% PONCEAU$ červeň v 1% kyselině octové) a následně omyta destilovanou vodou ze stříčky. Poté byla ponořena do 5% blokovacího roztoku odtučněného sušeného mléka a pufru PBS-Triton X-100 ($pH\ 7,2$; $1,8\ mM\ Na_2HPO_4$, $1\ mM\ NaH_2PO_4$, $0,134\ M\ NaCl$; $0,3\% (w/v) TRITON\ X-100$) a ponechána 1 hodinu v chladu za stálého třepání (Mini rocker

MR-1, Biosan). Proteiny mléčného kaseinu se navázaly na všechna místa na membráně, kde nebyly přítomny proteiny po přenosu, čímž bylo zabráněno nescifickým interakcím mezi primární protilátkou a povrchem membrány⁵⁶. Po blokaci byla membrána rozstřížena v místě odpovídajícímu cca 40 kD na dvě části. Spodní část membrány byla ponořena do roztoku primární králičí protilátky proti GAPDH v blokovacím roztoku (ředění 1:5000), horní část membrány do roztoku primární protilátky specificky se vázající na příslušný cytochrom P450. Pro detekci CYP2C11 byla jako primární protilátka použita králičí protilátka proti potkanímu CYP2C11 (ředění 1:1500) a pro detekci CYP1A1 primární koží protilátka proti potkanímu CYP1A1 (ředění 1:2500). Inkubace s protilátkou probíhala v chladové místnosti přes noc za stálého třepání (Mini Rocker MR-1, Biosan).

Druhý den byly obě části membrány 4x5 minut promyty v blokovacím roztoku a ponořeny do roztoku sekundární protilátky, která byla konjugována s alkalickou fosfatázou (ALP). Pro detekci CYP2C11 a GAPDH byla jako sekundární protilátka použita koží IgG-AP protilátka proti králičí primární protilátce (ředění 1:1429) a pro detekci CYP1A1 sekundární králičí IgG-AP protilátka proti koží primární protilátce (ředění 1:1429). Inkubace probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě za třepání (ČSAV vývojové dílny). Po inkubaci následovalo promývání: 2krát 5 minut v blokovacím roztoku, 2krát 5 minut v pufru PBS-Triton X-100 a 5 minut v destilované vodě. Posledním krokem westernového přenosu byla vizualizace proteinů pomocí substrátu pro alkalickou fosfatázu. Byl připraven vyvolávací roztok smícháním 5 ml pufru pro ALP detekci (*pH 9; 100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂.6H₂O*), 33 μ l NBT (*nitro blue tetrazolium chlorid v 70% N,N-dimethylformamidu*) a 16,5 μ l BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát ve 100% dimethylformamidu*). Vyvolávání probíhalo přibližně 3 minuty, poté bylo zastaveno smočením membrány v destilované vodě. Membrány byly osušeny mezi filtračními papíry, oskenovány a vyhodnoceny v programu ImageJ zjištěním ploch jednotlivých zón, které byly následně vztaženy na jednotkovou hodnotu kontroly. V případě opakovaného měření byly hodnoty obou stanovení zprůměrovány. Ze získaných výsledků byly v programu Microsoft Office Excel 2007 zhotoveny grafy, které představují relativní množství příslušných CYP v jednotlivých premedikovaných vzorcích MF.

3.2.7 Stanovení specifické aktivity CYP2C11: 16 α -hydroxylace testosteronu

Aktivita CYP2C11 byla stanovena jako 16 α -hydroxylace testosteronu (TST). V mikrozkušavkách Eppendorf byly v paralelním uspořádání připraveny inkubační směsi o celkovém objemu 500 μ l a následujícím složení:

- fosfátový pufr (*pH* 7,4; 0,1 M KH_2PO_4)
- potkaní jaterní mikrosomy ($c_{proteinů} = 0,5$ mg/ml)
- 50 μ M TST (2,5 μ l 10 mM zásobního roztoku TST v methanolu)
- NADPH generující systém (GS): 1 mM $NADP^+$, 10 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

Do 2 ml mikrozkušavek Eppendorf byly pipetovány jednotlivé složky inkubační směsi ve výše uvedeném pořadí a následně 5 minut preinkubovány při 37°C bez GS (Thermomixer Compact, Eppendorf). Reakce byla zahájena přidáním 50 μ l GS. Inkubace probíhala za stálého třepání (Thermomixer Compact, Eppendorf, 400 RPM, 37°C) 15 minut za přístupu vzduchu. Reakce byla zastavena přidáním 100 μ l roztoku 1M Na_2CO_3 /2M NaCl a následně 10 s vortexována (Vortex Mixer VX-200, Labnet). Poté byl k reakční směsi přidán 1 ml ethylacetátu a směs byla 2 minuty třepána (Thermomixer Compact, Eppendorf, 1400 RPM). K oddělení organické a vodné fáze byla směs centrifugována 3 minuty (centrifuga Eppendorf 5418, úhlový rotor 18x1,5 ml, 13000 RPM). Horní organická fáze byla odebrána do 1,5ml mikrozkušavek Eppendorf a k vodné fázi byl opět přidán 1 ml ethylacetátu. Extrakce byla provedena ještě jednou za výše uvedených podmínek. Extrakty byly odpařeny do sucha na vakuové odparce (CentriVap DNA Concentrator, Labconco, 40°C). Před HPLC analýzou byly odparky rozpuštěny ve 30 μ l methanolu, vortexovány a centrifugovány 20 s (minicentrifuga SpectrafugeTM, úhlový rotor 6x2,0 ml, 6000 RPM).

3.2.7.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vzorky byly analyzovány metodou HPLC s UV-detekcí (Dionex pump P580, ASI-100 Automated Sampler Injector) na koloně Nucleosil 100-5 C18 (250/4, Macherey-Nagel) při teplotě 35°C. Analýza probíhala v isokratickém uspořádání s konstantním průtokem mobilní fáze 0,7 ml/min a trvala 20 minut. Mobilní fáze představovala 65%

(w/v) roztok methanolu a byla připravena bezprostředně před měřením do tmavé lahve a následně sonikována 30 minut v ultrazvukové lázni za přítupu vzduchu (Elmasonic P). Nástřik vzorku na kolonu činil 20 μ l. Standard byl připraven smícháním 3 μ l 10 mM TST a 27 μ l methanolu. Detekce TST a jeho metabolitů probíhala při vlnové délce 254 nm a následné vyhodnocení bylo provedeno metodou tzv. vnějšího standardu s použitím kalibrační křivky. Získané výsledky byly statisticky zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2007 a poté byla spočítána aktivita CYP2C11.

3.2.8 Stanovení specifické aktivity CYP2C6: 4'-hydroxylace diklofenaku

Aktivita CYP2C6 byla stanovena jako 4'-hydroxylace diklofenaku (Dic). V mikrozkuvkách Eppendorf byly v paralelním uspořádání připraveny inkubační směsi o celkovém objemu 500 μ l a následujícím složení:

- fosfátový pufr (pH 7,4; 0,1 M KH_2PO_4)
- potkaní jaterní mikrosomy ($c_{proteinů} = 0,5$ mg/ml)
- 50 μ M Dic (5 μ l 5 mM zásobního roztoku Dic v methanolu)
- NADPH generující systém (GS): 1 mM $NADP^+$, 10 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

Postup přípravy inkubačních směsí byl analogický s postupem uvedeným v kapitole 3.2.6. Reakce byla zastavena přidávkem 100 μ l ledového acetonitrilu a extrahována 1 ml diethyletheru. Extrakty byly odpařeny do sucha na vakuové odparce (CentriVap DNA Concentrator, Labconco, 35°C). Před HPLC analýzou byly odparky rozpuštěny ve 30 μ l methanolu, vortexovány a centrifugovány 20 s (minicentrifuga SpectrafugeTM, úhlový rotor 6x2,0 ml, 6000 RPM).

3.2.8.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vzorky byly analyzovány metodou HPLC s UV-detekcí (Dionex pump P580, ASI-100 Automated Sampler Injector) na koloně Nucleosil 100-5 C18 (250/4, Macherey-Nagel) při teplotě 35°C. Analýza probíhala v isokratickém uspořádání s konstantním průtokem mobilní fáze 0,5 ml/min a trvala 15 minut. Mobilní fáze představovala směs acetonitrilu a acetátového pufru (pH 5,0; 75 mM $CH_3COONa \cdot 3H_2O$, pH upraveno 50%

(w/v) CH_3COOH) v poměru 1,5:2. Oba roztoky byly připraveny těsně před měřením do čisté tmavé lahve a poté sonikovány 30 minut za přístupu vzduchu (Elmasonic P). Nástřik vzorku na kolonu činil 20 μ l. Standard byl připraven smícháním 3 μ l 5 mM Dic a 27 μ l methanolu. Detekce Dic a jeho metabolitu probíhala při vlnové délce 280 nm a následné vyhodnocení bylo provedeno metodou tzv. vnějšího standardu s použitím kalibrační křivky. Získané výsledky byly statisticky zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2007 a poté byla spočítána aktivita CYP2C6.

3.2.9 Stanovení specifické aktivity CYP1A1: oxidace Sudanu I

Aktivita CYP1A1 byla stanovena jako oxidace Sudanu I. Ve skleněných zkumavkách byly v paralelním uspořádání připraveny inkubační směsi o celkovém objemu 500 μ l a následujícím složení:

- fosfátový pufr (pH 7,4; 50 mM KH_2PO_4)
- potkaní jaterní mikrosomy ($c_{proteinů} = 0,5$ mg/ml)
- 100 μ M Sudanu I (10 μ l 5 mM zásobního roztoku Sudanu I v methanolu)
- 1 mM NADPH

Do skleněných zkumavek byly pipetovány jednotlivé složky inkubační směsi ve výše uvedeném pořadí a následně 5 minut preinkubovány při 37°C bez NADPH (vodní lázeň Julabo TW8). Reakce byla zahájena přidáním 50 μ l NADPH. Inkubace probíhala 30 minut za stálého třepání (Scientific G24 Environmental Incubator Shaker, 250 RPM, 37°C) za přístupu vzduchu. Reakce byla zastavena 1 ml ethylacetátu a následně 30 s vortexována (Vortex Mixer VX-200, Labnet). Poté byla reakční směs 5 minut centrifugována (centrifuga EBA 270, úhlový rotor 6x15 ml, 3000 RPM). Organická fáze byla odebrána do 1,5ml mikrozkušavek Eppendorf a k vodné fázi bylo přidáno 950 μ l ethylacetátu. Extrakce byla provedena ještě jednou za výše uvedených podmínek. Extrakty byly odpařeny do sucha na vakuové odparce (CentriVap DNA Concentrator, Labconco, 37°C). Před HPLC analýzou byly odparky rozpuštěny ve 30 μ l methanolu, vortexovány a centrifugovány 20 s (minicentrifuga SpectrafugeTM, úhlový rotor 6x2,0 ml, 6000 RPM).

3.2.9.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vzorky byly analyzovány metodou HPLC s UV-detekcí (Dionex pump P580, ASI-100 Automated Sampler Injector) na koloně Nucleosil 100-5 C18 (250/4, Macherey-Nagel) při teplotě 35°C. Analýza probíhala v isokratickém uspořádání s konstantním průtokem mobilní fáze 0,7 ml/min a trvala 13 minut. Mobilní fáze představovala směs uhličitanového pufru (pH 8,5; 0,1 M NH_4HCO_3) a methanolu v poměru 1:9. Uhličitanový pufr byl připraven těsně před měřením a spolu s methanolem slit do tmavé lahve. Pro odstranění bublinek vzduchu byla mobilní fáze sonikována 30 minut za přístupu vzduchu (Elmasonic P). Nástřik vzorku na kolonu činil 20 μ l. Standard byl připraven smícháním 10 μ l 5 mM Sudanu I a 20 μ l methanolu. Detekce Sudanu I a jeho metabolitů probíhala při vlnové délce 480 nm a následné vyhodnocení bylo provedeno metodou tzv. vnějšího standardu s použitím kalibrační křivky. Získané výsledky byly statisticky zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2007 a poté byla spočítána aktivita CYP21A1.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Charakterizace izolované mikrosomální frakce

Předkládaná bakalářská práce se zabývá vlivem endokrinních disruptorů E2, EE2, BaP a jejich kombinacemi na hladiny a specifické aktivity enzymů CYP1A1 a CYP2C u potkanů *in vivo*. Pro studium, které bylo součástí širšího výzkumu, bylo nutné nejprve izolovat mikrosomální frakci (MF) jater, ledvin a plic potkanů nepremedikovaných (kontrolních) a premedikovaných uvedenými ED a jejich kombinacemi (viz tabulka 1, str. 27). U těchto vzorků byla stanovena koncentrace proteinů, koncentrace CYP a vypočítán specifický obsah CYP.

Koncentrace proteinů ve vzorcích izolované MF byla stanovena metodou BCA⁵¹ a koncentrace CYP byla stanovena spektrální metodou založenou na specifické absorpci komplexu CYP v redukovaném stavu s oxidem uhelnatým při vlnové délce 450 nm³⁸. Vzhledem ke zjištěným velmi nízkým koncentracím proteinů u vzorků mikrosomální frakce plic, byla koncentrace CYP stanovena pouze u vzorků MF jater a ledvin. Specifický obsah CYP, který představuje jednu z hlavních charakteristik MF, byl vypočítán jako poměr koncentrace CYP a koncentrace proteinů ve vzorcích MF. Veškeré parametry jsou uvedeny v tabulce 4.

Z tabulky 4 je patrné, že k největšímu zvýšení specifického obsahu CYP oproti kontrole došlo u vzorků MF jater potkanů premedikovaných BaP, a to přibližně 1,5x, dále pak u vzorků MF jater potkanů premedikovaných BaP v kombinaci s E2 (nárůst 1,4x). U vzorků MF jater potkanů premedikovaných kombinací EE2 a E2 a kombinací BaP a EE2, se specifický obsah CYP oproti kontrole zvýšil pouze nepatrně. Naopak u vzorků MF jater potkanů premedikovaných samotným EE2 nebo E2 došlo k určitému snížení specifického obsahu CYP oproti kontrole.

U vzorků MF ledvin došlo ke zvýšení specifického obsahu CYP oproti kontrole u potkanů premedikovaných BaP (nárůst 1,3x) a kombinací BaP a E2 (nárůst 1,7x). Ve vzorcích MF ledvin potkanů premedikovaných samotným E2 a kombinací BaP a EE2 se specifický obsah CYP prakticky nezměnil. Mírné snížení specifického obsahu CYP oproti kontrole je patrné u vzorků MF ledvin potkanů premedikovaných EE2 a kombinací EE2 a E2.

Tabulka 4: Charakterizace vzorků izolované MF jater, ledvin a plic potkanů nepremedikovaných a premedikovaných E2, EE2, BaP a jejich kombinacemi.

		CTRL	BaP	EE2	E2	BaP+EE2	BaP+E2	EE2+E2
JÁTRA	$c_{\text{prot.}}$ [mg.ml ⁻¹]	13,0	20,3	16,9	32,0	14,1	17,1	19,7
	c_{CYP} [μM]	5,54	12,92	6,86	10,02	6,33	9,85	9,85
	sp.o.CYP [nmol.mg ⁻¹]	0,426	0,637	0,406	0,313	0,449	0,576	0,500
LEDVINY	$c_{\text{prot.}}$ [mg.ml ⁻¹]	9,2	7,1	6,7	7,3	7,6	7,1	11,2
	c_{CYP} [μM]	0,95	0,97	0,55	0,84	0,88	1,23	0,95
	sp.o.CYP [nmol.mg ⁻¹]	0,103	0,137	0,082	0,115	0,116	0,173	0,085
PLÍCE	$c_{\text{prot.}}$ [mg.ml ⁻¹]	4,7	2,9	4,1	3,1	5,2	3,8	5,2

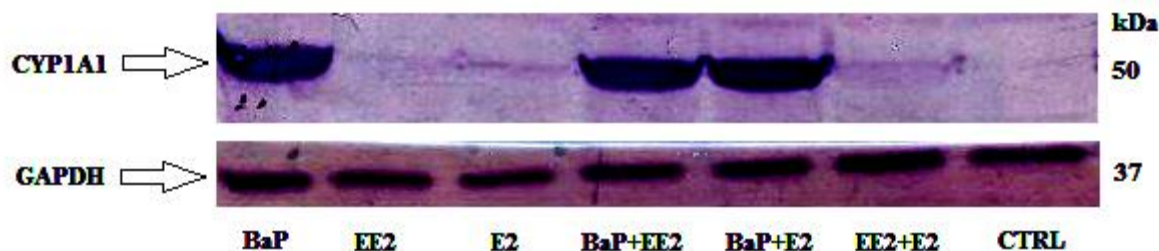
$c_{\text{prot.}}$ koncentrace proteinů, c_{CYP} koncentrace cytochromu P450, sp.o.CYP specifický obsah cytochromu P450 ve vzorcích izolované MF jater, ledvin a plic potkanů premedikovaných E2 (17β-estradiol), EE2 (17α-ethinylestradiol), BaP (benzo[a]pyren) a jejich kombinacemi. CTRL značí MF kontrolních nepremedikovaných potkanů.

Z výše uvedených hodnot vyplývá, že po premedikaci potkanů BaP a jeho kombinacemi s EE2 a E2 dochází k nárůstu specifického obsahu CYP oproti kontrole jak v játrech, tak v ledvinách, což naznačuje zvýšenou expresi těchto enzymů. Hodnoty specifického obsahu CYP u vzorků MF jater potkanů premedikovaných pouze EE2 nebo E2 a u vzorků MF ledvin potkanů premedikovaných EE2 a kombinací EE2 a E2 napovídají možnému snížení exprese CYP oproti kontrolním vzorkům.

4.2. Studium vlivu E2, EE2, BaP a jejich kombinací na míru exprese CYP1A1

Míra exprese CYP1A1 po premedikaci potkanů výše uvedenými endokrinními disruptory a jejich kombinacemi byla analyzována metodou Western blot (WB). Detekce CYP1A1 byla prováděna u všech tří odebraných orgánů (játra, ledviny, plíce). Pro kontrolu

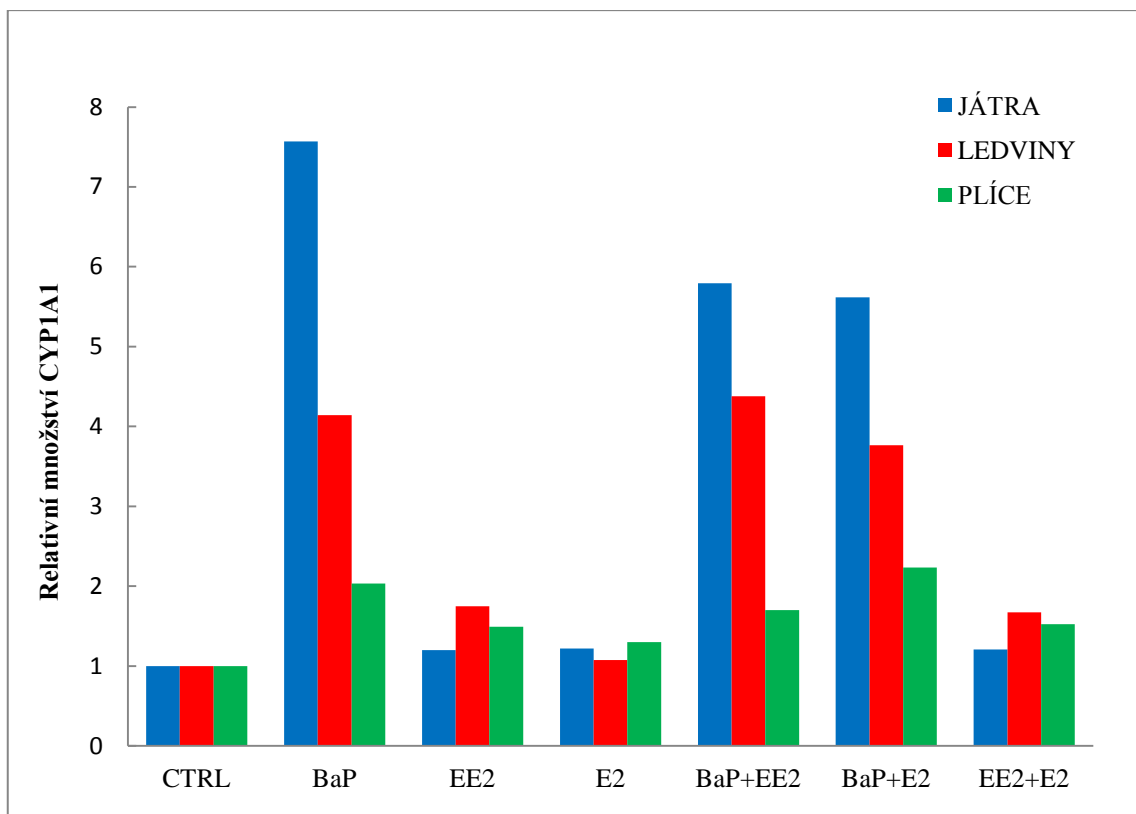
správně naneseného množství proteinu byla použita GAPDH, která je ve vzorcích exprimována konstitutivně. Na obrázku 10 je ukázka membrány s detekovaným CYP1A1 ve vzorcích MF jater potkanů premedikovaných uvedenými ED a jejich kombinacemi. Z obrázku jasně vyplývá, že u vzorků MF jater potkanů premedikovaných BaP a kombinacemi BaP s EE2 nebo E2 dochází k silné indukci CYP1A1.



Obrázek 10: Detekce CYP1A1 u vzorků MF jater potkanů premedikovaných E2, EE2, BaP a jejich kombinacemi.

Nanáška proteinů činila 75 µg proteinů/jamku a jako kontrola správně naneseného množství byla použita GAPDH. BaP značí MF jater potkanů premedikovaných benzo[a]pyrenem, EE2 MF jater potkanů premedikovaných 17 α -ethinylestradiolem, E2 MF jater potkanů premedikovaných 17 β -estradiolem a CTRL MF kontrolních nepremedikovaných potkanů.

Na obrázku 11 (str. 41) je uveden sloupcový graf, který představuje relativní množství CYP1A1 ve vzorcích izolované MF jater, ledvin a plic premedikovaných potkanů. Z grafu vyplývá, že zatímco u vzorků MF jater potkanů premedikovaných BaP došlo ke zvýšení exprese CYP1A1 7,6x, u vzorků MF jater potkanů premedikovaných samotným EE2 a E2 nedošlo ke změně exprese tohoto enzymu oproti vzorkům MF jater potkanů nepremedikovaných (kontrolních). Pokud však byly EE2 a E2 potkanům podávány spolu s BaP, bylo u těchto vzorků MF patrné zvýšení exprese CYP1A1. U vzorků MF jater potkanů premedikovaných BaP spolu s EE2 došlo ke zvýšení exprese CYP1A1 oproti kontrole 5,8x a u vzorků MF jater potkanů premedikovaných kombinací BaP a E2 došlo ke zvýšení množství tohoto enzymu 5,6x oproti kontrole. Ke zvýšení exprese CYP1A1 oproti kontrolní skupině došlo i u vzorků MF potkanů premedikovaných BaP a jeho kombinací s EE2 a E2 i v dalších orgánech (ledviny, plíce), avšak v játrech byl tento efekt jednoznačně nejvyšší. K velmi mírnému zvýšení exprese CYP1A1 dochází i ve vzorcích MF ledvin a plic potkanů premedikovaných EE2 a jeho kombinací s E2.



Obrázek 11: Relativní množství CYP1A1 ve vzorcích izolované MF jater, ledvin a plic potkanů premedikovaných E2, EE2, BaP a jejich kombinacemi.

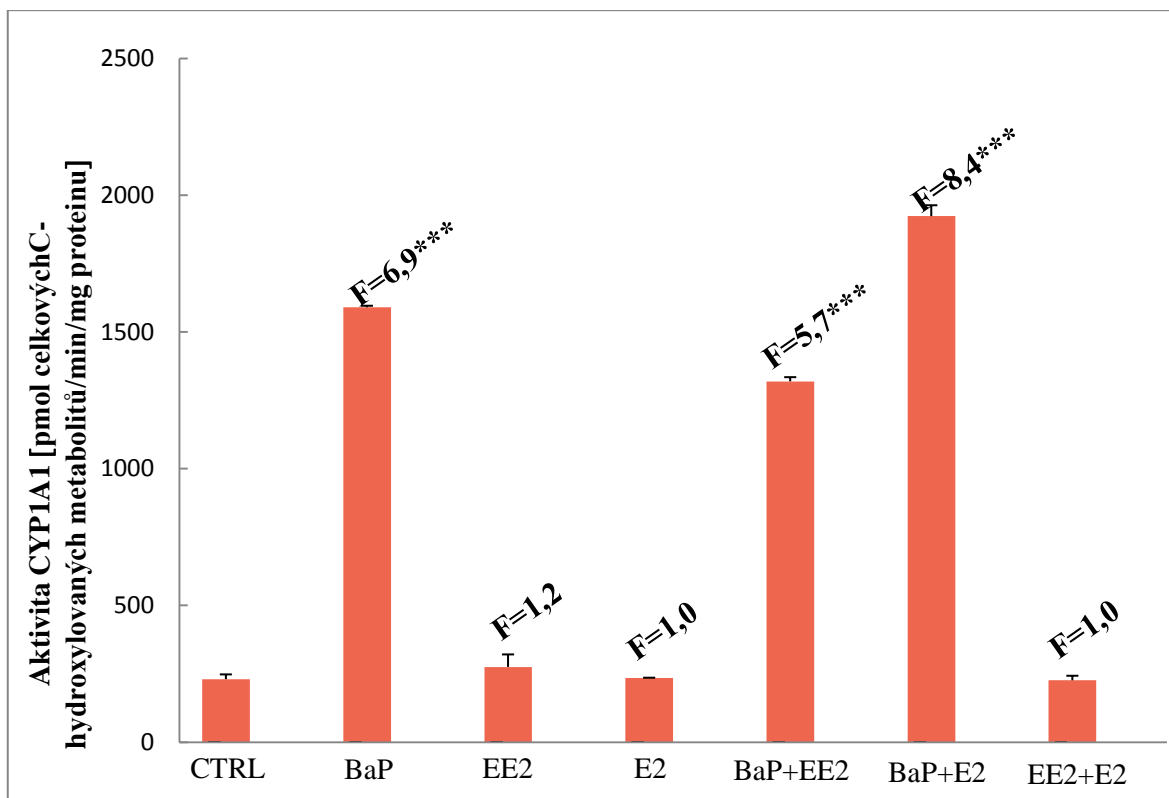
Nanáška činila 75 µg proteinů/jamku. BaP značí MF jater potkanů premedikovaných benzo[a]pyrenem, EE2 MF jater potkanů premedikovaných 17α-ethinylestradiolem, E2 MF jater potkanů premedikovaných 17β-estradiolem a CTRL MF kontrolních nepremedikovaných potkanů.

Jak již bylo uvedeno, hlavním enzymem podílejícím se na metabolismu BaP v organismu je CYP1A1, který katalyzuje jeho metabolickou aktivaci za vzniku vysoce toxického BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxidu (BPDE), jenž je schopný tvořit interkaláty s DNA³¹. Je prokázáno, že BaP je nejenom substrátem tohoto enzymu, ale i jeho induktorem. Schopnost BaP vázat se na receptor aromatických uhlovodíků (AhR) a aktivovat ho, vede ke zvýšení exprese CYP1A1^{31,32,43}. Indukční vliv BaP na expresi CYP1A1 ve všech studovaných orgánech potvrzují i výše uvedené výsledky. Z výsledků dále vyplývá, že kombinované podání BaP spolu s EE2 nebo E2 laboratorním potkanům vede také ke zvýšení exprese CYP1A1, avšak nižšímu nežli podání samotného BaP. Pokud jsou EE2 či E2 laboratorním potkanům podány odděleně, nemají na expresi CYP1A1 v játrech žádný vliv, zatímco v ledvinách a plicích mírně jeho expresi zvyšují a to i pokud jsou podány v kombinaci. Vzhledem k nízkým odezvám se zvýšení exprese CYP1A1 v MF

ledvin a plic potkanů premedikovaných EE2 a jeho kombinací s E2 nedá považovat za významné.

4.3 Studium vlivu E2, EE2, BaP a jejich kombinací na specifickou aktivitu CYP1A1

V práci byl dále studován vliv uvedených ED a jejich kombinací na specifickou aktivitu CYP1A1, která byla stanovena jako oxidace Sudanu I. Vzhledem k velmi nízkým hodnotám koncentrace CYP v MF ledvin a plic (tabulka 4, str. 39), byla specifická aktivita CYP1A1 stanovena pouze u vzorků MF jater potkanů premedikovaných výše zmíněnými sloučeninami. Vzorky byly analyzovány metodou HPLC s UV-detekcí a získané výsledky byly statisticky zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2007. Změny specifické aktivity CYP1A1 po premedikaci potkanů výše uvedenými ED a jejich kombinacemi ukazuje obrázek 12 (str. 43). Ke zvýšení specifické aktivity CYP1A1 oproti kontrolnímu vzorku došlo v případě, kdy byly laboratorní potkani premedikováni BaP či jeho kombinací s EE2 nebo E2. U vzorků MF jater potkanů premedikovaných pouze BaP se specifická aktivita CYP1A1 zvýšila takřka 7x, v kombinaci BaP a EE2 narostla 5,7x oproti kontrole. Největší zvýšení aktivity CYP1A1 oproti kontrole je pozorováno u MF jater potkanů premedikovaných BaP spolu s endogenním E2, kdy se specifická aktivita sledovaného enzymu zvýšila skoro 8,5x oproti kontrolnímu vzorku. Premedikace potkanů E2 ani EE2 neměla na specifickou aktivitu CYP1A1 žádný vliv.



Obrázek 12: Specifické aktivity CYP1A1 ve vzorcích izolované MF jater potkanů premedikovaných E2, EE2, BaP a jejich kombinacemi.

Specifická aktivita CYP1A1 byla stanovena jako oxidace Sudanu I. BaP značí MF jater potkanů premedikovaných benzo[a]pyrenem, EE2 MF jater potkanů premedikovaných 17 α -ethinylestradiolem, E2 MF jater potkanů premedikovaných 17 β -estradiolem a CTRL MF kontrolních nepremedikovaných potkanů. F značí indukci vzorků a hvězdičky hladinu významnosti: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Počet měření: 2.

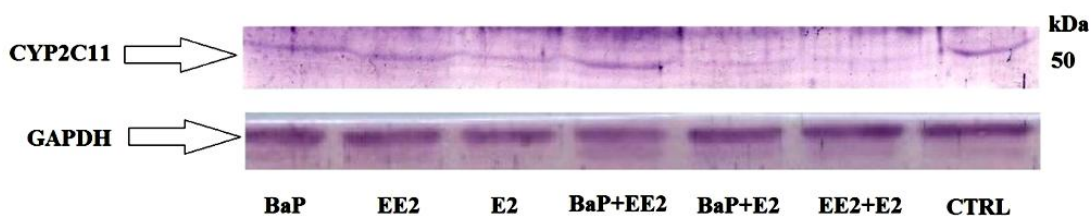
Jak již bylo řečeno, dřívější studie^{31,32,43} prokázaly, že BaP působí jako induktor enzymu CYP1A1, který se účastní jeho metabolické aktivace. CYP1A1 hraje významnou roli v biotransformaci Sudanu I, čehož se využívá ke stanovení specifické aktivity tohoto enzymu. Sudan I je organická látka řadící se do skupiny tzv. azobarviv. Díky svému typickému oranžovému zabarvení se ještě donedávna používal jako barvivo přidávané nejen do průmyslových výrobků, ale i do některých potravin. Pro své karcinogenní a mutagenní účinky na myši však byl z běžného průmyslu stažen a označen jako látka podezřelá z karcinogenity^{57,58}.

Výše popsané výsledky opět potvrzují, že BaP a jeho kombinace s E2 a EE2 zvyšují expresi CYP1A1. Také bylo prokázáno, že pokud byly tyto ED potkanům podávány samostatně bez BaP, k ovlivnění specifické aktivity CYP1A1 stanovené jako

oxidace Sudanu I takřka nedocházelo. Tato zjištění tedy korespondují s výsledky získanými metodou Western blot (obrázek 11, str. 41). Odlišnost je patrná pouze v případě vzorků MF jater potkanů premedikovaných kombinací BaP a E2, ve kterých došlo k nejvyššímu nárůstu specifické aktivity CYP1A1 oproti kontrole, zatímco exprese tohoto enzymu v játrech byla nejvyšší po premedikaci potkanů samotným BaP.

4.4 Studium vlivu E2, EE2, BaP a jejich kombinací na míru exprese CYP2C11

Dalšími studovanými enzymy jsou cytochromy P450 podrodiny 2C, které hrají významnou roli v metabolismu EE2¹⁸. Míra exprese CYP2C11 po premedikaci potkanů výše uvedenými endokrinními disruptory a jejich kombinacemi byla analyzována metodou Western blot (WB). CYP2C11 byl detekován u všech odebraných orgánů (játra, ledviny, plíce). Pro kontrolu správně naneseného množství proteinu byla použita GAPDH, která je ve vzorcích exprimována konstitutivně. Na obrázku 13 je uvedena ukázka membrány s detekovaným CYP2C11 ve vzorcích MF jater potkanů nepremedikovaných (kontrolních) a premedikovaných uvedenými sloučeninami a jejich kombinacemi. Detekce CYP2C11 byla ztížena vysokou nespecifičností použité primární králičí protilátky proti potkanímu CYP2C11, která označila velké množství zón.

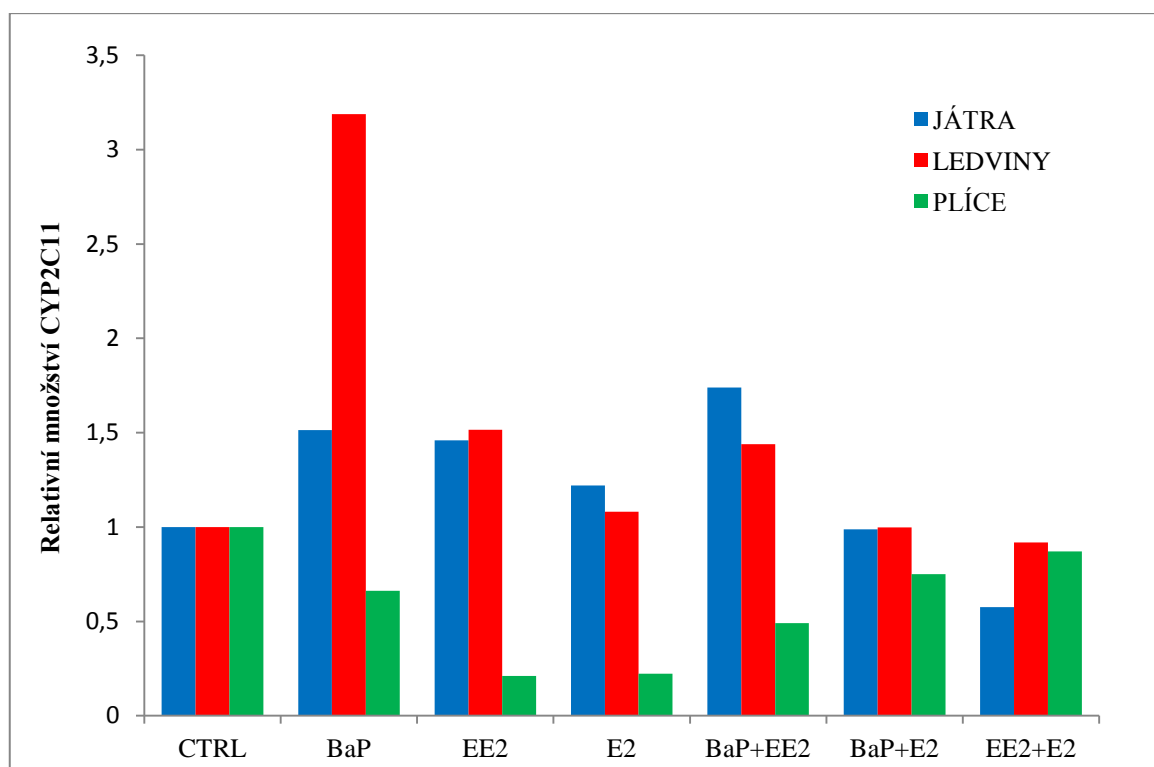


Obrázek 13: Detekce CYP2C11 u vzorků MF jater potkanů premedikovaných E2, EE2, BaP a jejich kombinacemi.

Nanáška proteinů činila 75 µg proteinů/jamku a jako kontrola správně naneseného množství byla použita GAPDH. BaP značí MF jater potkanů premedikovaných benzo[a]pyrenem, EE2 MF jater potkanů premedikovaných 17 α -ethinylestradiolem, E2 MF jater potkanů premedikovaných 17 β -estradiolem a CTRL MF kontrolních nepremedikovaných potkanů.

Na obrázku 14 (str. 45) je znázorněn sloupcový graf, který představuje relativní množství CYP2C11 ve vzorcích mikrosomální frakce jater, ledvin a plic potkanů premedikovaných uvedenými endokrinními disruptory a jejich kombinacemi. Z grafu je

patrné, že k mírnému zvýšení exprese CYP2C11 oproti kontrole došlo u vzorků MF jater potkanů premedikovaných BaP, EE2 a E2, k výraznějšímu zvýšení exprese tohoto enzymu (nárůst 1,7x) došlo u vzorků MF jater potkanů premedikovaných kombinací BaP a EE2. Zatímco u MF jater potkanů premedikovaných kombinací látek BaP a E2 se exprese CYP2C11 oproti kontrole neliší, u vzorků MF jater potkanů premedikovaných kombinací EE2 a E2 dochází ke snížení exprese CYP2C11 skoro o polovinu. K výraznému zvýšení exprese CYP2C11 došlo pouze u vzorků MF ledvin potkanů premedikovaných samotným BaP. Exprese CYP2C11 se v této MF zvýšila 3,1x oproti MF ledvin potkanů nepremedikovaných. Zatímco u vzorků MF ledvin potkanů premedikovaných EE2 a kombinací BaP a EE2 došlo k mírnému zvýšení exprese CYP2C11, u MF ledvin potkanů premedikovaných kombinací EE2 a E2 se exprese tohoto enzymu mírně snížila. U vzorků MF plic dochází u všech typů premedikací potkanů ke snížení exprese CYP2C11 (viz dále).



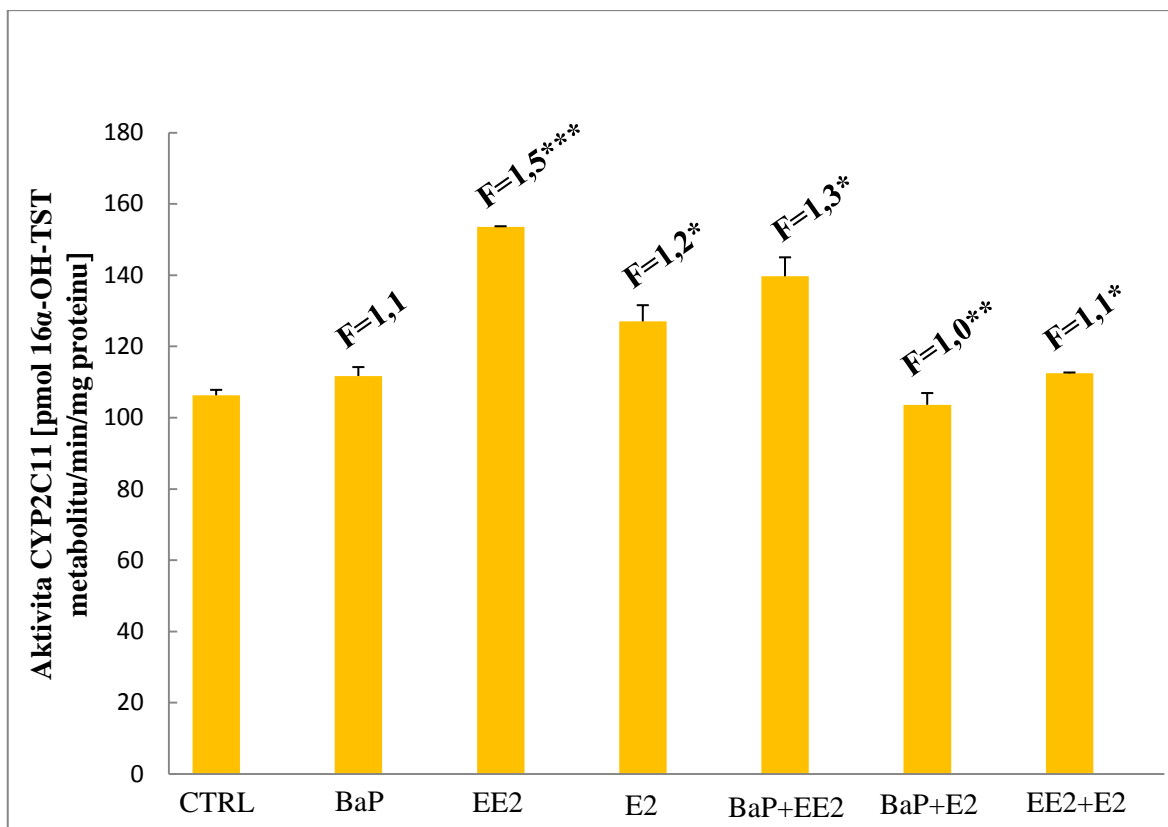
Obrázek 14: Relativní množství CYP2C11 ve vzorcích izolované MF jater, ledvin a plic potkanů premedikovaných E2, EE2, BaP a jejich kombinacemi.

Nanáška činila 75 µg proteinů/jamku. BaP značí MF jater potkanů premedikovaných benzo[a]pyrenem, EE2 MF jater potkanů premedikovaných 17α-ethinylestradiolem, E2 MF jater potkanů premedikovaných 17β-estradiolem a CTRL MF kontrolních nepremedikovaných potkanů.

Jak již bylo řečeno, na metabolismu EE2 se primárně podílí enzym CYP2C11, který katalyzuje přeměnu EE2 na 2-OH-EE2, jenž představuje hlavní produkt hydroxylačních reakcí^{18,23,47}. Je známo, že EE2 může působit jako ireverzibilní inhibitor CYP2C. Mechanismus této inhibice spočívá v oxidaci acetylenové skupiny EE2 za vzniku silného nukleofilu acetylen-oxidu, který je schopný se zpětně kovalentně vázat na protein cytochromu P450 nebo alkylovat prostetickou skupinu enzymu a působit jako tzv. sebevražedný substrát. Inaktivace CYP2C11 představuje velké riziko spojené se vznikem nežádoucích interakcí v organismu⁴⁶⁻⁴⁸. Takto by se dalo vysvětlit snížení exprese CYP2C11 v MF jater potkanů premedikovaných kombinací EE2 a E2 a v MF plic potkanů premedikovaných EE2, BaP i E2 a jejich kombinacemi. Avšak není jasné, proč se tomu neděje i v případě vzorků MF ledvin a jater potkanů premedikovaných samotným EE2. Navíc vzhledem k nízkým odezvám jsou hodnoty získané u MF plic zatíženy určitou chybou. Dalším zajímavým výsledkem je zjištění, že premedikace potkanů BaP zvyšuje expresi CYP2C11 v ledvinách.

4.5 Studium vlivu E2, EE2, BaP a jejich kombinací na specifickou aktivitu CYP2C11

Dále byl studován vliv výše uvedených endokrinních disruptorů na specifickou aktivitu CYP2C11, která byla stanovena jako 16 α -hydroxylace testosteronu. Vzhledem k velmi nízkým hodnotám koncentrace CYP v MF ledvin a plic (tabulka 4, str. 39), byla specifická aktivita CYP2C11 stanovena pouze u vzorků MF jater potkanů premedikovaných výše zmíněnými sloučeninami. Vzorky byly analyzovány metodou HPLC s UV-detekcí a získané výsledky byly statisticky zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2007. Na obrázku 15 (str. 47) jsou uvedeny změny specifické aktivity CYP2C11 po premedikaci potkanů uvedenými ED a jejich kombinacemi ve srovnání se vzorky nepremedikovaných potkanů. U vzorků MF jater potkanů premedikovaných EE2 mírně vzrostla specifická aktivita CYP2C11 (nárůst 1,5x) oproti MF jater potkanů nepremedikovaných. Velmi mírné zvýšení specifické aktivity je zaznamenáno u vzorků MF jater potkanů premedikovaných E2 a kombinací BaP a EE2. Ostatní premedikace laboratorního potkana specifickou aktivitu CYP2C11 prakticky neovlivnily.



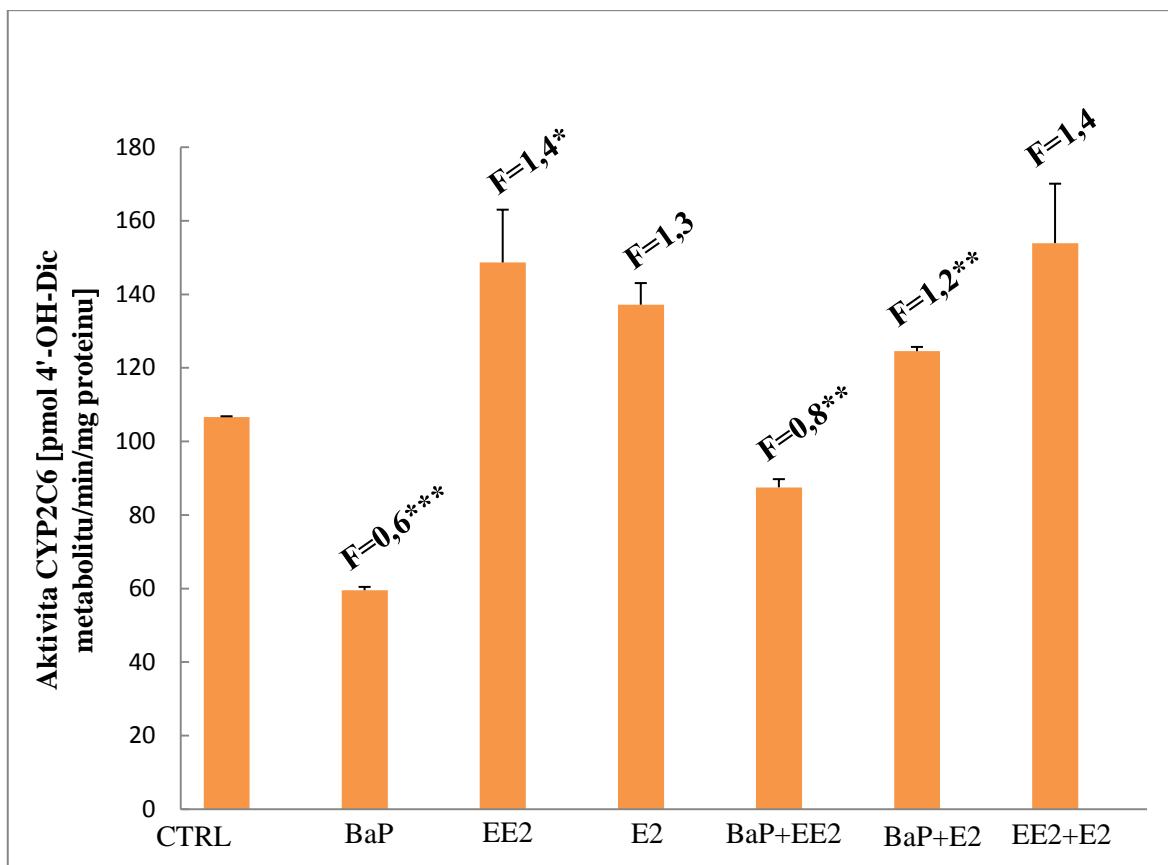
Obrázek 15: Specifické aktivity CYP2C11 ve vzorcích izolované MF jater potkanů premedikovaných E2, EE2, BaP a jejich kombinacemi.

Specifická aktivita CYP2C11 byla stanovena jako 16 α -hydroxylace testosteronu. BaP značí MF jater potkanů premedikovaných benzo[a]pyrenem, EE2 MF jater potkanů premedikovaných 17 α -ethinyloestradiolem, E2 MF jater potkanů premedikovaných 17 β -estradiolem a CTRL MF kontrolních nepremedikovaných potkanů. F značí indukci vzorků a hvězdičky hladinu významnosti: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Počet měření: 2.

Zmíněné výsledky naznačují mírnou indukci vyvolanou premedikací potkanů EE2 a jeho kombinací s BaP. Ovlivnění specifické aktivity CYP2C11 uvedenými ED koresponduje s výsledky získanými metodou Western blot až na případ premedikace potkanů kombinací EE2 a E2, kdy k ovlivnění specifické aktivity CYP2C11 nedochází. Možným vysvětlením je zapojení i jiných enzymů do 16 α -hydroxylace testosteronu než pouze CYP2C11 a tím zvýšení specifické aktivity.

4.6 Studium vlivu E2, EE2, BaP a jejich kombinací na specifickou aktivitu CYP2C6

Na přeměně EE2 se kromě výše studovaného CYP2C11 podílí i izoforma CYP2C6¹⁸. Proto byla zkoumána i specifická aktivita CYP2C6, která byla stanovena jako 4'-hydroxylace diklofenaku. Diklofenak je hojně využívaným léčivem při revmatických onemocněních⁴⁴. Měření bylo opět prováděno pouze u mikrosomálních vzorků jater a analyzováno metodou HPLC s UV-detekcí. Změny specifické aktivity CYP2C6 stanovené v MF jater potkanů premedikovaných výše uvedenými ED a jejich kombinacemi ukazuje obrázek 16 (str. 49). Z obrázku vyplývá, že k mírnému zvýšení aktivity CYP2C6 dochází u vzorků MF jater potkanů premedikovaných EE2, E2 a jejich kombinací. Pokud jsou EE2 a E2 potkanům podávány společně s BaP, dochází k nepatrnému snížení specifické aktivity CYP2C6 oproti kontrole. Specifická aktivita sledovaného enzymu je také snížena u vzorků MF jater potkanů premedikovaných BaP a to skoro na polovinu kontrolní aktivity. Tento efekt zatím není příliš popsán a zasloužil by si bližšího zkoumání. Studium vlivu zmiňovaných ED na expresi CYP2C6 bylo sledován pouze jako změna specifické aktivity tohoto enzymu. Protože primární protilátka proti CYP2C6 nebyla k dispozici, metoda WB nemohla být provedena. Stanovené specifické aktivity CYP2C6 tedy nelze porovnat s relativním množstvím CYP2C6, jako tomu bylo v předchozích případech. Je možné pouze konstatovat, že zatímco ED EE2/E2 zvyšují specifickou aktivitu CYP2C6, premedikace potkanů BaP aktivitu CYP2C6 snižuje.



Obrázek 16: Specifické aktivity CYP2C6 ve vzorcích izolované MF jater potkanů premedikovaných E2, EE2, BaP a jejich kombinacemi.

Specifická aktivita CYP2C6 byla stanovena jako 4'-hydroxylace diklofenaku BaP značí benzo[a]pyren, EE2 17 α -ethinylestradiol, E2 17 β -estradiol a CTRL kontrolní nepremedikovanou skupinu. F značí indukci vzorků a hvězdičky hladinu významnosti: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Počet měření: 2.

5 Závěr

V předkládané bakalářské práci byl studován vliv endokrinních disruptorů 17 β -estradiolu (E2), 17 α -ethinylestradiolu (EE2), benzo[a]pyrenu (BaP) a jejich kombinací na expresi vybraných izoform cytochromů P450.

V rámci této práce byla izolována mikrosomální frakce z jater, ledvin a plic laboratorních potkanů nepremedikovaných a premedikovaných uvedenými endokrinními disruptory. Mikrosomální frakce byly charakterizovány z hlediska specifického obsahu CYP, dále byla metodou Western blot stanovena míra exprese CYP1A1 a CYP2C11 v jednotlivých vzorcích a pomocí přeměny specifických substrátů uvedených izoform stanovena jejich aktivita. Výsledky získané v této práci lze shrnout následovně:

Ovlivnění CYP1A1:

Premedikace laboratorního potkana BaP a jeho kombinacemi s EE2 a E2 vede ke zvýšení exprese CYP1A1 ve vzorcích MF jater, ledvin i plic a ke zvýšení jeho specifické aktivity ve vzorcích MF jater. Endogenní ED E2, exogenní ED EE2, ani jejich kombinace nemají na expresi CYP1A1 téměř žádný vliv.

Ovlivnění CYP2C11:

Premedikace laboratorního potkana BaP zvyšuje expresi CYP2C11 u vzorků MF ledvin. Zatímco premedikace laboratorního potkana EE2 a jeho kombinací s BaP vede k mírnému zvýšení exprese i specifické aktivity CYP2C11 v MF jater, kombinace EE2 a E2 jeho expresi snižuje.

Ovlivnění CYP2C6:

Premedikace potkanů E2, EE2 a jejich kombinací vede k mírnému zvýšení specifické aktivity CYP2C6 v játrech. Ke snížení specifické aktivity sledovaného CYP dochází u vzorků MF jater potkanů premedikovaných BaP a jeho kombinací s EE2.

6 Seznam literatury

1. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J., Martínek, V., Páca, J.: Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy* **98**, 876–890 (2004).
2. Kotyza, J., Soudek, P., Kafka, Z., Vaněk, T.: Léčiva - „nový“ environmentální polutant. *Chem. Listy* **103**, 540–547 (2009).
3. Blanchfield, P.J., Kidd, K.A., Docker, M.F., Palace, V.P., Park, B.J., Postma, L.D.: Recovery of a wild fish population from whole-lake additions of a synthetic estrogen. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 3136–3144 (2015).
4. Hignite, C., Azarnoff, D.L.: Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sci.* **20**, 337–341 (1977).
5. Křesinová, Z., Svobodová, K., Cajthaml, T.: Mikrobiální degradace endokrinně disruptivních látek. *Chem. Listy* **103**, 200–207 (2009).
6. <https://www.epa.gov/endocrine-disruption>, staženo dne 16.4.2016 v 14:52.
7. Kavlock, R. J., Daston, G.P., DeRosa, Ch., Fenner-Crisp, P., EarlGray, L., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Moore, J., Miller, R., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M, Sinks, T., Tilson, H.A.: Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* **104**, 715–740 (1996).
8. Hecker, M., Hollert, H.: Endocrine disruptor screening: regulatory perspectives and needs. *Environ. Sci. Eur.* **23**, 1–14 (2011).
9. Hampl, R., Kubátová, J., Stárka, L.: Steroids and endocrine disruptors - history, recent state of art and open questions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **155**, 217–223 (2016).

10. Silbernagl, S., Despopoulos, A.: Atlas fyziologie člověka, 6. vydání, (překlad z německého originálu), Grada Publishing, Praha, str. 294–303 (2004).
11. Streck, G.: Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. *Trends Anal. Chem.* **28**, 635–652 (2009).
12. Thomas, M.P., Potter, B.V.L.: The structural biology of oestrogen metabolism. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **137**, 27–49 (2013).
13. Holoubek, I., Čadová, L.: Estrogeny v životním prostředí. *Klin. Onkol.* **13**, 25-30 (2000).
14. Fanta, M.: Trendy v hormonální antikoncepci. *Interní Med.* **13**, 176–178 (2011).
15. Aris, A.Z., Shamsuddin, A.S., Praveena, S.M.: Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environ. Int.* **69**, 104–119 (2014).
16. Petrow, V.: The contraceptive progestagens. *Chem. Rev.* **70**, 713–726 (1970).
17. Han, J., Qiu, W., Cao, Z., Hu, J., Gao, W.: Adsorption of ethinylestradiol (EE2) on polyamide 612: molecular modeling and effects of water chemistry. *Water Res.* **47**, 2273–2284 (2013).
18. Bořek-Dohalská, L., Valášková, P., Černá, V., Stiborová, M.: Role of rat cytochromes P450 in the oxidation of 17 α -ethinylestradiol. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **38**, 852–860 (2014).
19. Ebner, T., Rimmel, R.P., Burchell, B.: Human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase catalyzes the glucuronidation of ethinylestradiol. *Mol. Pharmacol.* **43**, 649–654 (1993).

20. Forbes-Bamforth, K.J., Coughtrie, M.W.: Identification of a new adult human liver sulfotransferase with specificity for endogenous and xenobiotic estrogens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**, 707–711 (1994).
21. Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., Sigler, K., Řezanka, T.: Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol. *Environ. Pollut.* **157**, 3325–3335 (2009).
22. Legler, J., Jonas, A., Lahr, J., Vethaak, A.D., Brouwer, A., Murk, A.J.: Biological measurement of estrogenic activity in urine and bile conjugates with the in vitro ER-CALUX reporter gene assay. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**, 473–479 (2002).
23. Purba, H.S., Maggs, J.L., Orme, M.L., Back, D.J., Park, B.K.: The metabolism of 17 alpha-ethinyloestradiol by human liver microsomes: formation of catechol and chemically reactive metabolites. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **23**, 447–453 (1987).
24. Ziels, R.M., Lust, M.J., Gough, H.L., Strand, S.E., Stensel, H.D.: Influence of bioselector processes on 17 α -ethinylestradiol biodegradation in activated sludge wastewater treatment systems. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 6160–6167 (2014).
25. Yi, T., Harper, W.F.: The Link between nitrification and biotransformation of 17 α -ethinylestradiol. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 4311–4316 (2007).
26. Yu, C.-P., Deeb, R.A., Chu, K.-H.: Microbial degradation of steroidal estrogens. *Chemosphere* **91**, 1225–1235 (2013).
27. Cajthaml, T. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds by ligninolytic fungi: mechanisms involved in the degradation. *Environ. Microbiol.* **17**, 4822–4834 (2015).
28. Aimová, D., Poljaková, J., Kotrbová, V., Moserová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Stiborová, M.: Ellipticine and benzo(a)pyrene increase their own metabolic

- activation via modulation of expression and enzymatic activity of cytochromes P450 1A1 and 1A2. *Interdiscip. Toxicol.* **1**, 160–168 (2010).
29. Tomaniová, M., Kocourek, V., Hajšlová, J.: Polycyklické aromatické uhlovodíky v potravinách. *Chem. Listy* **91**, 357–366 (1997).
 30. Juhasz, A.L., Naidu, R.: Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **45**, 57–88 (2000).
 31. Kiruthiga, P.V., Karthikeyan, K., Archunan, G., Pandian, S.K., Devi, K.P.: Silymarin prevents benzo(a)pyrene-induced toxicity in Wistar rats by modulating xenobiotic-metabolizing enzymes. *Toxicol. Ind. Health* **31**, 523–541 (2015).
 32. Arlt, V.M., Stiborova, M., Henderson, C.J, Thiemann, M., Frei, E., Aimova, D., Singh, R., Gamboa da Costa, G.G., Schmitz, O.J., Farmer, P.B., Wolf, C.J., Phillips, D.H.: Metabolic activation of benzo[a]pyrene in vitro by hepatic cytochrome P450 contrasts with detoxification in vivo: experiments with hepatic cytochrome P450 reductase null mice. *Carcinogenesis* **29**, 656–665 (2008).
 33. Kanaly, R.A., Harayama, S.: Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* **182**, 2059–2067 (2000).
 34. McQuarters, A.B., Wolf, M.W., Hunt, A.P., Lehnert, N.: 1958–2014: after 56 years of research, cytochrome P450 reactivity is finally explained. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 4750–4752 (2014).
 35. Guengerich, F.P.: Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 611–650 (2001).
 36. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy* **93**, 229–237 (1999).

37. Klingenberg, M.: Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **75**, 376–386 (1958).
38. Omura, T., Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **239**, 2379–2385 (1964).
39. 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., Nebert, D.W.: P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1-42 (1996).
40. Hu, B., Sun, Ch., Xu, S., Zhou, W.: Synthesis of metallo-deuteroporphyrin derivatives and the study of their biomimetic catalytic properties. *On Biomimetics.* **8**, 163–195 (2011).
41. Guengerich, F.P.: Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: minireview. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **21**, 163–168 (2007).
42. Ma, Q., Lu, A.Y.H.: CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug Metab. Dispos.* **35**, 1009–1016 (2007).
43. Barouki, R., Coumoul, W., Fernandez-Salguero, P.M.: The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett.* **581**, 3608–3615 (2007).
44. Wójcikowski, J., Haduch, A., Daniel, W.A.: Effect of antidepressant drugs on cytochrome P450 2C11 (CYP2C11) in rat liver. *Pharmacol. Rep.* **65**, 1247–1255 (2013).
45. Bühler, R., Lindros, K.O., Nordling, Å., Johansson, I., Ingelman-Sundberg, M.: Zonation of cytochrome P450 isozyme expression and induction in rat liver. *Eur. J. Biochem.* **204**, 407–412 (1992).

46. Ortiz de Montellano, P.R., Komives, E.A.: Branchpoint for heme alkylation and metabolite formation in the oxidation of arylacetylenes by cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* **260**, 3330–3336 (1985).
47. Stanczyk, F.Z., Archer, D.F., Bhavnani, B.R.: Ethinyl estradiol and 17 β -estradiol in combined oral contraceptives: pharmacokinetics, pharmacodynamics and risk assessment. *Contraception* **87**, 706–727 (2013).
48. Guengerich, F.P.: Inhibition of oral contraceptive steroid-metabolizing enzymes by steroids and drugs. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **163**, 2159–2163 (1990).
49. Laurenzana, E.M., Weis, C.C., Bryant, C.W., Newbold, R., Delclos, K.B.: Effect of dietary administration of genistein, nonylphenol or ethinyl estradiol on hepatic testosterone metabolism, cytochrome P-450 enzymes, and estrogen receptor alpha expression. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 53–63 (2002).
50. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W.: Harperova biochemie, (překlad z anglického originálu), Nakladatelství a vydavatelství H&H, Jinočany, str. 9, 122–123, (2002).
51. 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.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85 (1985).
52. Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V.G., Chen, G., Deber, C.M.: Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 1760–1765 (2009).
53. Schägger, H.: Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc.* **1**, 16–22 (2006).
54. Welinder, C., Ekblad, L.: Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J. Proteome Res.* **10**, 1416–1419 (2011).

55. <http://genetika.upol.cz/download.aspx?id=231&t=0>, staženo dne 10.4.2016 v 18:15.
56. Kurien, B.T., Scofield, R.H.: Western blotting. *Methods* **38**, 283–293 (2006).
57. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E.: Sudan I is a potential carcinogen for humans evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes. *Cancer Res.* **62**, 5678–5684 (2002).
58. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Koblas, T., Hodek, P.: Expression of cytochrome P450 1A1 and its contribution to oxidation of a potential human carcinogen 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in human livers. *Cancer Lett.* **220**, 145–154 (2005).

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo DP	Datum vypůjčení	Poznámka