

2914

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



**Studie metabolismu 3-nitrobenzanthronu
cytosolárními enzymy a jeho vliv na expresi
biotransformujících enzymů potkana**

Diplomová práce

Jana Hájková

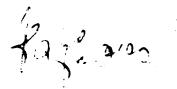
školitelka: doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2005

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

V Praze dne 6.5.2005

Jana Hájková



Děkuji vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání zajímavého tématu, cenné a inspirující připomínky a rady i všestranný zájem, které mi při vypracování práce poskytla. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Heleně Rýdlové za pomoc při řešení dílčích problémů a všem ostatním pracovníkům laboratoře za podporu a příjemné pracovní prostředí.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	4
1. ÚVOD.....	7
1.1 KANCEROGENEZE.....	7
1.2 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK.....	10
1.2.1 Derivatizační fáze biotransformace.....	11
1.2.2 Konjugační fáze biotransformace.....	11
1.2.3 Mikrosomální monooxygenázový systém.....	12
1.2.3.1 NADPH:P450 reduktáza.....	13
1.2.3.2 Cytochrom P450.....	14
1.2.3.2.1 Enzymové funkce cytochromu P450.....	16
1.2.3.2.2 Reakční mechanismus monooxygenázové reakce	17
1.2.3.2.3 Vybrané podrodiny cytochromů P450, jejich substráty a induktory.....	19
1.2.3.2.4 Regulace hladiny cytochromů P450 indukci enzymu.....	20
1.2.4 Cytoplasmatické enzymy katalyzující redukční reakce.....	22
1.2.4.1 DT-diaforáza.....	22
1.2.4.1.1 Indukce DT-diaforázy.....	23
1.2.4.2 Xanthinoxidáza.....	24
1.2.4.3 Aldehydoxidáza.....	25
1.3 AROMATICKÉ NITROSLOUČENINY.....	25
1.3.1 Nitroaromáty a lidské zdraví.....	26
1.3.1.1 3-Nitrobenzanthron.....	27
2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	29
3. MATERIÁL A METODY.....	30
3.1 MATERIÁL.....	30
3.2 METODY A PŘÍSTROJE.....	33
3.2.1 Premedikace laboratorních potkanů.....	33
3.2.2 Izolace subcelulárních systémů z orgánů laboratorních potkanů.....	33

3.2.3	Stanovení koncentrace proteinu.....	35
3.2.4	Stanovení koncentrace cytochromu P450.....	36
3.2.5	Stanovení aktivity NADPH:P450 reduktázy.....	37
3.2.6	Stanovení aktivity DT-diaforázy.....	38
3.2.7	Stanovení obsahu vybraných izoform cytochromu P450.....	38
3.2.7.1	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS.....	39
3.2.7.2	Metoda „Western blot“.....	41
3.2.7.3	Imunochemická detekce forem cytochromu P450.....	41
3.2.8	Stanovení aktivity CYP1A1/2 <i>O</i> -dealkylací 7-ethoxyresorufinu.....	42
3.2.9	Stanovení aktivity CYP1A1 oxidací Sudanu I	43
3.2.10	Studie přeměny 3-NBA cytosolárními enzymy.....	44
3.2.10.1	Inkubace 3-NBA s jaterním cytosolem potkanů premedikovaných Sudanem I	44
3.2.10.2	Inkubace 3-NBA s lidskou rekombinantní DT-diaforázou (NQO1).....	45
4.	VÝSLEDKY.....	47
4.1	METABOLISMUS 3-NBA CYTOSOLÁRNÍMI ENZYMY	47
4.1.1	Metabolismus 3-NBA cytosolárními enzymy jater potkana	47
4.1.2	Vliv koenzymů xanthinoxidázy a DT-diaforázy na metabolismus 3-NBA jaterním cytosolem potkanů premedikovaných Sudanem I.....	49
4.1.3	Přeměna 3-NBA cytosolárními enzymy v závislosti na jejich koncentraci....	51
4.1.4	Přeměna 3-NBA cytosolárními enzymy v závislosti na době inkubace.....	52
4.2	REDUKCE 3-NBA LIDSKOU REKOMBINANTNÍ DT-DIAFORÁZOU (NQO1).....	54
4.2.1	Závislost přeměny 3-NBA na koncentraci DT-diaforázy (NQO1)	54
4.2.2	Závislost přeměny 3-NBA na době inkubace s DT-diaforázou (NQO1)	56
4.2.3	Závislost přeměny 3-NBA DT-diaforázou (NQO1) na jeho koncentraci	58
4.3	VLIV 3-NBA NA BIOTRANSFORMAČNÍ ENZYMY LABORATORNÍHO POTKANA.....	59
4.3.1	Vliv premedikace laboratorních potkanů 3-NBA na obsah cytochromu P450 v mikrosomech izolovaných z tkáně jater, sleziny a srdce	60
4.3.2	Vliv premedikace laboratorních potkanů 3-NBA na expresi proteinů cytochromů P450 v mikrosomech izolovaných z tkáně jater, sleziny a srdce	61

4.3.3	Vliv premedikace laboratorních potkanů 3-NBA na aktivity cytochromů P450.....	64
4.3.4	Vliv premedikace laboratorních potkanů 3-NBA na expresi NADPH:P450 reductázy v mikrosomech izolovaných z tkáně jater, ledvin, plic, sleziny a srdce	66
4.3.5	Vliv premedikace laboratorních potkanů 3-NBA na aktivitu NADPH:P450 reductázy v mikrosomech izolovaných z tkáně jater, ledvin, plic, sleziny a srdce	69
4.3.6	Vliv premedikace laboratorních potkanů 3-NBA na expresi DT-diaforázy v cytosolech izolovaných z tkáně jater, ledvin, plic, sleziny a srdce	72
4.3.7	Vliv premedikace laboratorních potkanů 3-NBA na aktivitu DT-diaforázy v cytosolech izolovaných z tkáně jater, ledvin, plic, sleziny a srdce	76
5.	DISKUSE.....	77
6.	ZÁVĚR.....	82
7.	SEZNAM LITERATURY.....	84

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3-ABA	3-aminobenzanthron
A₄₂₀ (450, 490, 550, 562)	absorbance při vlnové délce 420 (450, 490, 550, 562) nm
ΔA	změna absorbance
AA	přírodní směs aristolochových kyselin
Ah receptor	receptor pro aromatické uhlovodíky („Aromatic hydrocarbon“)
ACTH	adrenokortikotropní hormon
ATP	adenosintrifosfát
β-NF	β-naftoflavon
BCA	bicinchoninová kyselina (4,4'-dikarboxy-2,2' bichinolinová kyselina)
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitrobluetetrazolium
BHA	butylovaný hydroxyanisol
BHT	butylovaný hydroxytoluen
BSA	hovězí sérový albumin
c (c_b)	koncentrace (koncentrace bílkovin)
CDP	cytidindifosfát
CYP	cytochrom P450
CYP1A (3A, 2B, 2C, 2D, 2E)	podrodiny cytochromu P450
cyt c	cytochrom c
Da	Dalton
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ε	molární absorpční koeficient
ER	estrogenový receptor
EROD metoda	<i>O</i> -deethylace 7-ethoxyresorufinu
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
FMNH₂	redukovaný flavinmononukleotid

HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
J 0,4 (4,0; 40)	žatní mikrosomální frakce izolovaná z potkanů premedikovaných 3-NBA o koncentraci 0,4 (4,0; 40) mg/kg zvířete
K J (L, P, SI, S)	žatní (ledvinná, plicní, slezinná, srdeční) mikrosomální frakce izolovaná z nepremedikovaných potkanů
L 0,4 (4,0; 40)	ledvinná mikrosomální frakce izolovaná z potkanů premedikovaných 3-NBA o koncentraci 0,4 (4,0; 40) mg/kg zvířete
M (mM)	mol.dm ⁻³ (mmol.dm ⁻³)
MFO	mikrosomální monooxygenasový systém
Mr	relativní molekulová hmotnost
m/v	hmotnost rozpuštěné látky/objem rozpouštědla
3-NBA	3-nitrobenzanthron
NADH	nikotinamidadenindinukleotid, redukovaná forma
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát, redukovaná forma
<i>NQO1</i>	označení genu NAD(P)H:chinonoxidoreduktázy
P 0,4 (4,0; 40)	plícní mikrosomální frakce izolovaná z potkanů premedikovaných 3-NBA o koncentraci 0,4 (4,0; 40) mg/kg zvířete
P 1 (2, 3)	pufr číslo 1 (2, 3)
P420	protein, jehož redukovaná forma v komplexu s oxidem uhelnatým absorbuje při 420 nm
P450	protein, jehož redukovaná forma v komplexu s oxidem uhelnatým absorbuje při 450 nm (cytochrom P450)
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PB	fenobarbital
PBS	fosfátový pufr
PCN	5-pregnenolon-16 α -karbonitril
PVDF membrána	přenosová membrána (z polyvinylidenfluoridu)
RNA	ribonukleová kyselina

RPM	otáčky za minutu
S 0,4 (4,0; 40)	srdeční mikrosomální frakce izolovaná z potkanů premedikovaných 3-NBA o koncentraci 0,4 (4,0; 40) mg/kg zvířete
SD	směrodatná odchylka
SDS	sodná sůl kyseliny dodekasulfonové
SDS-ELFO	SDS elektroforéza
SI 0,4 (4,0)	srdeční mikrosomální frakce izolovaná z potkanů premedikovaných 3-NBA o koncentraci 0,4 (4,0) mg/kg zvířete
T₃	trijodtyronin
TCDD	2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-diooxin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TRE	thyroidální hormon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Triton	t-oktylfluoxypolyetoxyetanol
U	standardní jednotka enzymové aktivity (1U = 1 μmol substrátu přeměněný enzymem za 1 minutu)
UDP	uridindifosfát
UV záření	ultrafialové záření
v/v	objemový zlomek
w/w	hmotnostní zlomek

1. ÚVOD

1.1. KANCEROGENEZE

Nádor (tumor, novotvar, neoplazma) je obecně označován jako patologický útvar tvořený tkání, jejíž růst se vymkl kontrole organismu a roste na něm nezávisle¹. Za podstatu vývoje nádorových onemocnění je v současnosti považováno vyvolání určitých změn v genetické informaci, které narušují regulační mechanismus dělení a diferenciaci buňky². Podle biologické povahy růstu rozdělujeme nádory na **benigní** (nezhoubné) a **maligní** (zhoubné) (**Tab. 1**). Benigní nádor vykazuje poměrně ohraničený růst expanzivního charakteru. Maligní nádor proniká do tkání a rozrušuje je (infiltrativní a destruktivní růst), zakládá metastázy (lymfatickou nebo krevní cestou) a do určité míry ovlivňuje celý organismus (kachektizující vliv apod.).

Tab. 1 Přehled nádorů^{3,4}

NORMÁLNÍ TKÁŇ		BENIGNÍ TUMOR	MALIGNÍ TUMOR
EPITEL	Povrchový	Papilom	Karcinom
	Žlázo	Adenom	Adenokarcinom
POJIVO	Kolagenní	Fibrom	Fibrosarkom
	Tukové	Lipom	Liposarkom
	Chrupavka	Chondrom	Chondrosarkom
	Kost	Osteom	Osteosarkom
	Sval	Myom	Myosarkom
	Cévy	Angiom	Angiosarkom
KRVETVORNÉ A LYMFATICKÉ ORGÁNY		? (benigní varianta není známa)	Leukémie Lymfom Myelom
NERVSTVO	Centrální	Gliom	Glioblastom
	Periferní	Ganglioneurom	Neuroblastom
ZÁRODEČNÉ BUŇKY		Gonadoblastom	Seminom
		Teratom zralý	Teratom nezralý
MEZOTEL PLEURY, PERIKARDU A PERITONEA		Benigní mezoteliom	Maligní mezoteliom

Podle histologického původu můžeme nádory rozdělit do následujících skupin:

(i) **epitelové**, (ii) **mezenchymové**, (iii) **neuroektodermové**, (iv) **smíšené**, **germinální**, **teratom** a **choriokarcinom**, (v) **mezoteliom**. Samostatně v nádorových onemocněních stojí **hemoblastózy** a **hemoblastomy**.

Většina nádorových onemocnění je monoklonálního původu, dceřinné buňky vycházejí z jediné maligně transformované buňky. Méně často jde o původ polyklonální, kdy dochází k malignímu zvratu synchronně, případně metachronně ve více lokalizacích jedné tkáně (**multifokální** či **pluricentrický** vznik nádoru). V případě, že k maligní transformaci dochází synchronně nebo metachronně v různých tkáních, jde o nádorovou multiplicitu⁵.

Za kancerogenezi je považován proces maligní transformace nenádorové buňky v nádorovou, následné dělení buněčného klonu, včetně další dediferenciace a zvyšování maligního potenciálu dělicích se buněk.

Vznik nádorového onemocnění vysvětlovaly v průběhu historie různé teorie. S rozvojem přírodních věd získaly na významu následující teorie: chemická (vliv některých chemikálií – např. složek dehtu, aromatických aminů, arzenu a polycyklických aromatických uhlovodíků), fyzikální (např. vliv ionizujícího záření, tepelného záření, mechanické vlivy) a virová (viry způsobují sarkomy u slepic - Rous, 1911)^{5,6}. Teorie o vnitřních faktorech staví do popředí místní i celkovou dispozici (dědičnost, oslabení a poškození obranyschopnosti)⁵.

Teprve biochemie molekulární biologie pokládá vznik nádorového onemocnění za děj komplexní, na němž se podílejí faktory **zevní** (exogenní kancerogeny) a **vnitřní** (endogenní kancerogeny, zejména dědičné mutace). Mezi zevní faktory vztahující se ke kancerogenezi patří (i) **faktory fyzikální** (UV záření, ionizační záření), (ii) **faktory chemické** a (iii) **faktory biologické** (zejména onkoviry). Chemické kancerogeny lze rozdělit podle mechanismu jejich působení na genotoxické, epigenetické a kancerogeny způsobující změnu ve struktuře DNA (**Tab. 2**). Podstata maligního zvratu je hledána v genetických změnách (mutacích DNA) příslušné buňky prostřednictvím uvedených faktorů. Tyto změny nacházíme v některých typických oblastech genomu. Geny, jejichž změny se mohou podílet na vzniku zhoubného bujení, nazýváme **onkogeny**.

Onkogeny jsou geny pro bílkoviny, které pozitivně regulují normální růst buňky v nádorovou. Nealterované buněčné onkogeny se nazývají **protoonkogeny**. Protoonkogeny jsou součástí větší skupiny genů, které se účastní řízení růstu buňky⁶.

Onkogeny lze podle funkce dělit na (i) geny pro růstové faktory, (ii) geny pro receptory růstových faktorů a hormonů, (iii) geny pro převaděče signálů a (iv) geny pro transkripční faktory. Produkty onkogenů tedy zasahují do všech čtyř obecných funkcí kontroly buněčného růstu⁷.

Tab. 2 Rozdělení chemických kancerogenů podle povahy interakce s DNA

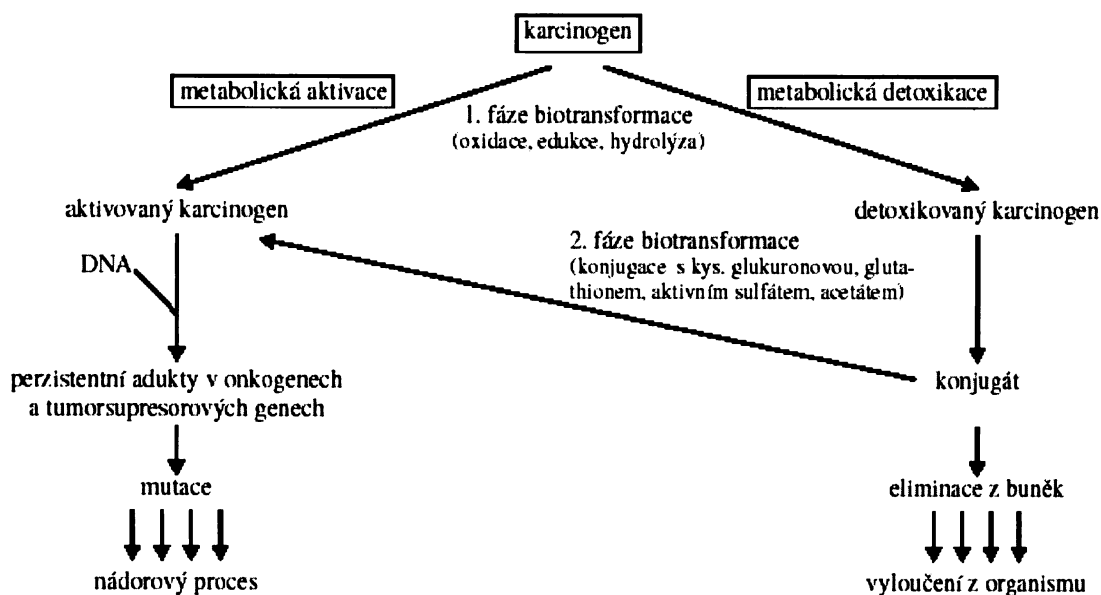
<p>GENOTOXICKÉ KANCEROGENY</p> <ul style="list-style-type: none"> váží se na DNA kovalentní vazbou za vzniku aduktů (např. benzo-[a]-pyren)
<p>EPIGENETICKÉ KANCEROGENY</p> <ul style="list-style-type: none"> modifikují DNA nekovalentně nejvýznamnější jsou sloučeniny schopné vmezeřit se do dvoušroubovicové struktury DNA za vzniku interkalátů (např. ionty kadmia nebo chemoterapeutikum elipticin)
<p>LÁTKY MĚNÍCÍ OBECNĚ STRUKTURU DNA</p> <ul style="list-style-type: none"> poškozuji DNA za vzniku jednořetězcových zlomů (single-strand break), např. bleomycin, dvouřetězcových zlomů (double-strand break) nebo dokonce křížového propojení molekul (cross-linking), např. cis-platina „Cross-linking“ může být realizováno mezi dvěma molekulami DNA, mezi DNA a proteinem, i mezi dvěma proteiny navzájem

Další skupinou nádorových genů jsou **antionkogeny (tumorsupresorové geny)**. Jsou to geny, jejichž produkty zasahují do buněčného růstu tak, že ruší účinky onkogenů. Můžeme je definovat jako geny s důležitou regulační úlohou v buněčné proliferaci, diferenciaci a jiných buněčných a systémových procesech, jejichž inaktivace má onkogenní účinky⁶.

1.2. BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK

Způsob přeměny a odstraňování nízkomolekulárních i vysokomolekulárních cizorodých látek (xenobiotik) z organismů se uskutečňuje mechanismy označovanými jako biotransformace⁸. Vzhledem k tomu, že řada xenobiotik jsou organické látky hydrofobní povahy, které procházejí membránami a mohou se v organismu kumulovat⁹, je hlavním cílem biotransformace přeměna xenobiotik na polárnější metabolity snáze se vylučující⁹. Průběh biotransformace a její intenzita jsou určovány jednak vlastnostmi xenobiotika samotného, jednak organismem, do něhož bylo vpraveno. Na jedné straně je to struktura cizorodé látky, na druhé straně řada faktorů podmíněná subjektem, např. biologický druh, dieta, způsob aplikace a další. Dochází rovněž k odchylkám biotransformace u jednoho biologického druhu v závislosti na stáří, pohlaví, individuální enzymové aktivitě, geneticky podmíněné variabilitě nebo farmakologicky navozené aktivitě enzymových systémů¹⁰.

V závislosti na chemické struktuře daného xenobiotika a enzymovém systému, který přeměňuje danou látku v organismu, může dojít k negativnímu procesu, kdy místo detoxikace metabolizované látky dojde k její aktivaci (**Obr. 1**). Právě o působení karcinogenů je známo, že řada z nich (tzv. proximální karcinogeny) musí procházet biologickou aktivací, zatímco jen málo z nich je karcinogenní okamžitě (tzv. ultimální karcinogeny)¹¹.



Obr. 1 Schéma mechanismu působení chemických karcinogenů¹²

Většina enzymů biotransformujících cizorodé látky je lokalizována v membráně endoplasmatického retikula^{9,13,14} (např. mikrosomální monooxygenázový systém, prostaglandin H syntháza). Řada biotransformačních enzymů se však vyskytuje volně v cytoplazmě (např. NAD(P)H chinon oxidoreduktáza, xanthinoxidáza, některé peroxidázy), v Golgiho aparátu, ale i v extracelulárním prostoru (např. laktoperoxidáza v mléce)¹⁵.

Proces biotransformace xenobiotik je v živočišných organismech rozdělen do dvou fází¹⁶ - fáze derivatizační a na ni navazující fáze konjugační.

1.2.1. DERIVATIZAČNÍ FÁZE BIOTRANSFORMACE

V průběhu derivatizační fáze dochází k zabudovávání reaktivních funkčních skupin do lipofilního skeletu cizorodé látky nebo k demaskování funkčních skupin, které jsou již v molekule xenobiotika přítomny. Tím se zvyšuje polarita a možnost konjugace xenobiotika. Rozeznáváme tři typy derivatizačních reakcí: oxidace (C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace, dealkylace, deaminace, oxidace alkoholů a aldehydů apod.), redukce (nitro- a azoredukce) a hydrolýza (hydrolýza esterů, popř. amidů).

Pro aromatické nitrosloučeniny je typická aktivace redukční cestou. Mechanismus aktivace řady nitrosloučenin byl již studován (např. aristolochové kyseliny^{17,18,19,20}, 2-nitroanisol²¹, 1-nitropyren²², 1,6-nitropyren²³). Mezi významné reduktázy, které mohou participovat na redukční aktivaci, patří NADPH:P450 reduktáza, DT-diaforáza, xanthinoxidáza, aldehydoxidáza a cytochromy P450.

1.2.2. KONJUGAČNÍ FÁZE BIOTRANSFORMACE

V konjugační fázi biotransformace jsou reaktivní funkční skupiny, vytvořené v derivatizační fázi, konjugovány s malými endogenními hydrofilními molekulami. Tím se ještě zvýší polarita původně hydrofobní molekuly xenobiotika a usnadní se její vyloučení z organismu. Mezi poznané konjugační složky patří kyseliny glukuronová, aktivní acetát, aktivní sulfát, cystein, acetylcystein, glycin, glutamin, glutathion a taurin¹⁰. Exkrece nejčastěji probíhá močí a žlučí.

V konjugační fázi může dojít i k aktivaci xenobiotika na toxičtější sloučeninu. Tak je tomu např. u konjugátů se sulfátem, vznikajících účinkem sulfotransferáz. Při tomto procesu musí být nejprve sulfát aktivován na 3'-

fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS). Konjugát sulfátu s N-hydroxysloučeninami (z první fáze biotransformace) je v kyselém prostředí moči nestabilní a rozpadá se za vzniku nitreniového (eventuelně karbeniového) iontu. Vzniká tedy elektrofil reagující s DNA a proteiny. Podobně účinkem acetyltransferáz vznikají O- a N-acetylderiváty. V případě aromatických aminů se tvoří N-acetylaminy nebo N-acetoxyarylaminy, které se rozpadají za vzniku nitreniového (karbeniového) iontu.

Detoxikační účinek má konjugace s kyselinou glukuronovou, kdy působením UDP-glukuronosyltransferázy vznikají glukosiduronáty. Konjugáty s glutathionem mají také výrazně detoxifikační povahu. Tvoří se spontánně, ale reakci urychluje a usnadňuje glutathiontransferáza. Výslednými konjugáty jsou merkapturové kyseliny¹⁵.

1.2.3. MIKROSOMÁLNÍ MONOOXYGENÁZOVÝ SYSTÉM

Mikrosomální monooxygenázový systém je soubor enzymů katalyzující celou řadu oxidačních, oxygenačních, popř. redukčních reakcí, přičemž využívá především molekulární kyslík²⁴. Je též nazýván systémem oxidáz se smíšenou funkcí (mixed function oxidases = MFO systém). Má tři základní složky: flavoproteinový enzym **NADPH:P450 reduktázu**, která slouží jako dělič elektronového páru, hemthiolátový enzym **cytochrom P450** jako terminální oxidázu a jeho neméně důležitou součástí je též biologická membrána. **Membránové lipidy** způsobují konformační změny cytochromu P450 zvyšující jeho afinitu k substrátu, stimulují tvorbu funkčně aktivního komplexu *cytochrom P450-NADPH:P450 reduktáza* a jsou „zásobárnou“ uložených substrátů cytochromu P450²⁵. Fakultativně může MFO systém obsahovat také cytochrom b₅ a NADH:cytochrom b₅ reduktázu²⁶.

MFO systém může být lokalizován:

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

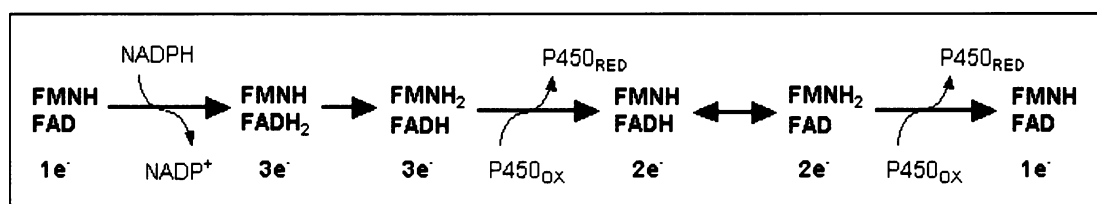
1.2.3.1 NADPH:P450 REDUKTÁZA

Enzym NADPH:P450 reduktáza je membránově vázaný „žlutý protein“, který katalyzuje přenos elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromu P450²⁷ (v daném organismu je jedna forma NADPH:P450 reduktázy schopna spolupracovat s více formami cytochromu P450), dále také na cytochrom c²⁸, cytochrom b₅²⁹, hem oxygenázu, ferrikyanid, elongázu mastných kyselin a další^{25,30}. NADPH:P450 reduktáza může být za určitých okolností zastoupena NADH:cytochrom b₅ reduktázou²⁶, které jako donor vodíku slouží NADH.

NADPH:P450 reduktáza má dvě funkční domény, hydrofobní N-terminální (6 kDa), kterou je zakotvena v membráně³¹ a hydrofilní C-terminální doménu (72 kDa)³². Účinkem pankreatické proteázy trypsinu lze solubilizovat C-terminální doménu, která je částečně funkční: je schopna přenášet elektrony na cytochrom c a některé arteficiální akceptory elektronů, cytochrom P450 již ale redukovat neumí³².

Interakce mezi NADPH:P450 reduktázou a cytochromem P450 jsou hlavně elektrostatické povahy - kladně nabitý povrch cytochromu P450 (lysiny, argininy) interaguje se záporně nabitým povrchem NADPH:P450 reduktázy (aspartát, glutamát). Dále se uplatňují také hydrofobní interakce mezi nepolárními aminokyselinami (leucin, tryptofan, valin) v oblasti membránových domén NADPH:P450 reduktázy a cytochromu P450^{33,34}.

Funkce NADPH:P450 reduktázy jako děliče elektronového páru byla vysvětlena na základě rozdílných redoxních potenciálů obou flavinových prosthetických skupin^{35,36,37}. Akceptorem elektronů (respektive atomů vodíku) od NADPH je FAD, který elektrony následně předává FMN. Za jedoelektronovou redukci akceptorové molekuly - cytochromu P450 - je (v případě savčí NADPH:P450 reduktázy) zodpovědný zcela redukovaný FMNH₂^{26,38}.



Vzhledem k tomu, že NADPH:P450 reduktáza a cytochromy P450 jako součásti MFO systému spolu velmi úzce „spolupracují“ při biotransformaci xenobiotik i endobiotik, některé ze sloučenin majících schopnost indukovat cytochromy P450 indukují současně i NADPH:P450 reduktázu, většinou však v menší míře. Doposud nebylo prokázáno, zda k indukci NADPH:P450 reduktázy dochází stejnými mechanismy (prostřednictvím stejných receptorů) jako při indukci cytochromu P450. NADPH:P450 reduktázu indukují například 3,3',4,4'-tetrachlorbifenyl³⁹, progesteron⁴⁰ a některé dimethylsiloxany⁴¹. Dále byla zvýšená aktivita NADPH:P450 reduktázy stanovena v jaterních, ledvinných a plicních mikrosomech u potkanů vystavených čtyřtýdenní inhalaci zplodin motorových vozidel^{42,43}.

Aktivita NADPH:P450 reduktázy je regulována zejména **hormonálně**, a to především hormonem štítné žlázy trijodtyroninem (T_3), který zasahuje do regulace exprese genu pro NADPH:P450 reduktázu na úrovni transkripce prostřednictvím responzivního elementu pro thyroideální hormony (TRE) v promotorové oblasti genu, a v menší míře se uplatňuje též stabilizace mRNA^{38,44}. Při absenci thyroideálních hormonů v organismu dojde k poklesu aktivity NADPH:P450 reduktázy v mikrosomech jater o 75 až 85 %, naproti tomu v ledvinách či plicích činí tento pokles 30 až 50 %^{44,45}. V nadledvinách a jiných steroidogenních tkáních je hladina NADPH:cytochrom P450 reduktázy regulována adrenokortikotropním hormonem (ACTH)^{45,46}.

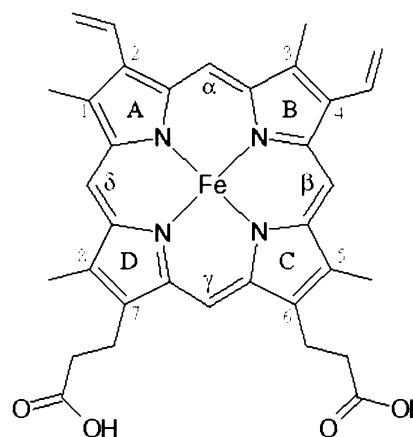
NADPH:P450 reduktáza je v rámci fylogeneze velmi konzervovaný enzym, NADPH:P450 reduktázy z různých rostlinných a živočišných druhů vykazují vysokou homologii v aminokyselinové sekvenci (například lidská a potkaní forma mají sekvenční homologii 92 %, přičemž nejvíce odlišností v aminokyselinové sekvenci se nachází v N-terminální „kotvící“ oblasti a naopak, FMN-vazebná doména je u obou forem téměř shodná⁴⁷. Tento fakt ukazuje na významnou roli tohoto enzymu v průběhu evoluce⁴⁸.

1.2.3.2. CYTOCHROM P450

Cytochrom P450 je terminální oxidázou MFO systému - zprostředkovává vazbu molekulárního kyslíku, jeho aktivaci a zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu⁴⁹, přičemž druhý atom kyslíku je redukován na vodu⁵⁰. Elektrony

potřebné k redukci dodává NADPH:P450 reductáza⁵¹, případně NADH:cytochrom b₅ reductáza⁵².

Garfinkel s Klingenbergem v roce 1958 objevili v jaterních mikrosomech pigment, který po redukci vykazuje v komplexu s oxidem uhelnatým **absorbční maximum při 450 nm**^{53,54}. Hemoproteinový charakter pigmentu dokázali Omura a Sato roku 1964 a na základě podobnosti povahy vazby hemu k cytochromu b a podle netypického maxima Soretova pásu jej nazvali cytochromem P450⁵⁵.



Obr. 2 Hem typu b (převzato z⁵⁶).

Eukaryotický mikrosomální cytochrom P450 je hemoprotein složený z jednoho polypeptidového řetězce o délce okolo 500 aminokyselin obsahující jednu molekulu hemu b (**Obr. 2**) vázanou koordinačně kovalentní vazbou přes -SH skupinu cysteinu, která je proximálním (pátým) ligandem železa v hemu²⁵. Nejedná se tedy o klasický cytochrom, ale o **hemthiolátový protein** (správnější označení by tedy bylo „enzym P450“⁵⁷). Vyskytuje se většinou podobě shluků několika molekul o relativní molekulové hmotnosti až 500 kDa zanořených do membrány⁵⁸.

Cytochromy P450 díky přechodnému charakteru hemového železa existují ve dvou spinových formách^{25,57}:

- **vysokospinová forma** vzniká v případě, že ion železa je **pentakoordinovaný** a všechny jeho valenční elektrony jsou nespárované (spin 5/2). Ion železa je „vytahován“ thiolátovou skupinou nad rovinu porfyrinového skeletu a tato forma vykazuje maximum Soretova pásu při **390 nm**.
- **nížkospinová forma** (spin 1/2) je charakteristická maximem absorbce při **418 nm** (Soretův pás). Ion železa je **hexakoordinován**, hemové železo tedy interaguje ještě s jedním ligandem (např. s -OH, -COOH nebo -NH₂ skupinou postranních řetězců aminokyselin apoproteinu²⁵ či atomem kyslíku z molekuly vody⁵⁹) a nachází se pak prakticky v rovině kruhu protoporfyrinu IX.

Oba spinové stavy jsou v klidovém stavu v rovnováze. Jejich poměr se značně mění při **vazbě substrátu** do vazebného místa, kdy dochází k vytlačení šestého ligandu a nárůstu obsahu vysokospinové formy. V absorpčním spektru se tedy ukáže nárůst absorbance při 390 nm a pokles při 418 nm – tzv. „substrátové

spektrum” (Obr. 3).

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

1.2.3.2.1. ENZYMOVÉ FUNKCE CYTOCHROMU P450

OXIDÁZOVÁ FUNKCE

- aktivace biatomické molekuly kyslíku pro klíčové reakce⁶⁰. Spontánní reakce organických molekul s atmosférickým kyslíkem jsou spinově zakázané, aerobní organismy proto mají proteiny nesoucí prosthetickou skupinu s kovem nebo flavinem, pomocí kterých jsou schopny oxidační potenciál kyslíku využít⁶⁰.

OXYGENÁZOVÁ AKTIVITA

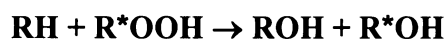
- zabudování kyslíku do molekuly málo reaktivního substrátu

REDUKČNÍ REAKCE

- elektrony poskytnuté NADPH:P450 reduktázou mohou redukovat přímo substrát a nejsou využity k aktivaci molekuly kyslíku. K tomu dochází, pokud je hydrofobní substrát zároveň i dobrým ligandem železa porfyrinového skeletu a je tedy vázán jako šestý ligand místo kyslíku. Tento mechanismus je popsán *in vitro*, a existují i nepřímé důkazy pro jeho průběh *in vivo*.

PEROXIDÁZOVÁ AKTIVITA

- místo kyslíku je druhým substrátem organický peroxid (R*OOH) nebo peroxid vodíku⁶¹. Pro průběh reakce není potřeba NADPH jako zdroj elektronů⁶². Produktem reakce je stejně jako při klasickém mechanismu hydroxylovaný substrát:

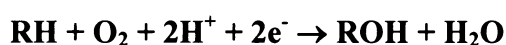


PRODUKCE H₂O₂ A AKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU

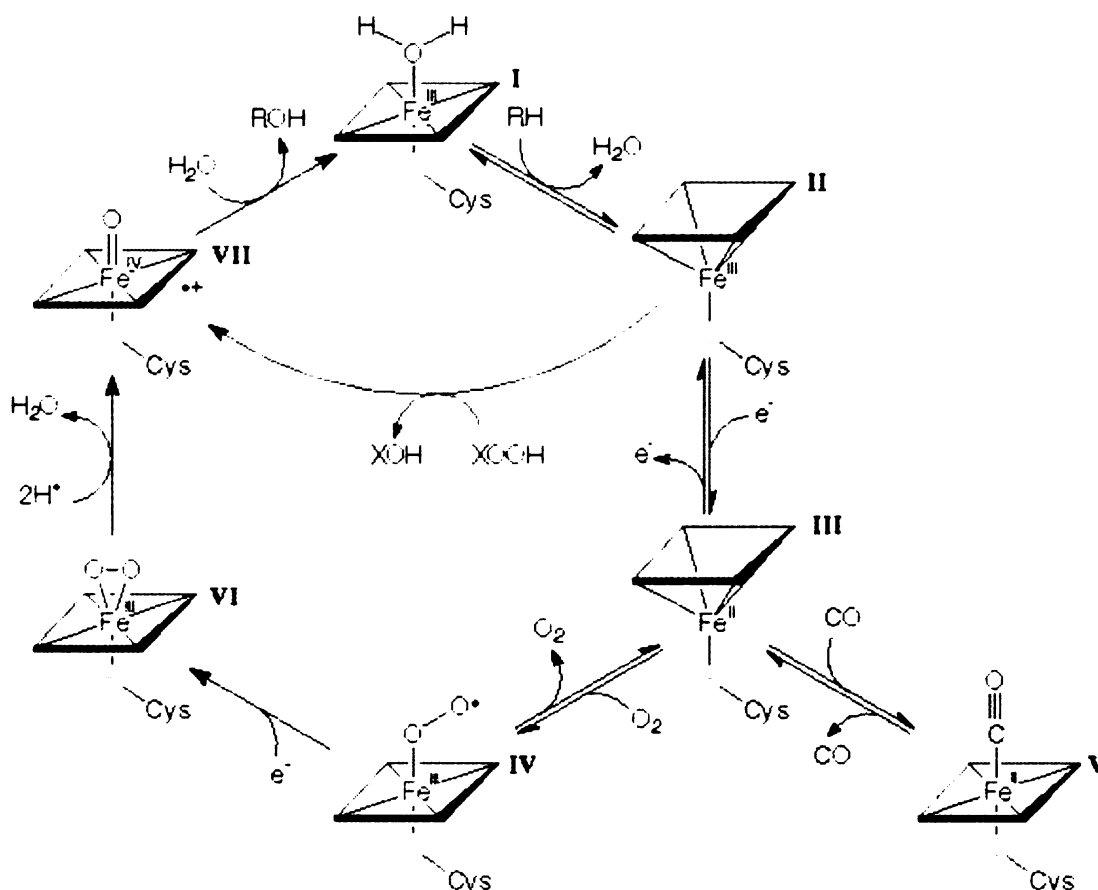
- když systém interaguje s látkou, která se obtížně hydroxyluje (je pouze hydrofobní, tvoří komplex s enzymem, ale těžko se do ní zabudovává kyslík), proběhne oxidázová fáze funkce cytochromu P450 (tj. aktivuje se molekula kyslíku), ale neproběhne fáze oxygenázová.

1.2.3.2.2. REAKČNÍ MECHANIZMUS MONOOXYGENÁZOVÉ REAKCE

Nejtypičtější reakcí katalyzovanou cytochromy P450 je monooxygenázová reakce, která zahrnuje **aktivaci molekulárního kyslíku a zabudování jednoho atomu do molekuly substrátu**. Aktivace kyslíku je umožněna dvěma elektrony pocházejícími z flavoproteinové reduktázy, kterou je převážně NADPH:P450 reduktáza, ale donorem druhého elektronu může být i NADH:cytochrom b₅ reduktáza²⁵. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Obecný průběh monooxygenázové reakce katalyzované cytochromem P450 lze vyjádřit sumární rovnicí (kde RH je substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce):



Reakční sled pravděpodobně sestává z osmi kroků a je znázorněn na **Obr. 3**⁶³.



Obr. 3 Schéma reakčního mechanismu monooxygenázové reakce. Naznačena je i peroxidázová aktivita cytochromu P450 a tvorba komplexu redukováného cytochromu P450 s oxidem uhelnatým. Bližší popis výše v textu. (převzato z⁶⁶).

I. V klidovém stavu je ion železa hemu ve ferri formě (tj. s oxidačním číslem III) a je hexakoordinován (v nízkospinovém stavu). Šestá valence je obsazena kyslíkem vody nebo interním (aminokyselinovým) ligandem.

II. Po vazbě substrátu [RH] do aktivního místa dochází k vytlačení šestého ligandu iontu železa, který je tedy jen pentakoordinován (vysokospinový stav), zároveň dochází ke konformační změně v molekule enzymu²⁵.

III. Navázáním substrátu je umožněna jednoelektronová redukce NADPH:P450 reduktázou, čímž se hemové železo redukuje na Fe^{II} (ferro forma) a zůstává pentakoordinováno (vysokospinový stav). Tato forma enzymu je pak schopna vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy⁶⁴.

IV. Navázáním molekulárního kyslíku na formu [III] vzniká ternární ferri-superoxidový komplex, kde je ion železa opět hexakoordinován a v nízkospinové formě. Tento nepříliš stabilní komplex je dále redukován NADPH:P450 reduktázou nebo NADH:cytochrom b₅ reduktázou, čímž dochází k aktivaci kyslíku na peroxidový anion. (Pokud není druhý elektron doručen dostatečně rychle, komplex [IV] se rozpadá a uvolněný superoxidový anionradikál je pak superoxidodismutázou přeměněn na peroxid vodíku, který je pro buňku toxický^{25,26}).

V. Vazba kyslíku na formu [III] může být inhibována v přítomnosti oxidu uhelnatého, který tvoří ternární ferrokomples cytochrom **P450-CO-RH**.

VI. U této již zcela aktivované formy cytochromu P450 dochází ke štěpení vazby O-O, přičemž jeden kyslík přijme dva protony a dojde k uvolnění vody, a druhý zůstane vázán na atomu Fe v hemu a vzniká tak

VII. Ferrioxenový komplex, který se stabilizuje mezomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík²⁶. Tento reaktivní kyslíkový radikál je pak schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu ze substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na Fe hemu. Dochází k rekombinaci radikálů za vzniku nativní formy cytochromu P450 [I] a hydroxyderivátu substrátu [ROH], jenž je pak uvolněn z enzymu^{53,65,66}.

V přítomnosti oxidačních činidel, jako jsou organické peroxidy, může z komplexu [III] vznikat přímo stav [VII] (peroxidázová aktivita).

1.2.3.2.3. VYBRANÉ PODRODINY CYTOCHROMŮ P450, JEJICH SUBSTRÁTY A INDUKTORY

- **CYP1A:** Lidská podrodina CYP1A má dva členy CYP1A1 a CYP1A2, oba enzymy si jsou značně podobné (vykazují až 70% homologii v aminokyselinové sekvenci), oba se nejvýznamněji podílejí na metabolismu karcinogenních látek.

CYP1A1 je extrahepatální, vyskytuje se hlavně v plicích, gastrointestinálním traktu, ledvinách, kůži, placentě a lymfocytech. Je silně indukován β -naftoflavonem, 3-methylcholantrenem, fenothiazinem, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD), 2-acetaminofluorenem, benzo[a]pyrenem a dalšími látkami, a to i v játrech. Substráty CYP1A1 jsou polykondenzované aromatické uhlovodíky (např. benzo[a]pyren, aminopyrin, 7-ethoxykumarin, tamoxifen, tabákově specifický nitrosamin [4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (=NKK)] či aflatoxiny.

CYP1A2 se vyskytuje jen v játrech (tvoří asi 13% celkového jaterního CYP obsaženého v lidském organismu), úroveň jeho exprese zde podléhá polymorfismu (liší se až 40x)⁶⁷. Indukován je podobně jako CYP1A1, tedy β -naftoflavonem, 3-methylcholantrenem, benzo[a]pyrenem. CYP1A2 metabolizuje antipyrin, tamoxifen, theofylin, fenacetin, N-hydroxyluje také aromatické a heterocyklické aminy vznikající při vysokoteplotním zpracování masa^{68,69,70,71,72,73}.

- **CYP2B:** V lidském organismu je v játrech a plicích zastoupen hlavně CYP2B6 (1% celkového jaterního CYP), potkaní formy podrodiny CYP2B jsou CYP2B1 a CYP2B2, králičí pak CYP2B4. Silnými induktory podrodiny CYP2B jsou barbituráty (fenobarbital) a dexamethazon. Jako substráty slouží např. nikotin a 7-ethoxykumarin⁷¹.
- **CYP2C:** Je málo inducibilní. V lidském organismu převažuje CYP2C8 a CYP2C9, v potkaních játrech je zastoupen hlavně CYP2C6 a CYP2C7, oba jsou indukovatelné fenobarbitalem. Substráty této podrodiny jsou hlavně léčiva s menší molekulou, např. diazepam, ibuprofen, retinol a další⁶⁸.
- **CYP2D:** V lidském organismu se vyskytuje CYP2D6 (asi 2,5% celkového jaterního CYP). Tato podrodina je podobná podrodině CYP2C (metabolizuje především léčiva s menší molekulou)⁷¹.
- **CYP2E:** V játrech lidského a potkaního organismu je zastoupen CYP2E1 asi 7%. Je indukován ethanolem, acetonem, izoniazidem, pyridinem a také hladověním. Do jeho aktivního místa ústí úzký přístupový kanál, kterým projdou jen malé

substráty. Substráty CYP2E1 jsou např. ethanol, kofein, acetaminofen, chlorzoxazon. Demethyluje některé karcinogenní nitrosaminy (N-nitrosodimethylamin)^{68,69,71,74}.

- **CYP 3A:** Tato podrodina hraje významnou roli v metabolismu xenobiotik v lidském organismu (potkani a králíci mají zastoupení této podrodiny malé). Nejvýznamnějšími členy této podrodiny jsou v lidském organismu CYP3A4 (28% jaterního cytochromu P450) a CYP3A5 (0-8% jaterního cytochromu P450). Po indukci např. barbituráty, rifampicinem či dexametazonem se jejich koncentrace může zvýšit až 20krát (u CYP3A5 až 100krát). Kromě jater se CYP3A vyskytují také v plicích a v tenkém střevě, kde se podílí na metabolismu orálně podávaných léčiv⁷⁵. Substrátová specifita CYP3A4 je mezi cytochromy P450 asi nejširší, CYP3A4 metabolizuje menší molekuly léčiv (nifedipin, cyklofosfamid), dále látky steroidní povahy (kortizol, estradiol, testosteron), ale také velkoobjemové substráty (erytromycin, cyklosporiny, taxol a další)^{68,71,73,76,77}.

1.2.3.2.4. REGULACE HLADINY CYTOCHROMŮ P450 INDUKCÍ ENZYMU

Řada cytochromů P450 patří mezi inducibilní enzymy. Indukce enzymů je definována jako nárůst exprese katalyticky aktivních forem enzymů. Jinak řečeno jako syntéza enzymů *de novo*, kdy dochází ke zvýšení transkripce na základě stimulace chemickým signálem⁷⁹.

Indukce cytochromů P450 obvykle zvyšuje biotransformaci xenobiotika, která by měla vést k jeho detoxikaci a vyloučení z organismu. Jedná se tedy především o ochranný mechanismus. Role indukovaných cytochromů P450 není ovšem z hlediska toxicity xenobiotik zcela jednoznačná. Indukce cytochromů P450 zvyšuje inaktivaci potenciálních toxických cizorodých látek. Na druhé straně je známo, že některé cytochromy P450 mohou nereaktivní sloučeninu aktivovat na chemicky reaktivní intermediáty, které jsou toxické. Některé z nich dokonce vykazují karcinogenní aktivitu²⁶.

V případě léčiv, která jsou aktivní bez metabolické aktivace, může indukce cytochromů P450 zvýšit jejich eliminaci a snížit farmakologický efekt. Pokud je například léčivo induktorem a zároveň substrátem některé izoformy cytochromu P450, může tak stimulovat svoji detoxikaci. Tato skutečnost může výsledně vést i k toleranci organismu pro dané léčivo. Naopak pro „proléčiva“, tedy látky, které

vyžadují metabolickou aktivaci a jejich efekt je vyvolán jejich metabolity, může indukce zvýšit jejich farmakologický účinek²⁶.

Indukce cytochromů P450 tedy může být pro organismus jak pozitivní (aktivace proléčiv), tak negativní (vznik okamžitých karcinogenů). Výsledný efekt pak záleží i na dalších okolnostech (např. v jakém orgánu dochází k indukci, jaká izoforma cytochromu P450 je indukována, v jakém množství)²⁶.

Indukci cytochromů P450 můžeme detekovat několika metodami: rozdílnou farmakologickou účinností vůči léčivu, nárůstem množství mRNA metodou „Northern blot“, nárůstem katalytické aktivity – měřením aktivity vůči specifickým substrátům, zvýšením obsahu cytochromu P450 – stanovením cytochromu P450 spektrálními technikami, zvýšenou expresí proteinů cytochromů P450. Ta je detekována metodou „Western blot“ za použití specifických protilátek⁷⁸.

Regulace exprese cytochromů P450 je řízena několika systémy. Jedná se o regulaci na genové úrovni, zahrnující funkci specifických receptorů, rychlostí přepisu DNA do RNA či stabilizaci syntetizované mRNA. Dále se pak jedná o posttranslační regulaci založenou především na stabilizaci syntetizované molekuly proteinu daného cytochromu P450⁷⁹. V **tabulce 3** jsou uvedeny základní mechanismy indukce cytochromů P450 a příklady jednotlivých cytochromů P450, které jsou těmito mechanismy indukované.

Tab. 3 Mechanismy indukce cytochromů P450

AHR- „aryl hydrocarbon receptor“, CAR- „constitutive androstane receptor“, PXR- „pregnane X receptor“, SXR- „steroid xenobiotic receptor“, PPAR- „peroxisome proliferator-activated receptor“ Převzato z⁷⁹

Mechanismus indukce	Cytochromy P450 těmito mechanismy indukované
Transkripce genu regulovaná receptory	CYP1A1, 1A2, 1B1 (AHR) CYP2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19 (CAR) CYP3A4, 3A5 (PXR a SXR) CYP4A11 (PPAR)
Rychlost transkripce („mRNA processing“)	CYP1A2
Stabilizace mRNA	CYP1A1, 2E1, 3A4
Stabilizace enzymu	CYP 2E1

1.2.4. CYTOPLASMATICKÉ ENZYMY KATALYZUJÍCÍ REDUKČNÍ REAKCE XENOBIOTIK

1.2.4.1. DT-DIAFORÁZA

DT-diaforáza [NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza] je flavoprotein katalyzující dvouelektronové redukce chinonů a chinoidních sloučenin. Donorem elektronů pro tyto reakce může být jak NADH, tak i NADPH s totožnou efektivitou⁸⁰.

Enzym je homodimer, v každém aktivním centru má jednu prosthetickou skupinu (FAD). Obě identické podjednotky jsou v „head-to-tail“ uspořádání a obě aktivní centra tvoří části těchto podjednotek⁸¹. Byla také zjištěna významná homologie v sekvenci aminokyselinových zbytků 142 až 158 DT-diaforázy izolované z jaterního cytosolu potkanů a v sekvencích vázajících pyrofosfát v jiných NAD(P)H – dependentních enzimech⁴².

DT-diaforáza má supresní vliv na karcinogenezi způsobenou chinony a jejich metabolickými prekurzory (např. benzen, benzo[a]pyren)^{82,83}. Toxické efekty chinoidních sloučenin spočívají v jejich kovalentní vazbě na DNA, RNA, proteiny a také v účasti na jedoelektronových oxidačně-redukčních pochodech vedoucích k tvorbě oxidativního stresu⁴². Ochranná role tohoto enzymu souvisí s jeho schopností redukovat chinony na hydrochinony a na jeho schopnosti kompetovat s dalšími reduktázami, které tvoří reaktivní formy kyslíku při katalýze jedoelektronových redukcí chinonů na semichinony⁸⁰. Vzniklé hydrochinony jsou následně inaktivovány CDP-glukuronosyltransferázami⁴².

Vedle redukce chinonů může DT-diaforáza rovněž redukovat (a aktivovat) řadu dalších sloučenin. Jde o cytostatika (např. mitomycin C nebo tirapazamin-3-amino-1,2,4-benzotriazen-1,4-dioxid) nebo o toxické polutanty jako azobarviva, nitroso- a nitroaromáty^{7,84,85,86,87,88}. Experimenty prováděné v naší laboratoři (katedra biochemie, PřF UK Praha) potvrdily, že potkaní DT-diaforáza vykazuje také nitroreduktázovou aktivitu vůči aristolochovým kyselinám (AA)^{18,42}.

Aktivita DT-diaforázy je vyšší v nádorových buňkách ve srovnání s buňkami zdravé tkáně⁸⁹. J. K. Schlager a G. Powis⁹⁰ publikovali nález zvýšených aktivit enzymu v buňkách karcinomu tlustého střeva, jater, plic a prsu, zatímco buňky adenokarcinomu žaludku měly ve srovnání s buňkami zdravé tkáně aktivitu DT-

diaforázy nižší⁹⁰. Enzym je neúčinnější v anaerobních podmínkách, které jsou typické pro maligně transformované buňky^{88,91}.

Hlavní cytosolární forma lidské DT-diaforázy je kódována genem *NQO1*, lokalizovaným na chromozomu 16q2.2⁹². V lidské populaci se vyskytují dvě rozdílné alely genu *NQO1*. Vzácnější forma, nazývaná též nulová alela⁹³, kóduje DT-diaforázu se změněnou katalytickou aktivitou. Nález nulové alely genu *NQO1* výrazně zvyšuje riziko vzniku urologických malignit⁹³ a karcinomu plic^{94,95}.

Každý z obou polypeptidových řetězců lidské izofomy obsahuje 274 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 30867 Da⁴². Řetězce jsou identické na úrovni primární struktury, liší se však zastoupením α -helixů a β -struktur na úrovni struktury sekundární. V každém řetězci je výrazná stočená antiparalelní β -struktura.

Rovněž potkaní izofoma DT-diaforázy je složena ze dvou polypeptidových řetězců, z nichž každý obsahuje 273 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 30801 Da⁴². Řetězce jsou identické na úrovni primární struktury, liší se však zastoupením α -helixů a β -struktur na úrovni struktury sekundární. Řetězec „A“ obsahuje sedm α -helixů (27,84%) a osm β -struktur (12,82%), zatímco řetězec „B“ obsahuje osm α -helixů (29,67%) a osm β -struktur (13,19%)⁸¹. V každém řetězci je výrazná stočená antiparalelní β -struktura⁴².

1.2.4.1.1. INDUKCE DT-DIAFORÁZY

Schopnost indukovat DT-diaforázu vykazuje mnoho sloučenin⁹². Potkaní cytosolární DT-diaforáza je indukována prostřednictvím Ah receptoru. K indukci DT-diaforázy dochází po premedikaci 3-methylcholantrenem nebo 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem, které aktivují Ah receptor, kde je indukována společně s Ah-hydroxylasou a glutathion-S-transferázou⁹⁶.

Mezi další sloučeniny účinně indukující DT-diaforázu patří 1,1'-azonaftaleny, analoga Sudanu I, Sudanu III, kumariny, flavonoidy, polycyklické aromatické uhlovodíky, sloučeniny obsahující ve své molekule síru, fenolické antioxidanty, butylovaný hydroxytoluen (BHT), butylovaný hydroxyanisol (BHA)⁸².

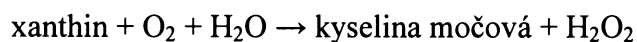
Přesný mechanismus indukce DT-diaforázy ještě nebyl přesně objasněn^{92,96}, nicméně existence různých genů v potkaních a lidských játrech svědčí o přítomnosti násobných forem enzymu^{96,97}. Jeden gen je těsně spojený s genem regulujícím indukci Ah monooxygenázy, další je lokalizován na jiném chromozomu. Tak

například tamoxifen a transhydroxytamoxifen patřící do skupiny antiestrogenů stimulují expresi DT-diaforázy prostřednictvím receptoru specifického pro estrogeny (ER receptor), který je jiný než Ah receptor⁹⁷. Dále existuje jiná skupina induktorů, do níž patří např. tert-buthydrochinon, která k indukci DT-diaforázy žádný intracelulární receptor nepotřebuje⁹⁷. Indukce tohoto enzymu v jiných tkáních nebyla ještě studována.

Nejsilnějšími induktory DT-diaforázy jsou 1,1'-azonaftalen, Sudan I, Sudan III a jejich analoga. K regulaci hladin indukovatelného enzymu přispívá rychlost transportu induktorů, jejich přeměny na reaktivní metabolity a exkrece nebo další metabolismus induktorů⁹⁸.

1.2.4.2. XANTHINOXIDÁZA

Xanthinoxidáza je flavoprotein katalyzující oxidativní hydroxylaci řady aromatických heterocyklických sloučenin (xanthin, hypoxanthin) a aldehydů. V organismu plní svou funkci především při odbourávání purinových bází. Z purinů se nejprve odštěpí ribosa a uvolněný guanin se deaminuje na xanthin. Ten je poté hydroxylován v poloze C₈ na kyselinu močovou⁹⁹. Katalyzovaná reakce je schematicky znázorněna rovnicí:



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

- každá z prvních dvou domén je koordinována s **[Fe₂S₂] klastrem**
- následuje **flavinová doména**
- nakonec jsou dvě domény, vážící dvě molekuly molybdenu jako kofaktoru. Tento komplex cyklicky přechází z plně oxidovaného stavu (Mo VI) do redukováného stavu (Mo IV). (převzato z <http://www.expasy.ch>)

Enzym se v jaterní tkáni obratlovců *in vivo* vyskytuje převážně ve formě xanthindehydrogenázy, do oxidázové formy může být převeden skladováním při teplotě -20°C za přidání organických rozpouštědel. (převzato z <http://www.expasy.ch>)

Indukce xanthinoxidázy xenobiotiky nebyla prakticky zjištěna, existuje však regulace její aktivity endogenními látkami¹⁰⁰.

1.2.4.3. ALDEHYDOXIDÁZA

Aldehydoxidáza je flavoprotein katalyzující oxidaci řady nitrogenovaných sloučenin^{101,102}.

Enzym je homodimer, každá podjednotka je tvořena 907 aminokyselinami. Skládá se z molybdopterinového kofaktoru a dvou odlišných Fe_2S_2 -center. Je rozložen na čtyři domény, z nichž první dvě váží Fe_2S_2 -centra a další dvě se účastní vazby molybdopterinového kofaktoru¹⁰³. Sekvencí aminokyselin a strukturou domén je aldehydoxidáza velmi podobná xanthindehydrogenáze. (převzato z <http://www.expasy.ch>)

1.3. AROMATICKÉ NITROSLOUČENINY

Aromatické nitrosloučeniny jsou významnou skupinou toxických a karcinogenních kontaminantů životního prostředí, které představují značný rizikový faktor pro lidské zdraví. Je zřejmé, že jsou přítomny ve všech složkách životního prostředí. Nitroaromáty jsou významnou součástí výfukových plynů a vzdušných prachových částic, na jejichž povrch jsou adsorbovány. Regionální znečištění těmito sloučeninami je spojeno s řadou procesů. Nitroaromáty vznikají z oxidů dusíku produkovaných všemi vysokoteplotními procesy (spalování fosilních paliv, tepelná likvidace odpadů a zpracování kovů), dalších vzdušných polutantů a polycyklických aromatických uhlovodíků – ty provázejí silnou automobilovou dopravu. Lokální znečištění aromatickými nitrosloučeninami je vyvoláno především úniky z technologií na jejich zpracování. Přítomny jsou rovněž v cigaretovém kouři a vznikají i při úpravě některých potravin. Nitrofurany a nitroimidazoly jsou používány jako léčiva (převzato z¹⁰⁴).

Z hlediska vlivu na zdraví člověka jsou aromatické nitrosloučeniny někdy považovány za jednotnou skupinu sloučenin. Jednotliví zástupci však vykazují speciální působení, které vyplývá z heterogenity jejich metabolismu a enzymů podílejících se na tomto procesu v organismech. Většina aromatických nitrosloučenin vykazuje mutagenní aktivitu v bakteriálních i savčích systémech a jsou karcinogeny vyvolávajícími nádorové procesy především v játrech, plicích a prsních žlázách. Jejich podíl na vývoji nádorových procesů v lidském organismu nebyl doposud jednoznačně prokázán, ale epidemiologické studie u pacientů trpících nádorovým onemocněním prsu a plic naznačují potenciální podíl těchto sloučenin na etiologii onemocnění u obyvatelstva žijícího v prostředí jimi kontaminovaném (převzato z¹⁰⁴).

1.3.1. NITROAROMÁTY A LIDSKÉ ZDRAVÍ

Národním toxikologickým programem USA byly označeny za silně podezřelé z karcinogenity pro lidský organismus 2-nitroanisol, 1-nitropyren, 4-nitropyren, 1,6-dinitropyren, 1,8-dinitropyren, 6-nitrochrysen a nitrofen. Z dalších fyziologicky účinných nitroaromátů je nutné zmínit rostlinné produkty aristolochové kyseliny a léčiva používaná v humánní a veterinární medicíně, nitrofurany a nitroimidazoly (převzato z¹⁰⁴).

2-Nitroanisol (1-methoxy-2-nitrobenzen) je primárně používán jako prekurzor při výrobě *o*-anisidinu (2-methoxyanilinu) pro výrobu více než 100 různých azobarviv. Je rovněž používán ve farmaceutickém průmyslu jako meziprodukt při syntéze některých léčiv (převzato z¹⁰⁴).

Nitropyreny jsou vzdušnými polutanty. 1-Nitropyren je jednou z hlavních mutagenních komponent výfukových plynů, zatímco dinitropyreny jsou složkami minoritními. Všechny mono- a dinitropyreny jsou pro experimentální zvířata karcinogenní. Z těchto sloučenin jsou nejnebezpečnější 1-nitropyren, který je dokonce spojován s vývojem nádorového onemocnění (plicní nádory) v lidském organismu a 6-nitrochrysen. Ten iniciuje v organismech experimentálních zvířat nádory plic, jater a prsních žláz (převzato z¹⁰⁴).

4-Nitrobifenyl a jeho redukční derivát 4-aminobifenyl, jsou polutaty pracovního prostředí chemického průmyslu, které vyvolávají nádory močového měchýře. Nitrofen byl dlouhodobě používán jako kontaktní herbicid v ochraně

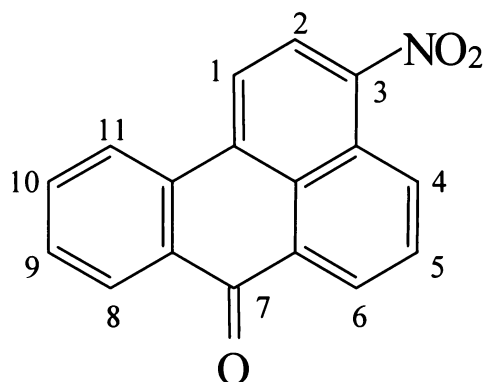
kulturních plodin, jako jsou rýže, květák, brokolice, zelí, cibule, česnek a celer. Vzhledem k jeho hromadění v půdě, její kontaminaci a také kontaminaci samotných zemědělských produktů a silným karcinogenním účinkům nitrofenu na experimentální zvířata bylo jeho používání zakázáno.

Nitrofurany a nitroimidazoly jsou používány v lidské a veterinární medicíně pro své antibakteriální účinky. 5-Nitroimidazoly jsou účinné proti *Trichomonas vaginalis* a dalším infekčním onemocněním člověka. Misoimidazol je využíván pro zvýšení účinnosti v radiační chemoterapii. Nitroimidazoly vykazují v bakteriálních testech mutagenní aktivitu, ale v savčích systémech je jejich mutagenita podstatně nižší (převzato z¹⁰⁴).

Mezi velmi nebezpečné nitroaromáty patří i některé přírodní produkty. Aristolochové kyseliny přítomné v listech a kořenech rodu *Aristolochia*, jsou jedním z příkladů. Jejich fatální použití v terapii nadváhy pomocí čínských bylin vedlo k vývoji ledvinového selhání a nádorů močových cest. Farmaceutické používání těchto látek bylo proto také zakázáno (převzato z¹⁰⁴).

1.3.1.1. 3-NITROBENZANTHRON

3-Nitrobenzanthron (3-NBA, **Obr. 4**) je též polycyklickou aromatickou nitrosloučeninou. 3-NBA je jedním z nejsilnějších mutagenů, který je i potencionálním karcinogenem pro hlodavce^{105,106}. Jeho genotoxicita byla prokázána v řadě testů na mutagenitu^{107,108,109} a potenciálem tvořit specifické adukty s DNA, detekované v experimentech *in vitro*, v buněčných kulturách *in vivo* v organismu laboratorního potkana^{110,111,112,113,114,115,116,117,118,119}. Jeho výskyt ve složkách životního prostředí a jako součást výfukových plynů byl prokázán teprve nedávno^{105,120}. Tvořen je pravděpodobně buď nedokonalým spalováním nafty nebo reakcí parentálního polycyklického uhlovodíku s oxidy dusíku z atmosféry¹⁰⁵. Výskyt 3-NBA je však daleko širší. Nedávno byl detekován také v půdě na zemském povrchu a jako součást srážkových vod^{121,122,123}. Tato sloučenina tedy ohrožuje velké skupiny lidské populace. Vyšší riziko jeho toxického působení připadá na skupiny obyvatelstva působící v pracovním prostředí některých odvětví. Ohrožení jsou především profesionální řidiči, pracovníci garáží, mechanici či horníci¹²⁰. Jako marker vystavení populace 3-NBA by mohl sloužit jeho redukční metabolit 3-aminobenzanthron (3-ABA). Ten byl nedávno detekován v moči pracovníků solných dolů¹²⁰. I u této sloučeniny byla prokázána její genotoxicita¹¹⁶.



Obr. 4 *Struktura 3-nitrobenzanthronu*

3-NBA a jeho redukční metabolit 3-ABA jsou schopné generovat adukty s DNA. Ty byly detekovány jak v experimentech *in vitro*, tak i *in vivo* v různých tkáních laboratorních potkanů, kterým byly tyto sloučeniny aplikovány intraperitoneálně^{105,111,112,113,114,115,116,117,118}.

2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo rozšířit poznatky o toxických účincích aromatických nitrosloučenin, konkrétně sloučeniny, která je silným mutagenem a potenciálním karcinogenem pro organismy, 3-nitrobenzanthronu (3-NBA). Konkrétní cíle pak byly dva.

- 1) Poznání vlivu 3-nitrobenzanthronu na enzymy biotransformující xenobiotika v organismech in vivo, se zvláštním zaměřením na enzymy, které přímo participují na metabolické aktivaci této látky.
- 2) Metabolická studie přeměny 3-nitrobenzanthronu cytosolárními enzymy jaterní tkáně modelového organismu, laboratorního potkana, a rekombinantní lidskou DT-diaforázou.

Diplomová práce byla řešena jako součást grantového projektu GAČR 303/05/2195, který je zaměřen na studium mechanismu působení 3-nitrobenzanthronu na lidský organismus.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. MATERIÁL

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

- **Bio-Rad Lab., USA**
Affi-Gel Blue
- **Chemopetrol, Česká republika**
suchý led
- **Fluka, Švýcarsko**
Tween 20, akrylamid, Coomassie Brilliant Blue R-250, tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), cytochrom c, methanol, 7-ethoxyresorufin, 7-pentoxyresorufin, resorufin
- **Koch-Light Lab., Velká Británie**
2-merkapt ethanol
- **Lachema, Česká republika**
ethanol, glycerol, methanol, aceton, ethylester kyseliny octové, hydroxid sodný, hydroxid draselný, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, síran amonný, chlorid sodný, chlorid draselný, dithioničitan sodný, bromfenolová modř, tartarát sodný, hydrogenuhličitan sodný, uhličitan sodný dekahydrát, síran měďnatý pentahydrát, dihydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan sodný, pyrofosforečnan sodný dekahydrát, acetát sodný, Red Ponceau, chlorid hořečnatý
- **Linde, Česká republika**
kapalný dusík, oxid uhelnatý

- **Merck, SRN**
menadion (vitamin K₃), glukosa-6-fosfát, testosteron, 6β-hydroxytestosteron
- **Millipore Corporation Bedford MA, USA**
transfer membrane Immobilon-P
- **Reanal Budapešť, Maďarsko**
glycin
- **Roche, SRN**
NADH, NADPH
- **Serva Heidelberg, SRN**
hypoxanthin, N,N'-metylen-bis-akrylamid, Triton X-100, N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)
- **Sevapharma a.s., Česká republika**
hovězí sérový albumin (BSA)
- **Sigma, USA**
kyselina bicinchoninová (BCA), dodecylsulfát sodný, standard pro SDS-elfo („Wide Range standard“, Mr 6500 – 205000), 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitrobluetetrazolium (BCIP/NBT), dexfenfluramin, PCN, glukosa-6-fosfátdehydrogenáza, králičí protilátka IgY značená alkalickou fosfatázou, chlorzoxazon, fenacetin, lidská rekombinantní DT-diaforáza, dimethylsulfoxid (DMSO)
- **The British Drug Houses, Velká Británie**
Sudan I

- **Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Praha, Česká republika**
6-hydroxychlorzoxazon
- za poskytnutí primárních protilátek proti cytochromům P450 podrodiny 1A, 2B, 3A a 2E použitých při imunochemické detekci těchto forem cytochromu P450 a primárních protilátek proti reduktáze a DT-diaforáze velice děkuji RNDr. Petru Hodkovi
- 3-nitrobenzanthron – dar od Doc. H. H. Schmeisera, Německé centrum pro výzkum rakoviny v Heidelbergu
- jaterní cytosoly potkanů premedikovaných Sudanem I – izolovány kolegy v laboratoři (katedra biochemie, PřF UK)

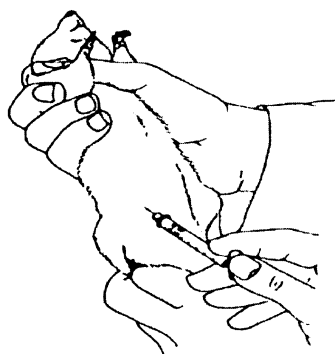
3.2. METODY A PŘÍSTROJE

3.2.1. PREMEDIKACE LABORATORNÍCH POTKANŮ

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

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

3-Nitrobenzanthron byl rozpuštěn v rostlinném oleji. Koncentrace 3-NBA byla upravena tak, aby byl potkanům aplikován 1 ml roztoku pro výslednou dávku 3-NBA 0,4 mg/kg, 4 mg/kg a 40 mg/kg hmotnosti zvířete. Roztok 3-NBA byl aplikován intraperitoneálně (Obr. 5). Zvířata byla usmrcena 24 hodin po podání roztoku 3-NBA. Játra, ledviny, plíce, srdce a sleziny zvířat byly vyjmuty a použity pro izolaci subcelulárních systémů (mikrosomů a cytosolu).



Obr. 5

Nákres intraperitoneální aplikace

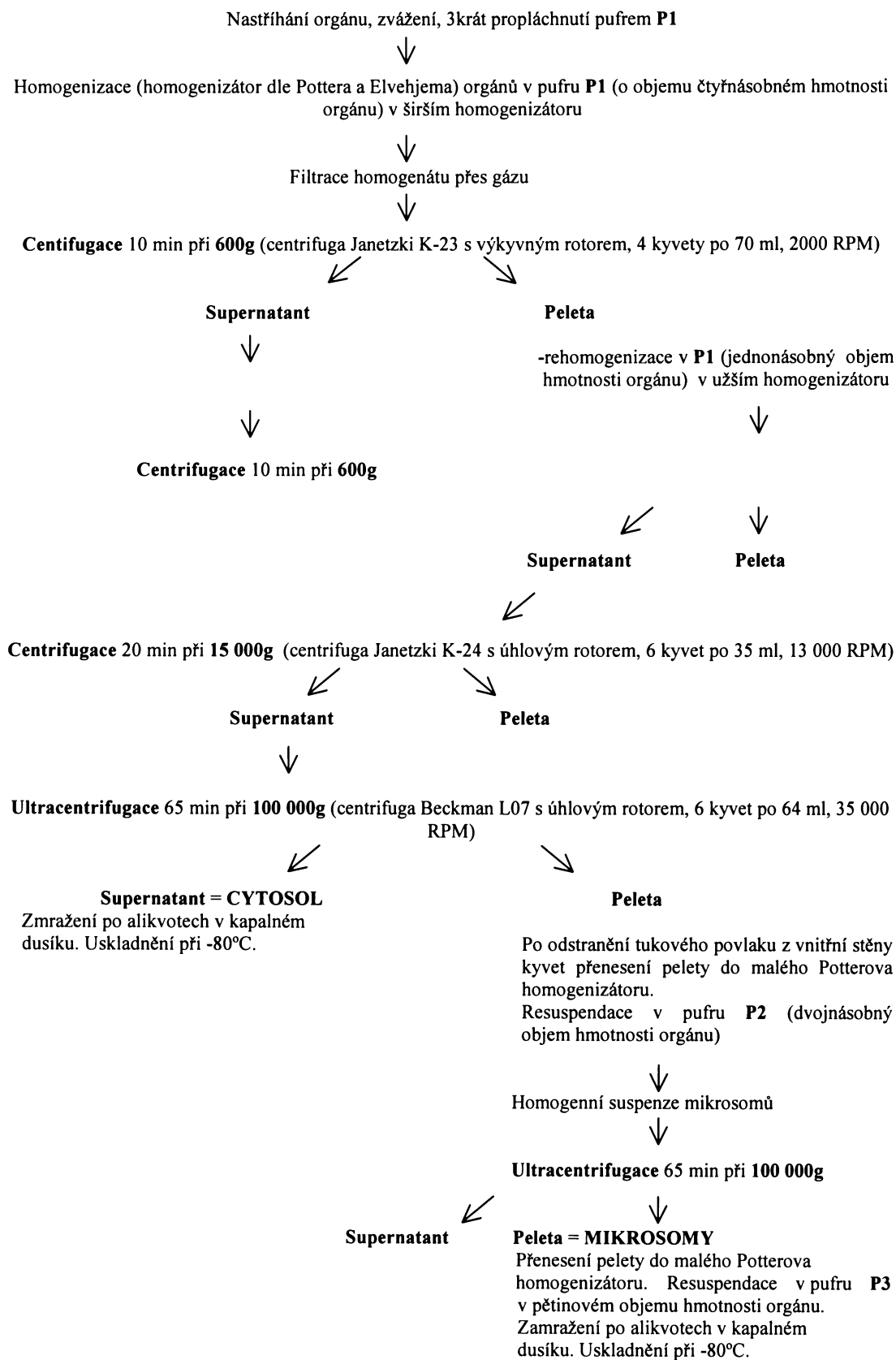
3.2.2. IZOLACE SUBCELULÁRNÍCH SYSTÉMŮ Z ORGÁNŮ LABORATORNÍCH POTKANŮ

Použité pufrы: pufr P1 (2000 ml): 150 mM KCl, 50 mM Tris, pH 7,4

pufr P2 (pyrofosfátový, 1000 ml): 100 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$,
pH 7,2

pufr P3 (100 ml): 150 mM KCl, 50 mM Tris, 20% glycerin,
pH 7,4

Izolace cytosolů a mikrosomů se prováděla podle uvedeného schématu:



3.2.3. STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINU

Roztoky a chemikálie: BCA, standard BSA, roztok A (0,4% NaOH; 0,95% NaHCO₃; 2% Na₂CO₃·H₂O; 0,16% tartarát sodný; pH 11,25), roztok B (4% CuSO₄·5H₂O)

Princip: Ke stanovení jsme využili „bicinchoninovou metodu“¹²⁴. Podstatou je tvorba modře zbarveného komplexu měďných iontů (Cu⁺) s kyselinou bicinchoninovou (BCA). Postranní skupiny některých aminokyselin redukují měďnaté ionty (Cu²⁺) přítomné v činidle (viz níže) na měďné (Cu⁺) a intenzita zabarvení (množství komplexu) je tedy přímo úměrná koncentraci bílkoviny.

Postup: Připraví se zásobní roztok BSA o koncentraci asi přesně 0,4 mg/ml. Následuje příprava činidla dle následujícího postupu: BCA se naváží a rozpustí ve 49 dílech roztoku A tak, aby výsledná koncentrace byla 1% BCA v 50 dílech. Po rozpuštění se přidá 1 díl roztoku B a opět se promíchá.

Do vyžíhaných zkumavek se pipetuje 20 µl měřeného vzorku naředěného tak, aby výsledná koncentrace bílkoviny po přidání činidla byla 10-15 µg/ml. Přidá se 980 µl činidla a roztok se promíchá. „Blank“ se připraví smícháním 980 µl činidla a 20 µl destilované vody. Dále se do zkumavek pipetuje 10, 20, 30, 40, 50 a 60 µl zásobního roztoku BSA a doplní se činidlem do 1000 µl. Takto připravené roztoky se promíchají na vortexu.

Inkubace se provádí ve vodní lázni při 60°C po dobu 60 minut. Po ochlazení vzorků se měří absorbance při 562 nm (A_{562}) na dvoupraprskovém spektrofotometru Specord M40 (Carl Zeiss Jena, Německo).

Z naměřených hodnot se vyhotoví kalibrační křivka (tabulkový editor Excel). Na ose y je vynesena absorbance A_{562} a na ose x koncentrace standardu (BSA) v µg/ml. Hodnoty koncentrace bílkoviny ve vzorcích se odečtou z grafu a vynásobí se zředěním. Celou operaci lze popsat vztahem:

$$c_b = A_{562}(\text{vzorek})/A_{562}(\text{standard}) \cdot c_{BSA} \cdot \text{ředění} \text{ [mg/ml]}$$

c_b - koncentrace bílkoviny

A_{562} - absorbance při vlnové délce 562 nm

c_{BSA} - koncentrace standardu

3.2.4. STANOVENÍ KONCENTRACE CYTOCHTOMU P450

Princip: Cytochrom P450 vykazuje v redukovaném stavu v komplexu s CO výrazné absorpční maximum při vlnové délce 450 nm. Na základě tohoto jevu se provádí stanovení koncentrace cytochromu P450 metodou diferenčních spekter⁵⁵.

Složení roztoků a pufrů: pufr 0,1 M KH₂PO₄, 2% (v/v) glycerol, pH 7,5; dithioničitan sodný (Na₂S₂O₄).

Postup: Do zkumavky se pipetuje 1960 μl pufru, 40 μl měřeného vzorku mikrozomální frakce a přidá se několik krystalů Na₂S₂O₄. Tato směs se zvolna promíchá pipetou tak, aby se netvořily bubliny. Do obou kyvet (o objemu 1 ml a optické dráze 1 cm) se pipetuje po 1 ml tohoto roztoku. Na dvoupaprskovém spektrofotometru Specord M40 (Carl Zeiss Jena, Německo) je proměřena základní linie (tzv. „baseline“) v rozsahu 400-500 nm.

Měřící kyveta se probublává 60 sekund oxidem uhelnatým. Poté se opět proměří diferenční absorpční spektrum v rozsahu 400-500 nm.

Výsledná koncentrace cytochromu P450 se vypočte z následujícího vztahu:

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

c_{P450} - koncentrace cytochromu P450

$\Delta A_{(450-490)}$ - rozdíl absorbance při vlnové délce 450 nm a 420 nm

ε - molární absorpční koeficient (zde $\varepsilon = 0,091 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$)

Cytochrom P450 může působením různých faktorů přecházet ve formu označovanou jako cytochrom P420, neboť jeho redukovaná forma v komplexu s oxidem uhelnatým vykazuje výraznou absorpci při vlnové délce 420 nm. Přechod cytochromu P450 na tuto biologicky inertní formu může být výsledkem působení různých enzymů (například fosfolipas), detergentů, některých alkoholů, ketonů a mnoha dalších substancí.

Obsah cytochromu P420 byl určen ze vzorce:

$$c_{P420} = \text{ředění} \cdot \Delta A_{(420-490)} / \varepsilon \quad [\mu M]$$

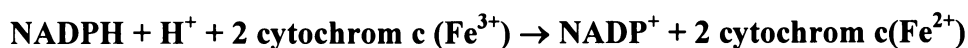
c_{P420} - koncentrace cytochromu P420

$\Delta A_{(420-490)}$ - rozdíl absorbance při vlnové délce 450 nm a 420 nm

ε - molární absorpční koeficient (zde $\varepsilon = 0,091 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$)

3.2.5. STANOVENÍ AKTIVITY NADPH:P450 REDUKTÁZY

Princip: Stanovení aktivity NADPH:P450 reduktázy se provádí měřením rychlosti redukce cytochromu c za současné oxidace NADPH při vlnové délce 550 nm^{125,126}.



Složení roztoků a pufrů: pufr 0,1M KH₂PO₄, pH 7,4 25 mg/ml cytochrom c, 10 mM NADPH

Postup: pufr 0,1 M KH₂PO₄ uchovávaný při teplotě 6°C se nechá vytemperovat na laboratorní teplotu. Roztoky NADPH a cytochromu c se nechají rozmrazit a poté se uchovávají spolu s měřeným vzorkem v ledu.

Do kyvety se pipetuje pufr tak, aby celkový objem směsi byl 1 ml, 40 μl cytochromu c (12,5 mg/ml) a \underline{x} μl měřeného vzorku (kde \underline{x} může být 5, 10, 15, 20, 30 nebo 50 μl podle aktivity vzorku). Tato směs se promíchá a změří se jako „blank“ při vlnové délce 550 nm. Poté se k „blanku“ přidá 10 μl 10 mM NADPH, kterým je reakce startována, roztok v kyvetě se promíchá a proměří při vlnové délce 550 nm po dobu 120 sekund s intervalem 1 sekunda na jednopaprskovém spektrofotometru Hewlett Packard 8453E.

Výsledkem měření je graf tvořený v optimálním případě přímkou kladné směrnice. Na ose \underline{y} je absorbance A_{550} a na ose \underline{x} čas v sekundách. Z grafu se odečítá hodnota změny absorbance za 60 sekund [$\Delta A/\text{min}$]. Tato hodnota se přepočítává na specifickou aktivitu enzymu [$\Delta A/(\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{proteinu}})$]. Dále se uvádí aktivita reduktázy ve standardních jednotkách enzymové aktivity. Jednotka U (Unit) aktivity NADPH:P450 reduktázy je definována jako množství enzymu katalyzující redukci 1 μmol cytochromu c ($\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) za minutu.

3.2.6. STANOVENÍ AKTIVITY DT-DIAFORÁZY

Princip: Stanovení aktivity DT-diaforázy se provádí měřením rychlosti oxidace NADH menadionem (2-methyl-1,4-naftochinon) při vlnové délce 340 nm^{29,104}.

Složení roztoků a pufrů: pufr 25 mM Tris-HCl (pH 7,4); 2% (w/w) Tween 20; 3,4% (w/w) BSA; 5 mM menadion - rozpuštěný v methanolu, 20 mM NADH nebo NADPH

Postup: Pufr Tris-HCl (pH 7,4) uchovávaný při teplotě 6°C a menadion se vytemperují na laboratorní teplotu. V průběhu měření se měřený vzorek, NADH, BSA a Tween 20 uchovávají v ledu.

Do kyvety se pipetuje pufr tak, aby celkový objem směsi byl 2 ml, 20 μ l 2% (w/w) Tweenu 20, 40 μ l 3,4% (w/w) BSA, 80 μ l 5mM menadionu, x μ l měřeného vzorku (kde x může být 10, 20, 30 nebo 50 μ l podle aktivity vzorku). Směs se důkladně promíchá a změří jako „blank“ při 340 nm. Poté je reakce startována přidáním 20 μ l 20 mM NADH nebo NADPH, roztok v kyvetě se promíchá a měří se absorbance při vlnové délce 340 nm po dobu 120 sekund s intervalem 1 sekunda na jednopaprskovém spektrofotometru Hewlett-Packard 8453E.

Výsledkem měření je graf tvořený v optimálním případě přímkou záporné směrnice. Na ose y je absorbance A_{340} a na ose x čas v sekundách. Z grafu se odečítá hodnota změny absorbance za 60 sekund [$\Delta A/\text{min}$]. Tato hodnota se přepočítává na specifickou aktivitu enzymu [$\Delta A/(\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{proteinu}})$]. Dále se uvádí aktivita DT-diaforázy ve standardních jednotkách enzymové aktivity. Jednotka U (Unit) aktivity DT-diaforasy je definována jako množství enzymu katalyzující oxidaci 1 μ mol NAD(P)H ($\epsilon = 6,27 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) za minutu.

3.2.7. STANOVENÍ OBSAHU VYBRANÝCH IZOFOREM CYTOCHROMU P450

Stanovení specifické aktivity jednotlivých izoform cytochromu P450 neposkytuje zcela přesnou informaci o obsahu jednotlivých izoform, neboť enzymy mohou být poškozeny (např. během izolačních postupů), a ztrácí tedy svou katalytickou schopnost. Obsah vybraných izoform byl tedy stanovován metodou

„Western blot“ za použití specifických protilátek proti jednotlivým izoformám.

Po rozdělení dle molekulové hmotnosti pomocí elektroforézy v přítomnosti dodecylsulfátu sodného byly proteiny obsažené v mikrozomální frakci přeneseny z polyakrylamidového gelu na přenosovou membránu z polyvinylidenfluoridu (PVDF) nebo nitrocelulózovou membránu. Poté byla provedena imunochemická detekce jednotlivých forem cytochromu P450.

3.2.7.1. ELEKTROFORÉZA NA POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU V PŘÍTOMNOSTI SDS

Provedení elektroforézy na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti 0,1% dodecylsulfátu sodného (SDS) vycházelo z postupu Laemmliho¹²⁷. Elektroforéza byla provedena za stálého chlazení vodovodní vodou v aparatuře od firmy OMNI-BIO (Česká republika).

Složení roztoků a pufrů:

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

Příprava gelů:

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

Příprava vzorků na elektroforézu:

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

Vlastní elektroforéza:

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

Vyhodnocení elektroforézy:

Jako standardů bylo využito 13 proteinů se známými molekulovými hmotnostmi, tzv. Wide Range: myosin 205 kDa, β -galaktosidáza 116 kDa, fosforyláza b 97 kDa, fruktosa-6-fosfátkináza 84 kDa, albumin 66 kDa, glutamindehydrogenáza 55 kDa, ovalbumin 45 kDa, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza 36 kDa, karbonátanhydráza 29 kDa, trypsinogen 24 kDa, inhibitor trypsinu 20 kDa, α -laktalbumin 14,2 kDa a aprotinin 6,5 kDa. Závislost

logaritmu molekulové hmotnosti standardních proteinů na jejich relativní mobilitě (tj. poměr vzdálenosti stopy daného proteinu od startu a délky celého gelu) sloužila jako kalibrační křivka, podle které byla určena molekulová hmotnost neznámého proteinu.

3.2.7.2. METODA „WESTERN BLOT“

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

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

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

Gel byl po skončení SDS elektroforézy 20 minut inkubován v přenosovém pufru (0,025 M Tris, 0,192 M glycin, pH 8,3). Dále byl sestaven elektropřenosový aparát „semi dry“ („Fast-blot“ B-32, firma Biometra) a „sandwich“, který tvořily tři kusy chromatografického papíru Whatman 3 (o stejné velikosti jakou měl gel) namočené v přenosovém pufru, membrána, gel a další tři kusy navlhčeného chromatografického papíru. Elektropřenos se prováděl nejprve 10 minut při 0,8 mA/cm² gelu, poté 45 minut při 2,0 mA/cm² gelu.

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

3.2.7.3. IMUNOCHEMICKÁ DETEKCE FOREM CYTOCHROMU P450

Složení roztoků a pufrů:

- PBS (1,8 mM Na₂HPO₄ + 1 mM NaH₂PO₄ + 0,134 M NaCl; pH 7,2) s 0,3% Tritonem X-100 (w/v)
- 5% nízkotučné sušené mléko (w/v) – rozpuštěné v PBS s Tritonem X-100
- primární protilátka (15 µg/ml)

- polyklonální slepičí protilátka proti potkanímu rekombinantnímu CYP1A1
- polyklonální slepičí protilátka proti králičímu CYP2B4
- polyklonální slepičí protilátka proti králičímu CYP2E1
- polyklonální slepičí protilátka proti lidskému rekombinantnímu CYP3A4
- sekundární protilátka značená alkalickou fosfatázou (7 $\mu\text{g}/10\text{ ml}$) – králičí IgG proti slepičí IgY s navázanou alkalickou fosfatázou

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

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

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

3.2.8. STANOVENÍ AKTIVITY CYP1A1/2 *O*-DEALKYLACÍ 7-ETHOXYRESORUFINU

Určení aktivity těchto izoform se provádělo fluorimetrickým stanovením *O*-dealkylace 7-ethoxyresorufinu (EROD).

Reakční směs o celkovém objemu 0,5 ml byla zpracována podle Burkeho a kol.¹²⁸ a obsahovala mikrosomální frakci (0,1 μM CYP), NADPH generující systém (10 mM), 7-ethoxyresorufin (0,175 mM) a fosfátový pufr (0,1 M K_2HPO_4 , pH 7,4). Jedno objemové procento reakční směsi tvořil methanol, ve kterém byl rozpouštěn 7-ethoxyresorufin. Pro sestavení kalibrační křivky se použilo stejné složení reakční

směsi, ale místo 7-ethoxyresorufinu bylo pipetováno 20, 40, 80 a 120 pmol 10 μ M resorufinu.

K mikrosomům naředěných pufrem bylo přidáno 5 μ l roztoku 7-ethoxyresorufinu v methanolu. Reakce byla startována přidáním 50 μ l NADPH generujícího systému, inkubace probíhala 10 minut při 37 °C a reakce byla zastavena přidáním 2 ml methanolu. Vzorky byly centrifugovány 5 min při 4000 RPM (centrifuga T 52.2) a poté se změřila fluorescence na luminiscenčním spektrometru LS-5B Perkins-Elmer ($\lambda_{excitace}=530$ nm, excitační štěrba 15, $\lambda_{emise}=585$ nm, emisní štěrba 10). Přístroj byl vynulován na „blank“, který obsahoval všechny složky reakční směsi kromě NADPH. Z kalibrační křivky se vypočítalo množství resorufinu (pmol) vytvořeného ve vzorcích.

3.2.9. STANOVENÍ AKTIVITY CYP1A1 OXIDACÍ SUDANU I

Složení inkubační směsi - roztoky:

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

Postup: Reakce probíhala v celkovém objemu reakční směsi 0,25 ml. Do zkumavky byl pipetován pufr, různé množství ředěných mikrosomů, aby koncentrace proteinu ve směsi byla 1 mg/ml, 25 μ l NADPH generujícího systému a 5 μ l roztoku Sudanu I. Tato směs byla důkladně promíchána a inkubována za přítomnosti vzduchu 60 min při teplotě 37°C. Inkubace se ukončila zastavením přidáním ethylacetátu (0,5 ml). Po protřepání a centrifugaci (5 minut, 4000 RPM centrifuga T 52.2) byla odsáta vrstva s ethylacetátem a použita dále. K vodné fázi bylo opět přidáno 0,5 ml ethylacetátu a celý postup zopakován. Následovalo odpaření extraktů do sucha na vakuové odparce „Speed Vac“ (DNA 110, firma Savant). Těsně před analýzou byly odparky rozpuštěny v 30 μ l mobilní fáze HPLC (90% methanol; 0,1 M NH_4HCO_3 ; pH 8,0). Majoritní metabolity byly detekovány a kvantifikovány pomocí HPLC dle¹³⁰.

PODMÍNKY DETEKCE A KVANTIFIKACE METABOLITŮ HPLC

- mobilní fáze 90% methanol; 0,1 M NH_4HCO_3 ; pH 8,0
- průtok 0,8 ml/min
- kolona Macherey - Nagel
- nástřik 20 μl
- teplota 37°C
- detekce při vlnové délce 480 nm

3.2.10. STUDIE PŘEMĚNY 3-NBA CYTOSOLÁRNÍMI ENZYMY

3.2.10.1. INKUBACE 3-NBA S JATERNÍM CYTOSOLEM POTKANŮ PREMEDIKOVANÝCH SUDANEM I

Složení inkubační směsi - roztoky

- pufr 50 mM TRIS/HCl + 0,4% Tween 20, pH 7,4
- 10 mM NADH
- 1 mM fenacetin
- 2 mM 3-NBA rozpuštěný v DMSO

Do inkubační směsi o objemu 0,5 ml jsme pipetovali pufr, 50 μl 10 mM NADH a různé množství jaterního cytosolu potkanů premedikovaných Sudanem I (μl) tak, aby výsledná koncentrace proteinu v inkubační směsi byla 2 mg/ml. Směs jsme probublávali 1 minutu dusíkem pro odstranění kyslíku. Po 15 minutách inkubace směsi při 37°C jsme reakci startovali přidáním 5 μl 2 mM 3-NBA a nechali inkubovat 60 minut za třepání při teplotě 37°C.

Reakci jsme ukončili přidáním 1 ml ethylacetátu a extrahovali produkty reakce do tohoto organického rozpouštědla. Po ukončení reakce jsme ke směsi přidali 5 μl 1 mM fenacetinu jako vnitřní standard. Po odsátí ethylacetátu s produkty reakce jsme k vodné fázi přidali znovu 1 ml ethylacetátu a stejným postupem provedli druhou extrakci.

Následovalo odpaření extraktů do sucha na vakuové odparce „Speed Vac“ (DNA 110, firma Savant). Těsně před analýzou byly odparky rozpuštěny ve 30 μ l methanolu. Majoritní metabolity byly detekovány a kvantifikovány HPLC.

V případě zjišťování závislosti přeměny 3-NBA na koncentraci proteinu (enzymu) obsahovala inkubační směs protein o koncentraci 0, 0,25, 0,5, 1, 2 a 4 mg/ml. V případě zjišťování vlivu doby inkubace na přeměnu 3-NBA jsme směs inkubovali 0, 15, 30, 45, 60, 90 a 120 minut.

Při zjišťování enzymů, které redukují 3-NBA, jsme použili koenzymy cytosolárních reductáz xanthinoxidázy a DT-diaforázy (NQO1). 3-NBA jsme inkubovali s cytosolem jater potkanů premedikovaných Sudanem I za přítomnosti koenzymů hypoxanthinu, NADH, NADPH a bez koenzymu. Použili jsme roztoky koenzymů o koncentraci 10 mM.

PODMÍNKY DETEKCE A KVANTIFIKACE METABOLITŮ HPLC

- mobilní fáze 70 % methanol
- průtok 0,6 ml/min
- kolona Macherey - Nagel
- nástřik 20 μ l
- teplota 37°C
- detekce při vlnové délce 254 nm

3.2.10.2. INKUBACE 3-NBA S LIDSKOU REKOMBINANTNÍ DT-DIAFORÁZOU (NQO1)

Složení inkubační směsi - roztoky

- pufr 50 mM TRIS/HCl + 0,4% Tween 20, pH 7,4
- 5 mM NADPH
- 1 mM fenacetin
- 2 mM 3-NBA rozpuštěný v DMSO

Do inkubační směsi o objemu 0,5 ml jsme pipetovali pufr, 50 μ l 5 mM NADPH a různé množství zásobního roztoku DT-diaforázy (2,64 mg/ml). Směs jsme probublávali 1 minutu dusíkem pro odstranění kyslíku. Po 15 minutách inkubace směsi při 37°C jsme reakci startovali přidáním 5 μ l 2 mM 3-NBA a nechali inkubovat 60 minut za třepání při teplotě 37°C.

Reakci jsme ukončili přidáním 1 ml ethylacetátu a extrahovali produkty reakce do tohoto organického rozpouštědla. Po ukončení reakce jsme ke směsi přidali 5 μ l 1 mM fenacetinu jako vnitřní standard. Po odsátí ethylacetátu s produkty reakce jsme k vodné fázi přidali znovu 1 ml ethylacetátu a provedli druhou extrakci.

Následovalo odpaření extraktů do sucha na vakuové odparce „Speed Vac“ (DNA 110, firma Savant). Těsně před analýzou byly odparky rozpuštěny ve 30 μ l methanolu. Majoritní metabolity byly detekovány a kvantifikovány HPLC.

V případě zjišťování závislosti přeměny 3-NBA na koncentraci proteinu (enzymu) obsahovala inkubační směs DT-diaforázu o koncentraci 5,28, 13,2, 26,4, 52,8 a 105,6 μ g/ml. V případě zjišťování vlivu doby inkubace na přeměnu 3-NBA jsme směs inkubovali 60, 90 a 120 minut. Pro zjištění vlivu koncentrace 3-NBA na jeho přeměnu DT-diaforázou o koncentraci 26,4 μ g/ml jsme použili roztoky 3-NBA, jejichž koncentrace v inkubační směsi byla 4, 5, 10 a 20 μ M.

PODMÍNKY DETEKCE A KVANTIFIKACE METABOLITŮ HPLC

- mobilní fáze 70 % methanol
- průtok 0,6 ml/min
- kolona Macherey - Nagel
- nástřik 20 μ l
- teplota 37°C
- detekce při vlnové délce 254 nm

4. VÝSLEDKY

4.1. METABOLISMUS 3-NBA CYTOSOLÁRNÍMI ENZYMY

Vzhledem k tomu, že je známa participace cytosolárních enzymů na biotransformaci řady aromatických nitrosloúčenin^{117,132}, byla v diplomové práci sledována jejich efektivita i v přeměně studovaného polutantu, 3-NBA. Zjistili jsme, že 3-NBA je cytosolárními enzymy přeměňován za tvorby dvou až čtyř metabolitů. Ty byly separovány pomocí HPLC a detekovány při vlnové délce 254 nm. Jako majoritní metabolit byl nalezen 3-ABA, tedy sloučenina tvořená redukcí nitrosloúčeniny 3-NBA. Dále byly detekovány další dva píky separované HPLC, tedy dva „potenciální“ metabolity.

V experimentech byla použita cytosolární frakce izolovaná z jater laboratorních potkanů premedikovaných Sudanem I (1-fenylazo-2-hydroxynaftolem). O něm je známo, že efektivně indukuje cytosolární reduktázy, které participují na přeměně nitroaromátů⁸².

4.1.1. METABOLISMUS 3-NBA CYTOSOLÁRNÍMI ENZYMY JATER POTKANA

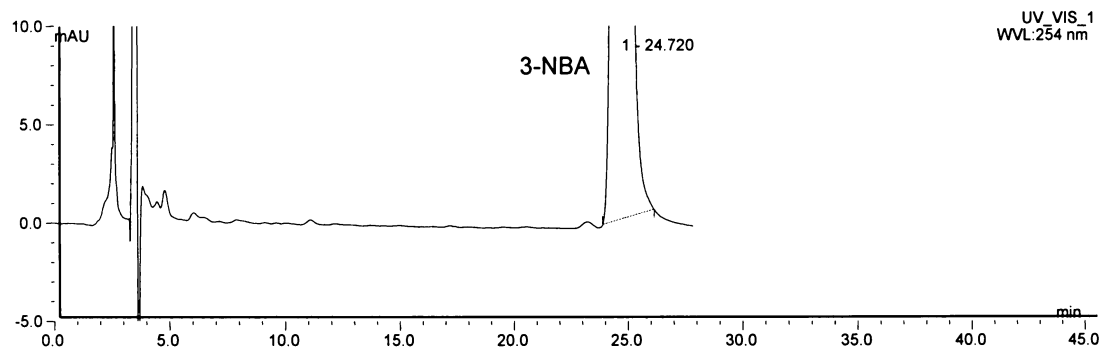
Pro zjištění optimálních podmínek separace 3-NBA od jeho metabolitů bylo separátně analyzováno chování 3-NBA a jeho redukčního partnera, 3-ABA, při HPLC.

3-NBA je použitým systémem eluován při HPLC v retenčním čase 24,7 minut. Výsledek analýzy HPLC je uveden na **obrázku 5**.

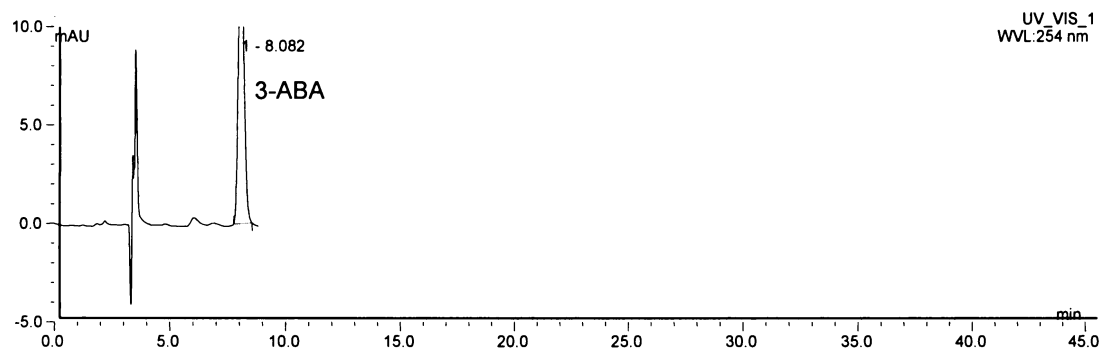
Retenční čas, kterým je při HPLC eluován 3-ABA, je 8. minuta. Výsledek analýzy HPLC je uveden na **obrázku 6**. Retenční časy dvou dalších „potenciálních“ metabolitů 3-NBA byly 11,7 a 33 minut.

Inkubací 3-NBA s cytosolem izolovaným z jater potkanů premedikovaných Sudanem I je 3-NBA redukován na 3-ABA (**Obr.7**). Vzhledem k tomu, že k redukcii

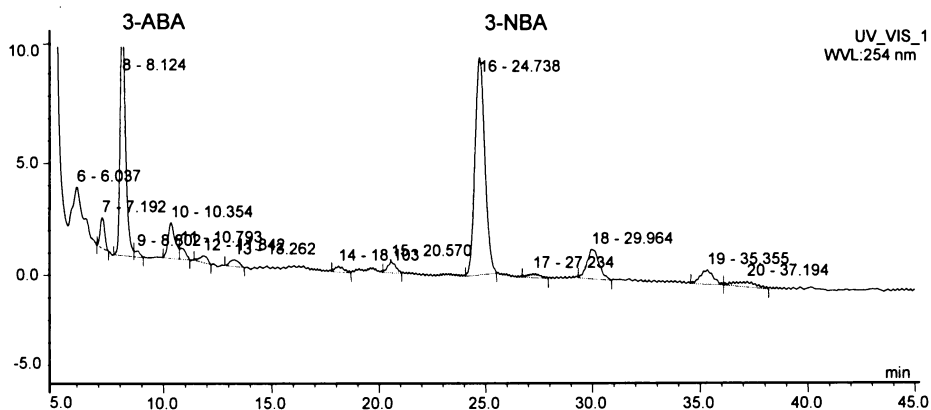
dochází i bez přidavku koenzymů cytosolárních reduktáz, musí být vedle těchto enzymů v cytosolu přítomny i jejich koenzymy.



Obr. 5 HPLC 3-NBA. Experimentální podmínky: mobilní fáze 70% methanol, průtok 0,6 ml/min, kolona Macherey Nagel RP18, teplota 37°C, nástřik 20 μ l vzorku



Obr. 6 HPLC 3-ABA. Experimentální podmínky: mobilní fáze 70% methanol, průtok 0,6 ml/min, kolona Macherey Nagel RP18, teplota 37°C, nástřik 20 μ l vzorku

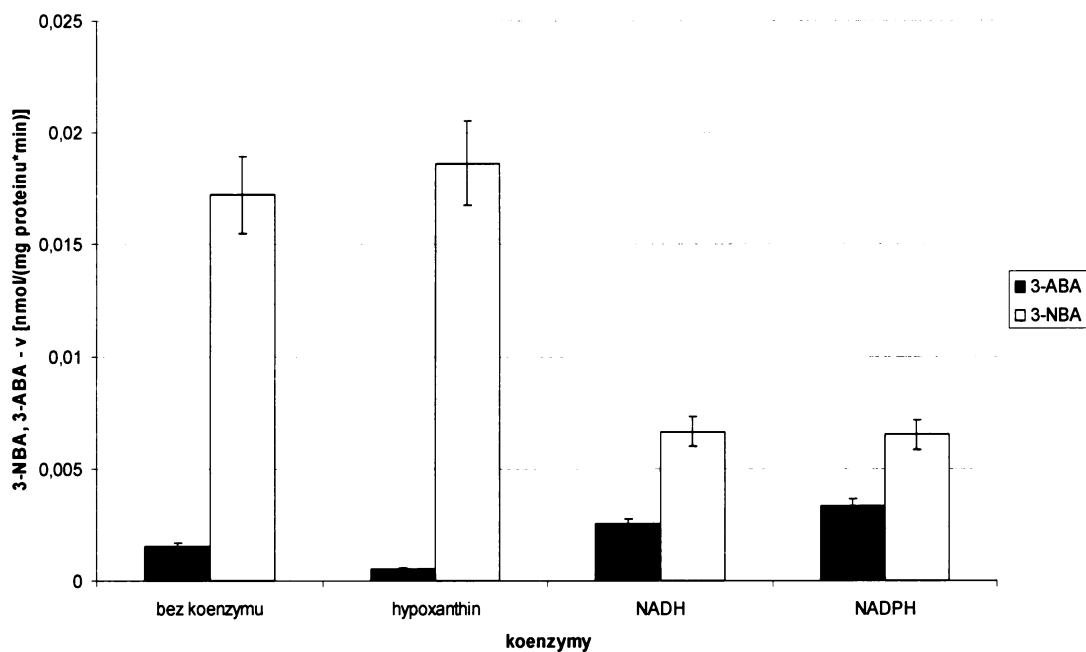


Obr. 7 HPLC směsi získané inkubací 3-NBA s jaterním cytosolem potkanů premedikovaných Sudanem I bez přidavku koenzymů reduktáz

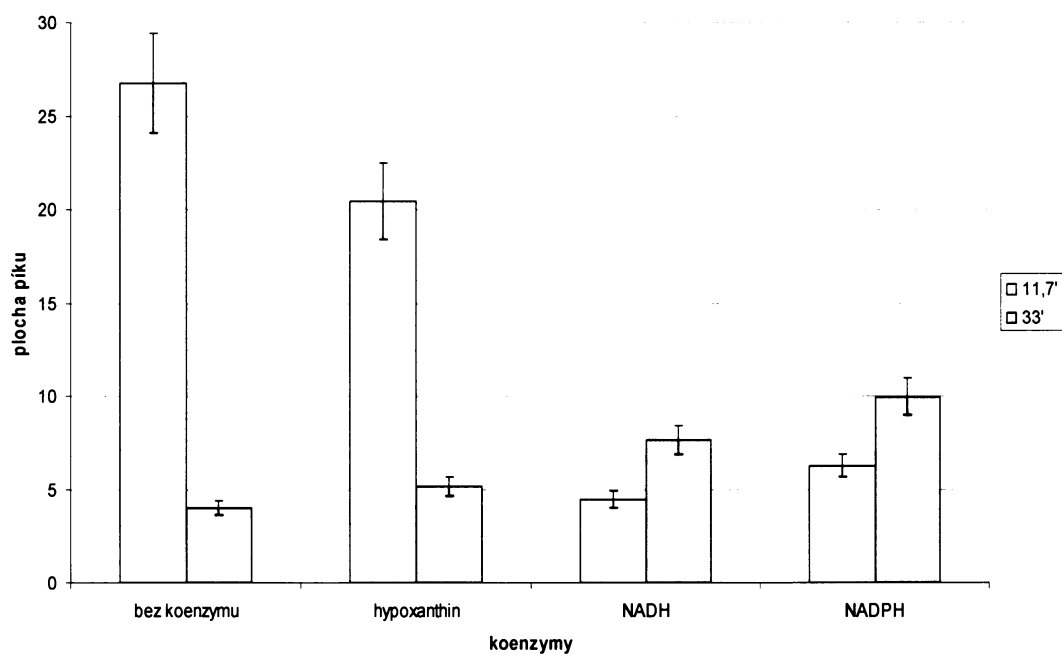
4.1.2. VLIV KOENZYMŮ XANTHINOXIDÁZY A DT-DIAFORÁZY NA METABOLISMUS 3-NBA JATERNÍM CYTOSOLEM POTKANŮ PREMEDIKOVANÝCH SUDANEM I

Pro zjištění enzymů, které redukují 3-NBA, jsme použili koenzymy cytosolárních reduktáz xanthinoxidázy a DT-diaforázy (NQO1). 3-NBA jsme inkubovali s cytosolem jater potkanů premedikovaných Sudanem I za přítomnosti koenzymů hypoxanthinu, NADH, NADPH a bez koenzymu. Výsledky po analýze HPLC ukazují **obrázky 8 a 9**.

Nejúčinnější jsou v přeměně 3-NBA na jednotlivé metabolity koenzymy NADH a NADPH (**Obr. 8 a 9**). To je patrné nejen ze spotřeby 3-NBA, ale i z produkce 3-ABA (**Obr. 8**). Množství dvou dalších „potenciálních“ metabolitů 3-NBA (s retenčním časem 11,7 a 33 minut) je přítomností různých koenzymů rovněž ovlivněno (**Obr. 9**). Na metabolismu 3-NBA tedy pravděpodobně nejvíce participuje enzym NQO1, jehož koenzymy jsou právě NADH a NADPH. Enzym xanthinoxidáza, jejímž koenzymem je hypoxanthin, se na přeměně 3-NBA prakticky nepodílí.



Obr. 8 Vliv koenzymů xanthinoxidázy a NQO1 na metabolismus 3-NBA jaterním cytosolem potkanů premedikovaných Sudanem I – obrázek udává rychlost přeměny 3-NBA a vzniku 3-ABA



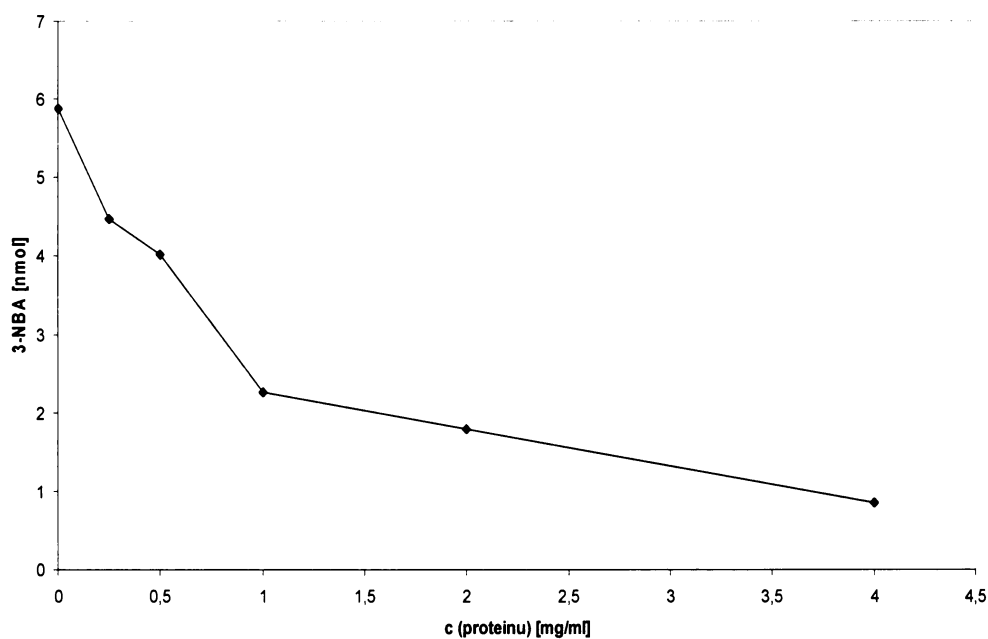
Obr. 9 Vliv koenzymů xanthinoxidázy a NQO1 na metabolismus 3-NBA jaterním cytosolem potkanů premedikovaných Sudanem I – obrázek udává plochy píků dvou produktů s neznámou strukturou

4.1.3. PŘEMĚNA 3-NBA CYTOSOLÁRNÍMI ENZYMY V ZÁVISLOSTI NA JEJICH KONCENTRACI

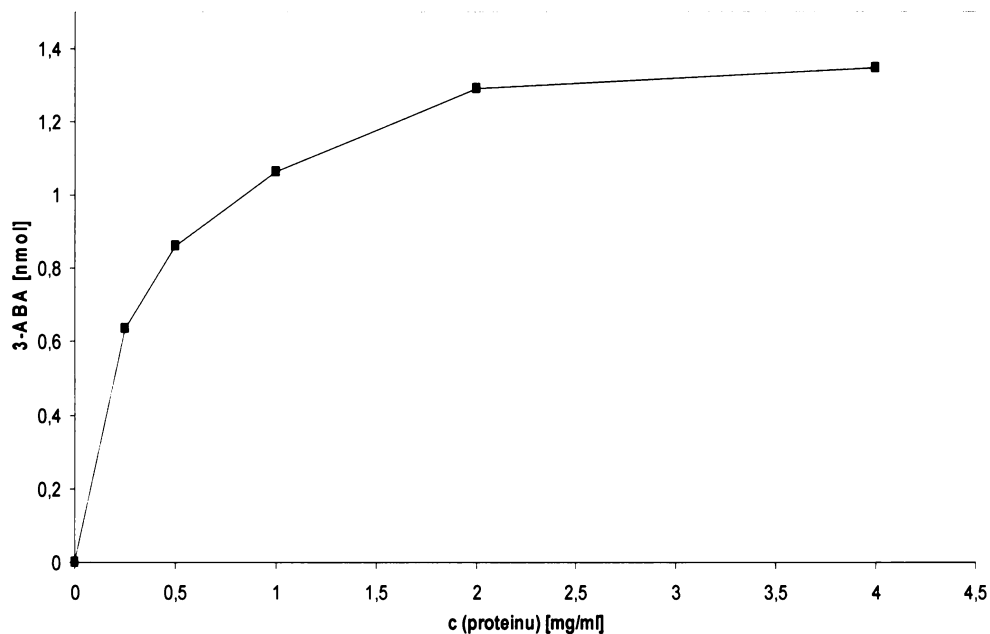
Pro zjištění optimální koncentrace cytosolárních enzymů v inkubační směsi jsme inkubovali 3-NBA s rozdílnými koncentracemi proteinu cytosolu jater potkanů premedikovaných Sudanem I. Výsledky po analýze HPLC jsou uvedeny na **obrázcích 10 a 11**.

Sledováno bylo jak množství metabolisovaného 3-NBA (**Obr. 10**), tak množství tvořeného redukčního metabolitu, 3-ABA (**Obr. 11**).

Se vzrůstající koncentrací cytosolárních proteinů (enzymů) dochází ke zvýšení redukce 3-NBA na 3-ABA. Saturační koncentrace cytosolárních proteinů pro tvorbu 3-ABA je koncentrace nad 2 mg proteinu na ml směsi.



Obr. 10 Přeměna 3-NBA cytosolárními enzymy v závislosti na koncentraci cytosolárních proteinů



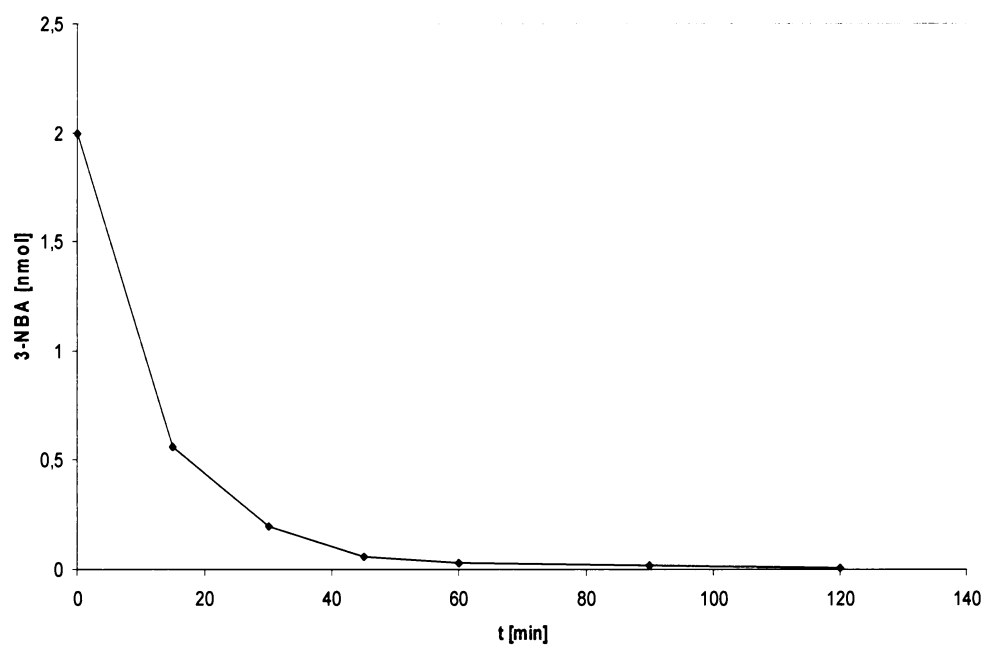
Obr. 11 Vznik metabolitu 3-ABA redukční přeměnou 3-NBA cytosolárními enzymy o různé koncentraci

4.1.4. PŘEMĚNA 3-NBA CYTOSOLÁRNÍMI ENZYMŮ V ZÁVISLOSTI NA DOBĚ INKUBACE

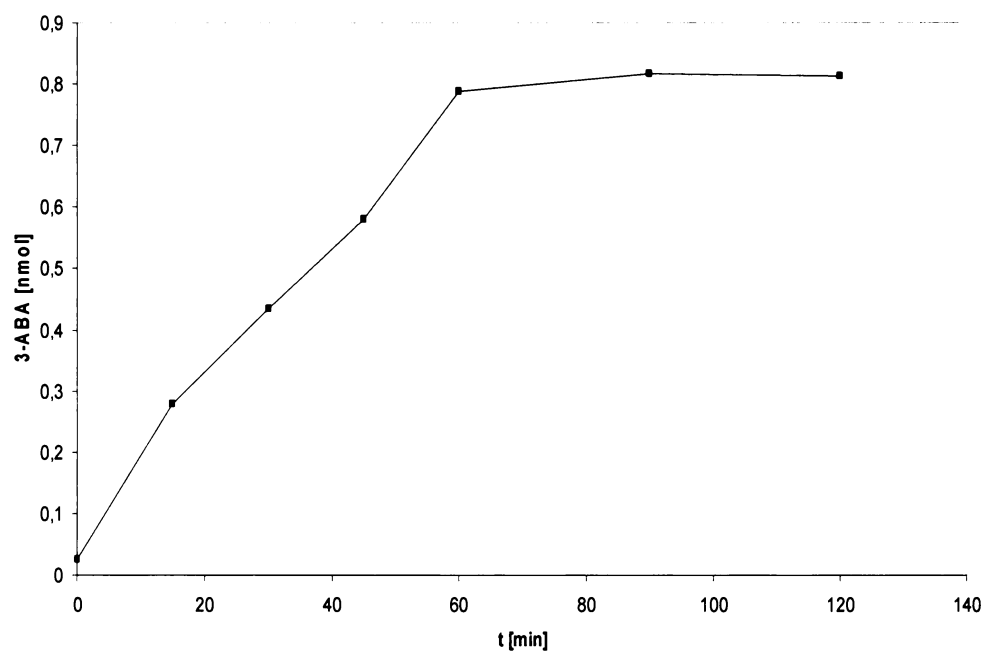
Pro zjištění optimální doby inkubace pro metabolickou přeměnu 3-NBA na jednotlivé metabolity jsme inkubovali jaterní cytosol potkanů premedikovaných Sudanem I s 3-NBA po dobu 0, 15, 30, 45, 60, 90 a 120 minut. Výsledky analýz HPLC jsou uvedeny na **obrázcích 12 a 13**.

Sledována byla opět přeměna 3-NBA (**Obr. 12**) a zároveň množství tvořeného 3-ABA (**Obr. 13**).

Při 60 minutové inkubaci je množství residuálního 3-NBA v inkubační směsi téměř nulové a množství vzniklého metabolitu 3-ABA již dále výrazně nestoupá.



Obr. 12 Přeměna 3-NBA cytosolárními enzymy v závislosti na době inkubace



Obr. 13 Tvorba 3-ABA redukční přeměnou 3-NBA cytosolárními enzymy při různé době inkubace

4.2. REDUKCE 3-NBA LIDSKOU REKOMBINANTNÍ DT-DIAFORÁZOU (NQO1)

Vzhledem k výsledkům získaným při sledování redukce 3-NBA cytosolárním systémem, které signalizují majoritní participaci NQO1 na této reakci, studovali jsme redukci 3-NBA také samotnou NQO1.

Pro tyto studie jsme použili lidskou rekombinantní DT-diaforázou (NQO1). Cílem této části práce bylo potvrdit výsledky získané z experimentů s cytosolárním systémem a charakterizovat efektivitu DT-diaforázy v redukci 3-NBA.

4.2.1. ZÁVISLOST PŘEMĚNY 3-NBA NA KONCENTRACI DT-DIAFORÁZY (NQO1)

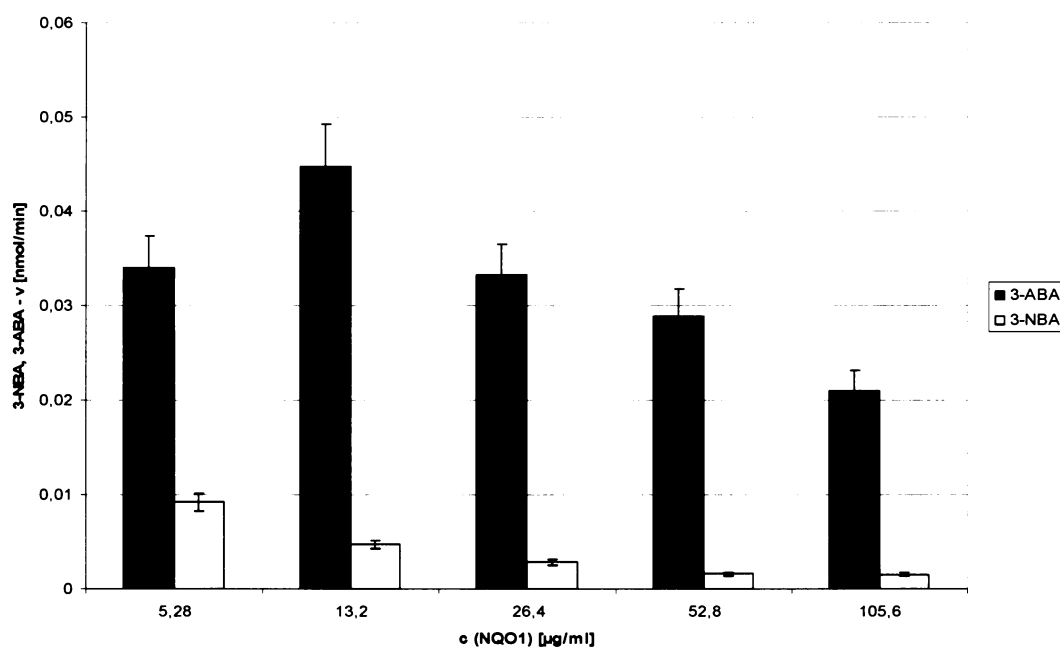
Pro zjištění závislosti přeměny 3-NBA v inkubační směsi za přítomnosti DT-diaforázy o různé koncentraci jsme inkubovali 3-NBA s 1, 2,5, 5, 10 a 20 μ l zásobního roztoku DT-diaforázy o koncentraci 2,64 mg/ml. Výsledky získané analýzou HPLC jsou uvedeny na **obrázcích 14 a 15**.

Se vzrůstající koncentrací NQO1 v inkubačním médiu dochází i ke zvýšené redukci 3-NBA (**Obr. 14**). Zajímavý výsledek byl však získán při sledování množství tvořeného 3-ABA. Nárůst jeho produkce byl pozorován pouze do koncentrace NQO1 13,2 μ g/ml. S dalším zvýšením koncentrace NQO1 k nárůstu jeho množství v reakční směsi již nedocházelo.

Interpretace těchto výsledků je v současnosti poněkud obtížná. Z dřívějších studií je možné předpokládat, že intermediátem vzniklým při redukci 3-NBA je N-OH-3-ABA. Tento předpoklad byl vysloven a též potvrzen již v dřívějších studiích prováděných v laboratoři, kde byla předkládaná diplomová práce vypracována. Zjištěno totiž bylo, že 3-NBA je redukčně aktivován za tvorby aduktů s DNA, které jsou shodné s adukty tvořenými N-OH-3-ABA¹¹⁶.

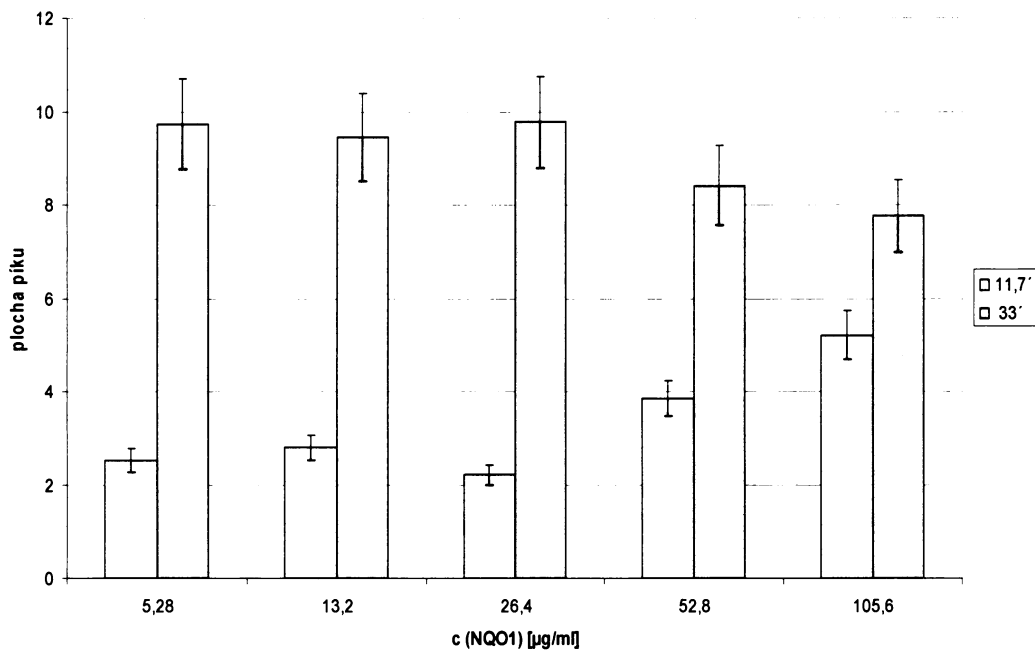
V případě našich experimentů tedy lze předpokládat, že tento intermediát tvoří elektrofilní produkt, který se může vázat na nukleofilní centra proteinu NQO1.

Je-li v inkubační směsi přítomno větší množství NQO1, je i větší množství reaktivního intermediátu vázáno na její molekulu, aniž by docházelo k jeho redukci na 3-ABA.



Obr. 14 Závislost přeměny 3-NBA na koncentraci NQO1 – obrázek udává množství produkovaného metabolitu, 3-ABA, a nepřeměněného 3-NBA za minutu

Obrázek 15 udává změny v množství dvou neznámých metabolitů 3-NBA. Hladina metabolitu eluovaného při 33 minutách klesá až při použití nejvyšších koncentrací NQO1. Množství metabolitu eluovaného retenčním časem 11,7 minut se vzrůstající koncentrací enzymu stoupá. Ačkoliv nemůžeme ani odhadovat o jaké sloučeniny se jedná, je evidentní, že „vycházejí“ z 3-NBA a jejich množství se mění v závislosti na přítomnosti enzymu NQO1 tuto sloučeninu metabolizujícím (redukujícím).

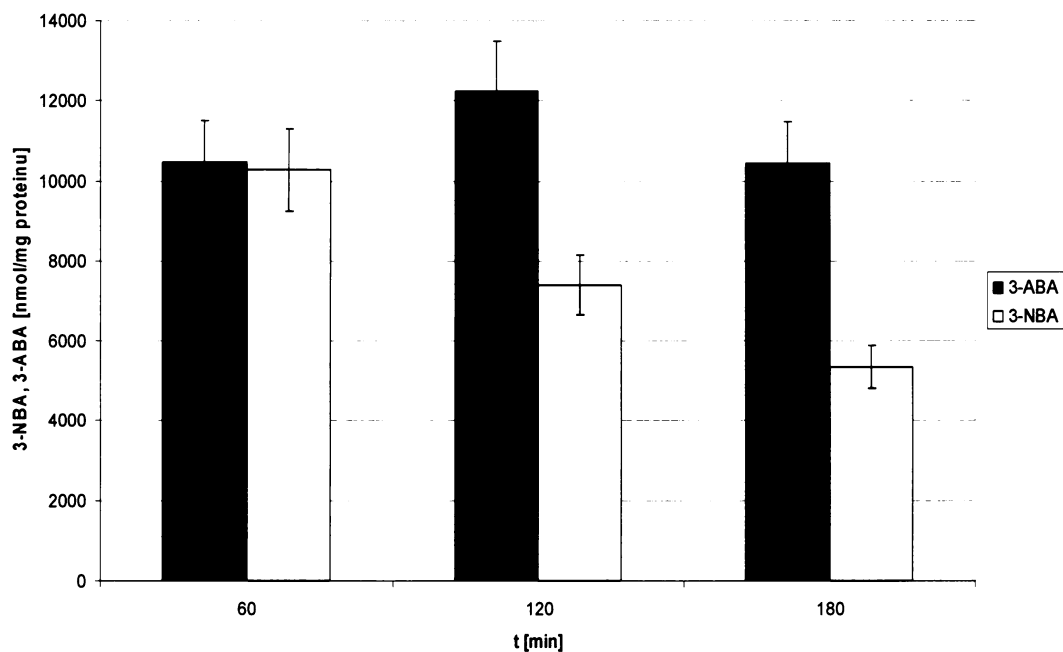


Obr. 15 Závislost přeměny 3-NBA na koncentraci NQO1 – obrázek udává plochy píků dvou produktů s neznámou strukturou

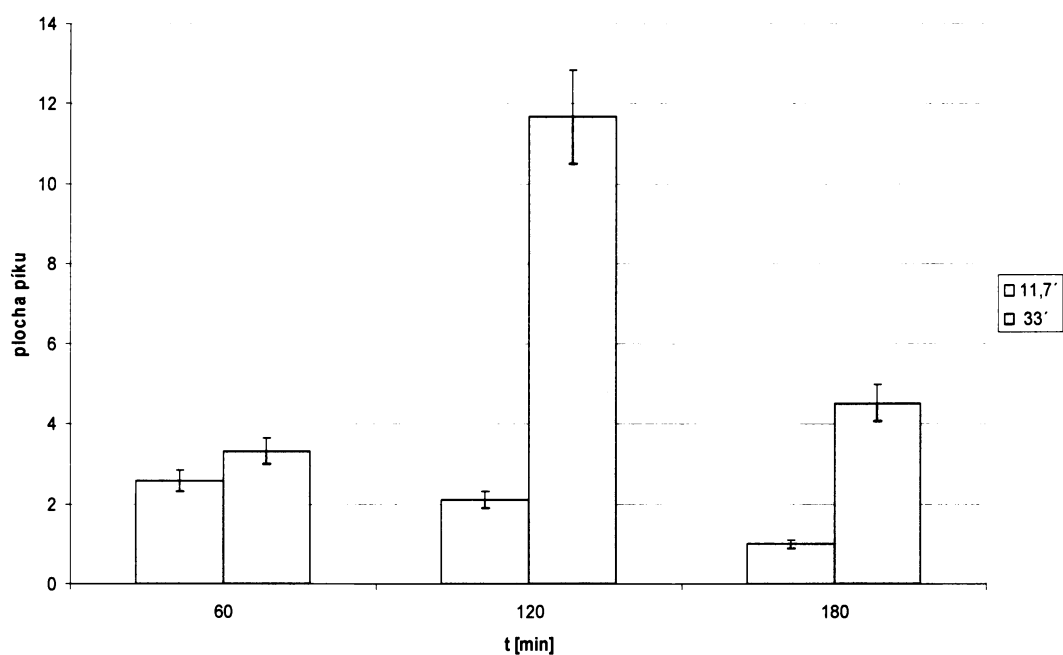
4.2.2. ZÁVISLOST PŘEMĚNY 3-NBA NA DOBĚ INKUBACE S DT-DIAFORÁZOU (NQO1)

Pro zjištění vlivu doby inkubace 3-NBA DT-diaforázou na jeho přeměnu jsme 3-NBA inkubovali s DT-diaforázou po dobu 60, 120 a 180 minut. Výsledky analýz pomocí HPLC jsou uvedeny na **obrázcích 16 a 17**.

Se zvyšující se dobou inkubace NQO1 s 3-NBA dochází k úbytku 3-NBA v inkubační směsi a k nárůstu produkce 3-ABA až do inkubace trvající 120 minut (**Obr. 16 a 17**). Při delší době inkubace dochází k poklesu tvorby 3-ABA, pravděpodobně snížením aktivity DT-diaforázy. DT-diaforáza může být degradována vzhledem k podmínkám inkubace (třepání za teploty 37°C) a nebo částečně inhibován dalšími vznikajícími metabolity, jejichž struktura a ani případné inhibiční vlastnosti nebyly dosud identifikovány (např. metabolity eluované v retenčním čase 11,7 a 33 minut).



Obr. 16 Závislost přeměny 3-NBA na době inkubace s NQO1 – obrázek udává množství produkovaného metabolitu, 3-ABA, a nepřeměněného 3-NBA



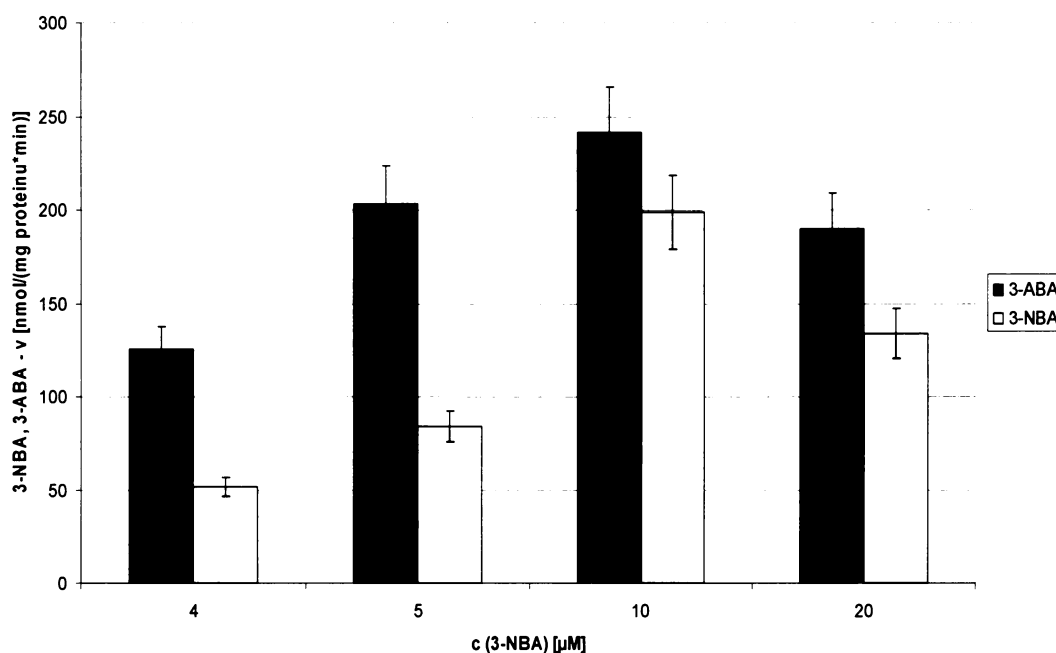
Obr. 17 Závislost přeměny 3-NBA na době inkubace s NQO1 – obrázek udává plochy píků dvou produktů s neznámou strukturou

4.2.3. ZÁVISLOST PŘEMĚNY 3-NBA DT-DIAFORÁZOU (NQO1) NA JEHO KONCENTRACI

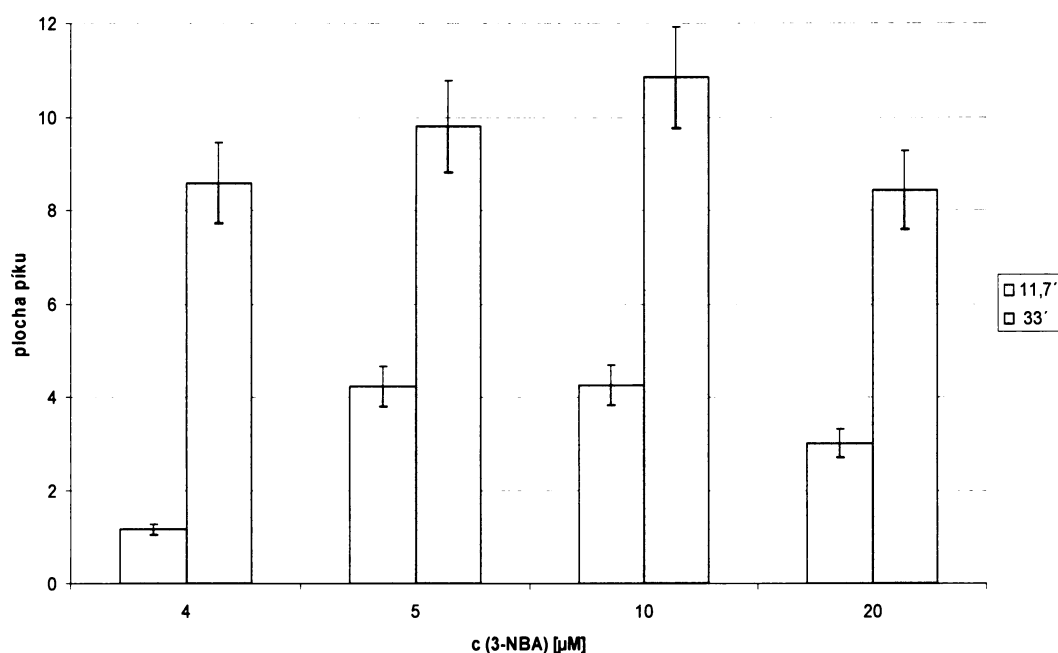
Pro zjištění vlivu koncentrace 3-NBA na jeho metabolickou přeměnu jsme inkubovali 4, 5, 10 a 20 μM 3-NBA s DT-diaforázou. Výsledky analýz pomocí HPLC jsou uvedeny na **obrázcích 18 a 19**.

Se zvyšující se koncentrací 3-NBA v inkubační směsi dochází ke zvýšení množství vzniklého metabolitu 3-ABA až do 10 μM koncentrace 3-NBA. Při nejvyšší použité koncentraci 3-NBA však dochází jak k poklesu množství nepřeměněného 3-NBA tak i vzniklého 3-ABA. Ke snížení redukční přeměny 3-NBA na 3-ABA zřejmě dochází v důsledku saturace DT-diaforázy 3-NBA. Pokles množství reziduálního 3-NBA při použití jeho nejvyšší koncentrace může být navíc způsoben sorpcí na ostatní složky inkubační směsi (protein NQO1) včetně např. povrchu mikrozkmavek, ve kterých byly inkubace prováděny (hydrofobní sorpce 3-NBA) (**Obr. 18 a 19**).

Optimální koncentrace 3-NBA v inkubační směsi, při které dojde k jeho největší přeměně na metabolit 3-ABA je 10 μM (**Obr. 18**). Obdobné závislosti byly pozorovány i pro tvorbu dalších dvou neznámých metabolitů 3-NBA (**Obr. 19**).



Obr. 18 Závislost přeměny 3-NBA NQO1 v závislosti na jeho koncentraci – obrázek udává rychlost přeměny 3-NBA a vzniku 3-ABA



Obr. 19 Závislost přeměny 3-NBA NQO1 v závislosti na jeho koncentraci – obrázek udává plochy píků dvou produktů s neznámou strukturou

4.3. VLIV 3-NBA NA BIOTRANSFORMAČNÍ ENZYMY LABORATORNÍHO POTKANA

V této části diplomové práce jsem navázala na práci kolegyně Lucie Kutnerové¹³¹ a pokračovala v hledání odpovědi na otázku, zda-li a jakým způsobem jsou 3-nitrobenzanthronem ovlivňovány enzymy biotransformující xenobiotika. Tedy enzymy, které mohou participovat na jeho vlastním metabolismu.

Laboratorní potkani kmene Wistar byli premedikováni roztokem 3-nitrobenzanthronu o různé koncentraci. Jmenovitě 0,4, 4 a 40 mg/kg zvířete.

Všechny premedikace probíhaly podle postupu uvedeného v kap. 3.2.1. Z vybraných orgánů testovaných zvířat jsme frakční centrifugací izolovali mikrosomální a cytosolární frakce (viz kap. 3.2.2) a charakterizovali je z hlediska obsahu a aktivit vybraných enzymů participujících na oxidačním a redukčním metabolismu xenobiotik.

4.3.1. VLIV PREMEDIKACE LABORATORNÍCH POTKANŮ 3-NBA NA OBSAH CYTOCHROMU P450 V MIKROSOMECH IZOLOVANÝCH Z TKÁNĚ JATER, SLEZINY A SRDCE

V mikrosomálních frakcích izolovaných z jater, sleziny a srdce experimentálních zvířat jsme sledovali specifický obsah cytochromu P450, tedy enzymu, který je lokalizován v membránách endoplazmatického retikula. Výsledky jsou uvedeny v **tabulce 4**.

Působením 3-nitrobenzanthronu došlo ke snížení obsahu cytochromu P450 v jaterních mikrosomech, v případě mikrosomů sleziny a srdce nebyl vliv 3-nitrobenzanthronu na obsah cytochromu P450 detailně vyhodnocován vzhledem k jeho nízké hladině v těchto tkáních.

Vliv 3-nitrobenzanthronu na obsah cytochromu P450 je uveden v **tabulce 4** a na **obrázku 20**.

Tab. 4 Vliv premedikace potkanů 3-NBA na obsah cytochromu P450 v jaterních mikrosomálních vzorcích; hodnoty v tabulce vyjadřují průměry a standardní odchylky ze tří stanovení

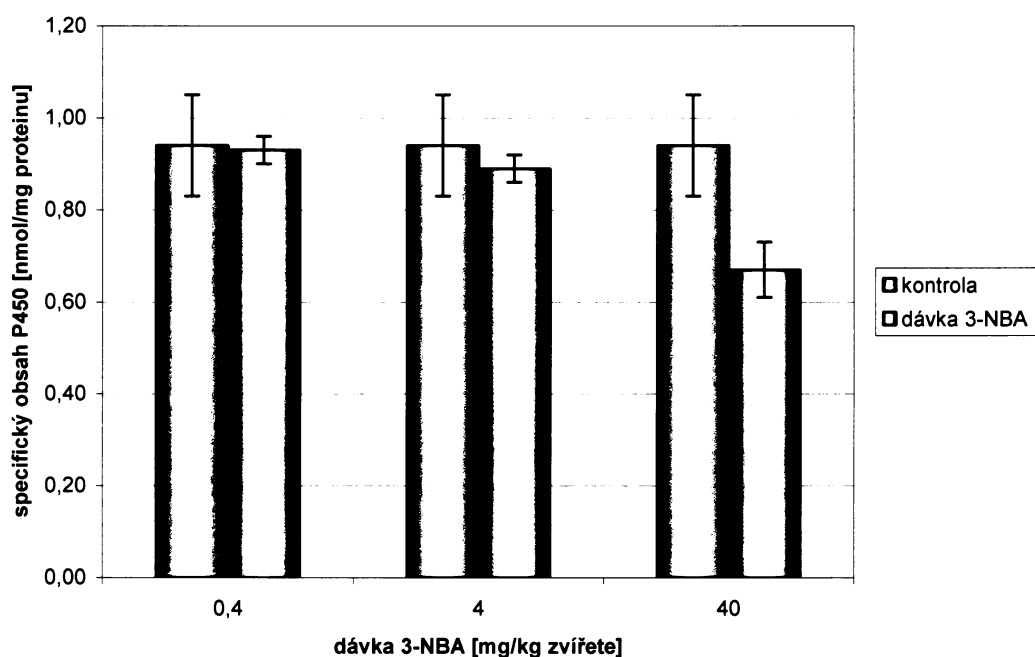
druh mikrosomální frakce	dávka 3-NBA [mg/kg zvířete]	obsah P450 [uM]	specifický obsah P450 [nmol/mg proteinu]	celkový obsah P450 [nmol]	obsah P450 [nmol/g orgánu]
játra	Kontrola	21,41 ± 1,02	0,94 ± 0,11	342,56 ± 16,32	5,03 ± 0,24
	0,4	40,12 ± 4,26	0,93 ± 0,03	60,18 ± 6,39	2,08 ± 0,03
	4	29,96 ± 2,78	0,89 ± 0,03	44,94 ± 4,17	1,86 ± 0,17
	40	13,83 ± 0,91	0,67 ± 0,06	20,75 ± 1,36	1,03 ± 0,07

Kontrola - frakce izolovaná z nepremedikovaných zvířat

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

4 - mikrosomální frakce izolovaná ze zvířat premedikovaných roztokem 3-NBA o koncentraci 4 mg/kg zvířete

40 - mikrosomální frakce izolovaná ze zvířat premedikovaných roztokem 3-NBA o koncentraci 40 mg/kg zvířete



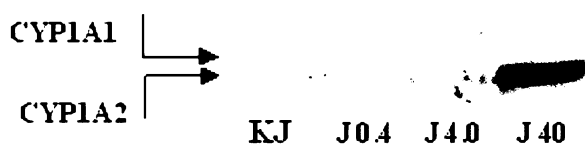
Obr. 20 Vliv premedikace potkanů 3-NBA na specifický obsah cytochromu P450 v jaterní tkáni

Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k tabulce 4

4.3.2. VLIV PREMEDIKACE LABORATORNÍCH POTKANŮ 3-NBA NA EXPRESI PROTEINŮ CYTOCHROMŮ P450 V MIKROSOMECH IZOLOVANÝCH Z TKÁNĚ JATER, SLEZINY A SRDCE

Kromě vlivu premedikace potkanů výše uvedenou látkou na specifický obsah celkového cytochromu P450, tedy všech zastoupených izoform enzymu, jsme také studovali její vliv na expresi proteinů jeho jednotlivých izoform. K tomu jsme užili metodu „Western blot“ za použití specifických protilátek proti proteinům těchto enzymů.

Příklady PVDF membrán ukazující expresi proteinů jednotlivých cytochromů P450 v jaterní mikrosomální frakci potkanů premedikovaných 3-NBA jsou zobrazeny na **obrázcích 21, 22, 23 a 24**. V mikrosomech tkáně sleziny a srdce potkanů premedikovaných 3-NBA dochází k expresi proteinů jednotlivých cytochromů P450 ve velmi malé míře a nebyla metodou „Western blot“ detekována.



Obr. 21 *Expresa proteinů CYP1A1 a 1A2 v mikrosomech izolovaných z jaterní tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA*

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



Obr. 22 *Expresa proteinů CYP2B v mikrosomech izolovaných z jaterní tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA*

Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k obr. 21



Obr. 23 *Expresa proteinů CYP2E1 v mikrosomech izolovaných z jaterní tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA*

Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k obr. 21



Obr. 24 *Expresa proteinů CYP3A v mikrosomech izolovaných z jaterní tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA*

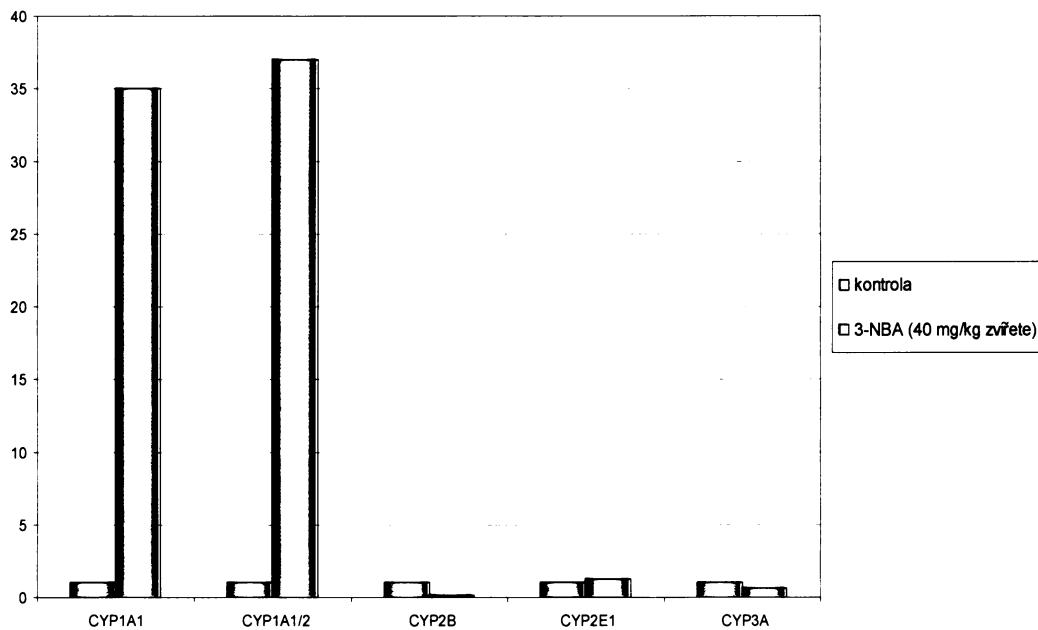
Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k obr. 21

Výsledky z metody „Western blot“ byly kvantifikovány v programu Elfoman a jsou uvedeny v **tabulce 5** a **obrázku 25**.

Z výsledků je patrné, že 3-NBA působí jako induktor exprese CYP1A1 a 1A2 (**Tab. 5**). Z dalších sledovaných cytochromů P450 je exprese ovlivňována 3-NBA pouze v případě CYP3A. Premedikací potkanů 3-NBA je exprese CYP3A potlačena (**Tab. 5**). Množství CYP2B a CYP2E1 v jaterní tkáni laboratorního potkana 3-NBA prakticky ovlivněno není (**Tab. 5**).

Tab. 5 *Vliv premedikace potkanů na expresi proteinů vybraných enzymů v jaterní tkáni*

druh mikrosomální frakce	dávka 3-NBA [mg/kg zvířete]	plocha píku	plocha píku	plocha píku	plocha píku	plocha píku
		CYP1A1	CYP1A1/2	CYP2B	CYP2E1	CYP3A
játra	Kontrola	0,31	0,31	9,48	1,80	2,35
	0,4	0,64	0,99	5,74	1,38	1,75
	4	0,82	1,08	1,98	1,36	1,58
	40	10,94	11,56	1,12	2,31	1,48

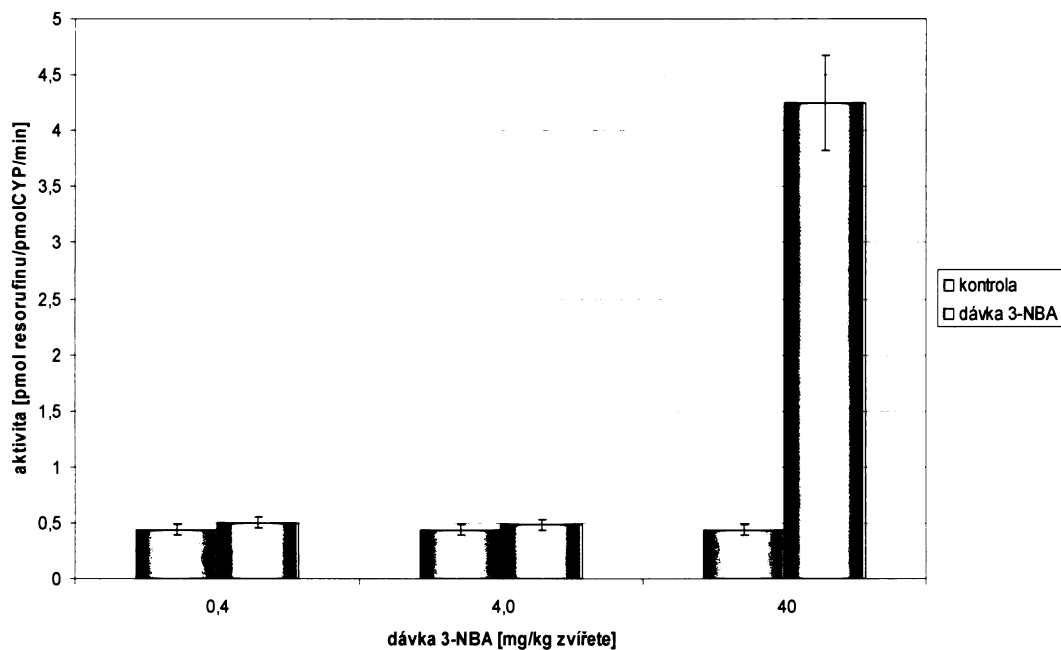


Obr. 25 Vliv premedikace potkanů na expresi proteinů cytochromů P450 v jaterní tkáni

4.3.3. VLIV PREMEDIKACE LABORATORNÍCH POTKANŮ 3-NBA NA AKTIVITY CYTOCHROMŮ P450

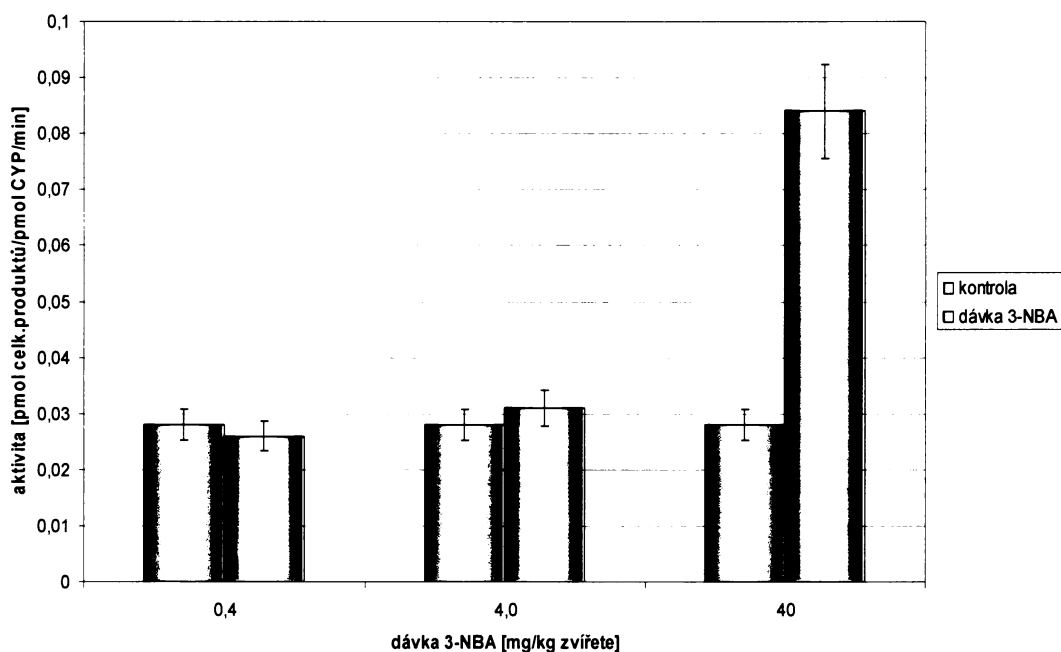
Pro potvrzení výsledků získaných při sledování exprese cytochromů P450 bylo dále sledováno, zda je 3-nitrobenzanthronem ovlivněna i jejich aktivita. Aktivita jednotlivých cytochromů P450 byla zjišťována pomocí jejich specifických substrátů.

Výsledky získané za použití jaterních mikrosomů jsou uvedeny v **obrázcích 26 a 27**. Sledování vlivu premedikace potkanů 3-NBA na oxidaci 7-ethoxyresorufinu (*O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu, EROD) a Sudanu I, zprostředkované cytochromy P450 1A1 a 1A2, potvrdilo výsledky získané studiem ovlivnění jejich exprese. Působením 3-NBA premedikací potkanů dávkou 40 mg 3-NBA/kg dochází i ke zvýšení obou specifických aktivit (**Obr. 26 a 27**).



Obr. 26 Vliv premedikace potkanů 3-NBA na oxidaci 7-ethoxyresorufinu (EROD) v jaterních mikrosomech

Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k tabulce 4



Obr. 27 Vliv premedikace potkanů 3-NBA na oxidaci Sudanu I v jaterních mikrosomech

Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k tabulce 4

4.3.4. VLIV PREMEDIKACE LABORATORNÍCH POTKANŮ 3-NBA NA EXPRESI NADPH:P450 REDUKTÁZY V MIKROSOMECH IZOLOVANÝCH Z TKÁNĚ JATER, LEDVIN, PLIC, SLEZINY A SRDCE

V mikrosomálních frakcích izolovaných z jater, ledvin, plic, sleziny a srdce experimentálních zvířat vystavených působení rozdílných koncentrací 3-NBA jsme dále sledovali expresi dalšího enzymu biotransformujícího xenobiotika, NADPH:P450 reduktázy. K tomu jsme rovněž užili metodu „Western blot“ za použití specifické protilátky proti tomuto enzymu.

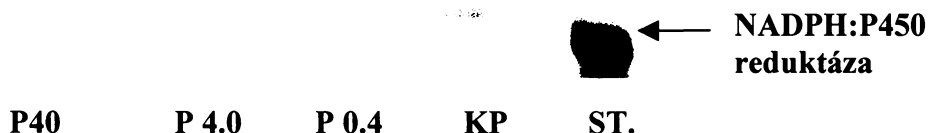
Příklady PVDF membrán ukazující expresi enzymu NADPH:P450 reduktázy v jaterní, ledvinné a plicní tkáni jsou uvedeny na **obrázcích 28 a 29**.



Obr. 28 *Expese NADPH:P450 reduktázy v mikrosomech izolovaných z jaterní a ledvinné tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA*

ST – standard NADPH:P450 reduktázy

Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k *obr. 21*



Obr. 29 *Expese NADPH:P450 reduktázy v mikrosomech izolovaných z plicní tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA*

ST – standard NADPH:P450 reduktázy

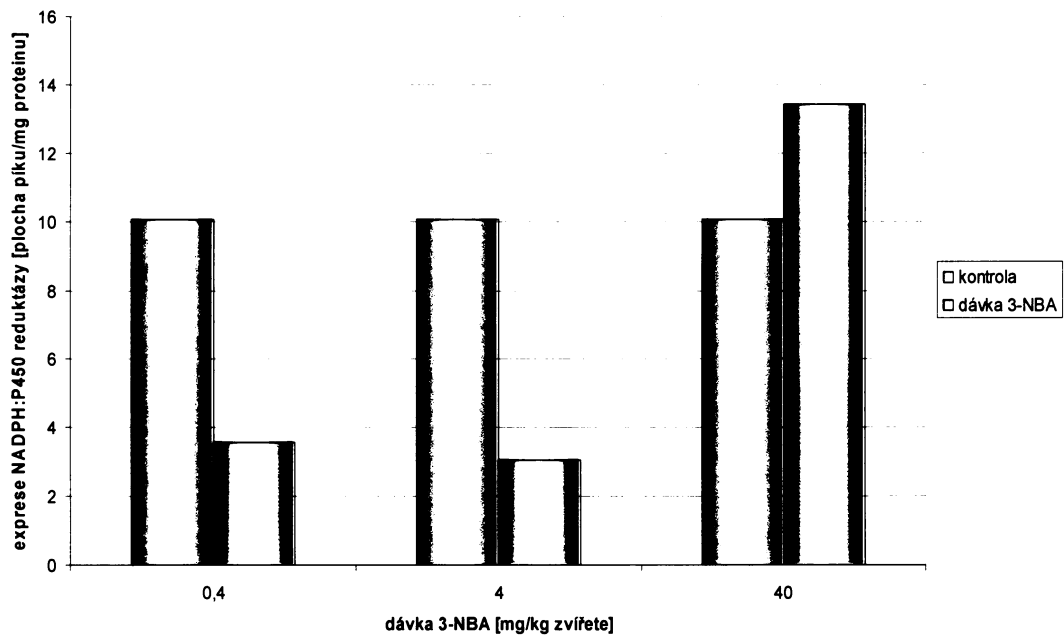
Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k *obr. 21*

Výsledky z metody „Western blot“ byly kvantifikovány v programu Elfoman a jsou uvedeny v **tabulce 6** na **obrázcích 30, 31 a 32**.

Z výsledků je patrné, že 3-NBA indukuje expresi NADPH:P450 reduktázy v jaterní tkáni potkanů, avšak premedikovaných pouze nejvyšší koncentrací této látky (40 mg/kg) (**Tab. 6, Obr. 30**). V případě mikrosomů izolovaných z ledvin a plic potkanů premedikovaných 3-NBA je exprese tohoto enzymu potlačena (**Tab. 6, Obr. 31 a 32**). K expresi NADPH:P450 reduktázy u mikrosomů slezinné a srdeční tkáně dochází ve velmi malé míře a nebyla metodou „Western blot“ detekována.

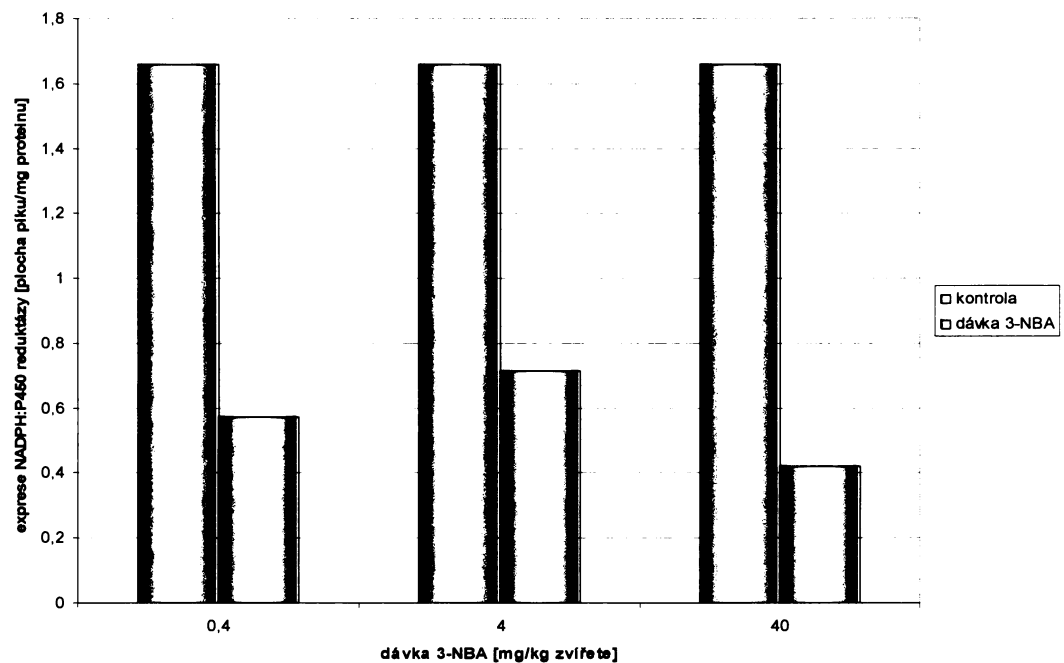
Tab. 6 *Vliv premedikace potkanů na expresi proteinů NADPH:P450 reduktázy v jaterní, ledvinné a plicní tkáni*

druhy mikrosomální frakce	dávka 3-NBA [mg/kg zvířete]	exprese NADPH:P450 reduktázy [plocha piku/mg proteinu]
játra	<i>Kontrola</i>	10,07
	0,4	3,58
	4	3,04
	40	13,41
ledviny	<i>Kontrola</i>	1,66
	0,4	0,57
	4	0,71
	40	0,42
plice	<i>Kontrola</i>	0,45
	0,4	0,34
	4	0,20
	40	0,16



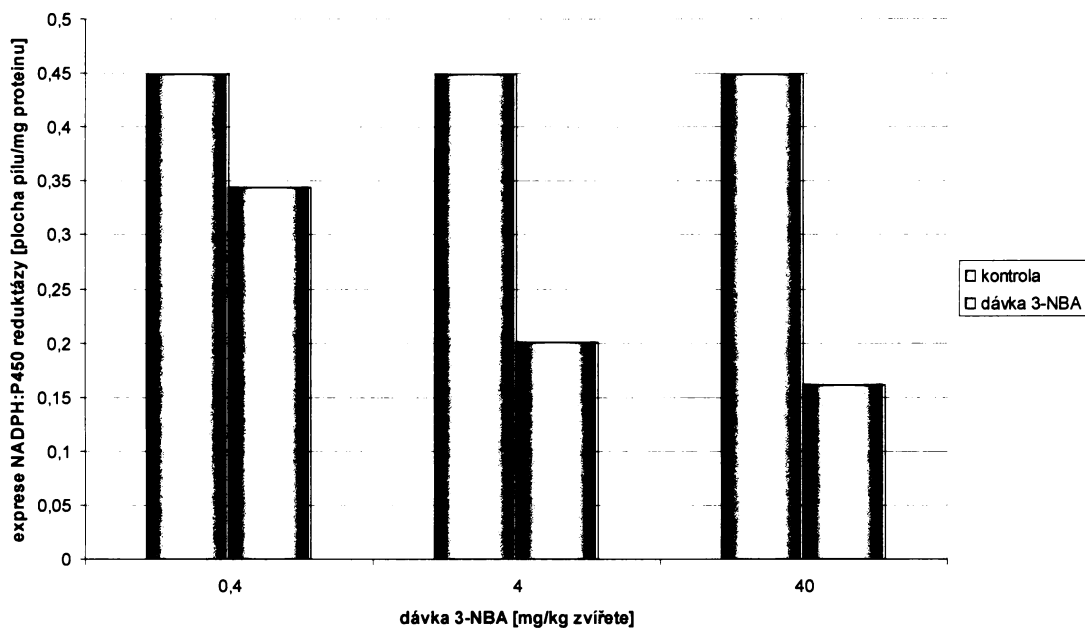
Obr. 30 Stanovení obsahu NADPH:P450 reduktázy pomocí specifické protilátky v mikrosomech izolovaných z jaterní tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA

Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k tab. 4



Obr. 31 Stanovení obsahu NADPH:P450 reduktázy pomocí specifické protilátky v mikrosomech izolovaných z ledvinné tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA

Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k tab. 4



Obr. 32 Stanovení obsahu NADPH:P450 reduktázy pomocí specifické protilátky v mikrosomech izolovaných z plicní tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA

Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k tab. 4

4.3.5. VLIV PREMEDIKACE LABORATORNÍCH POTKANŮ 3-NBA NA AKTIVITU NADPH:P450 REDUKTÁZY V MIKROSOMECH IZOLOVANÝCH Z TKÁNĚ JATER, LEDVIN, PLIC, SLEZINY A SRDCE

Kromě vlivu premedikace výše uvedenou látkou na expresi biotransformačního enzymu NADPH:P450 reduktázy jsme v mikrosomálních frakcích izolovaných z jater, ledvin, plic, sleziny a srdce experimentálních zvířat vystavených působení rozdílných koncentrací 3-NBA sledovali také specifickou aktivitu tohoto enzymu. Výsledky jsou uvedeny v **tabulce 7**.

V jaterní tkáni potkanů premedikovaných 3-NBA došlo ke zvýšení specifické aktivity NADPH:P450 reduktázy vyjádřené na množství mikrosomálních proteinů oproti kontrolní jaterní tkáni izolované z nepremedikovaných zvířat ve všech případech, nejvíce pak u tkáně experimentálních zvířat premedikovaných nejnižším množstvím 3-NBA (0,4 mg/kg). Specifická aktivita tohoto enzymu

vyjádřená na hmotnost analyzovaného orgánu (jater) však byla snížena (**Tab. 7, Obr. 33**).

Také v případě ledvinné tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA došlo ke zvýšení specifické aktivity NADPH:P450 reduktázy oproti kontrolní ledvinné tkáni u zvířat premedikovaných 3-NBA v dávce 0,4 a 40 mg/kg, nárůst však byl pouze 1,2 – 1,8 násobný (**Tab. 7, Obr. 34**).

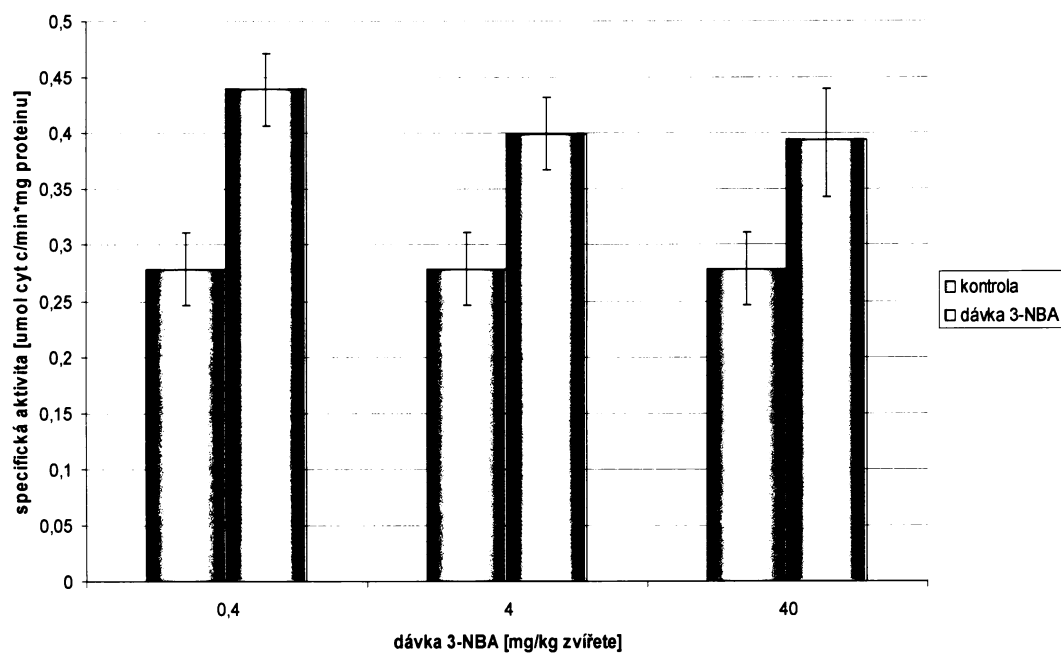
Ve slezinné tkáni experimentálních zvířat premedikovaných 3-NBA byl pozorován vysoký nárůst specifické aktivity NADPH:P450 reduktázy, největší pak v případě slezinné tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA v dávce 4 mg/kg (**Tab. 7, Obr. 35**).

V mikrosomálních frakcích izolovaných z tkání plic a srdce nebyla specifická aktivita NADPH:P450 reduktázy detailně vyhodnocována vzhledem k nízkých hladinám tohoto enzymu v obou tkáních.

Vliv premedikace laboratorních potkanů 3-NBA na specifickou aktivitu NADPH:P450 reduktázy je shrnut v **tabulce 7** a na **obrázcích 33, 34 a 35**.

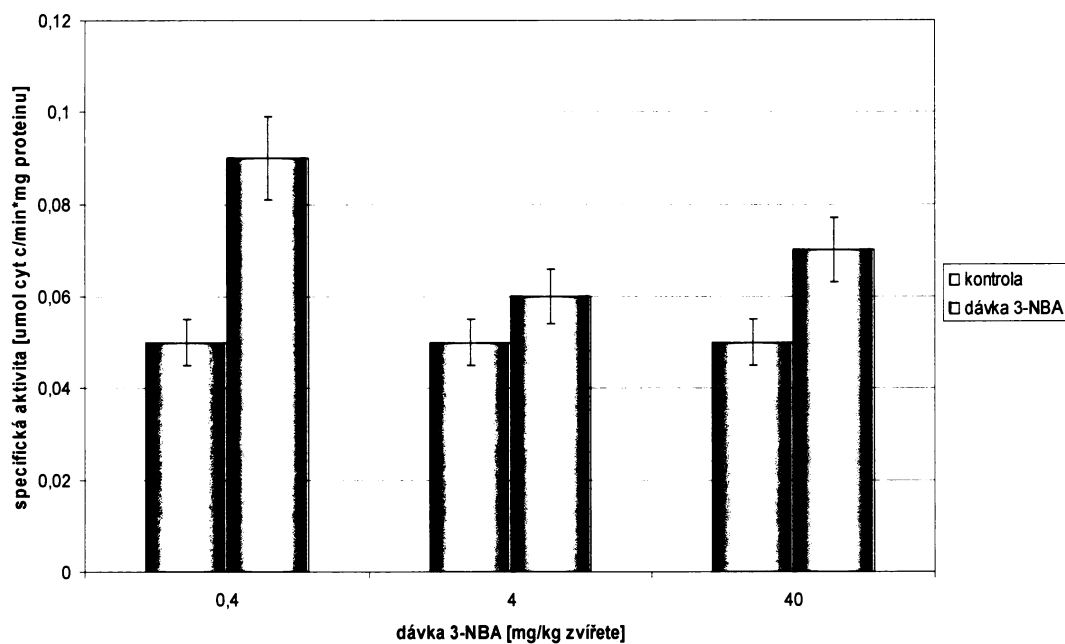
Tab. 7 Vliv premedikace potkanů 3-NBA na aktivitu NADPH:P450 reduktázy v jaterních, ledvinných a slezinných mikrosomálních vzorcích; hodnoty v tabulce vyjadřují průměry a standardní odchylky ze tří stanovení

druhy mikrosomální frakce	dávka 3-NBA [mg/kg zvířete]	specifická aktivita [μM cyt c/min*mg proteinu]	celková aktivita [μM cyt c/min]	aktivita [μM cyt c/min*g orgánu]
játra	Kontrola	0,28 ± 0,03	90,36 ± 9,68	1,33 ± 0,14
	0,4	0,40 ± 0,05	25,73 ± 3,22	0,89 ± 0,11
	4	0,44 ± 0,05	22,14 ± 2,52	0,92 ± 0,10
	40	0,39 ± 0,03	12,12 ± 0,93	0,60 ± 0,05
ledviny	Kontrola	0,05 ± 0,01	1,31 ± 0,26	0,10 ± 0,02
	0,4	0,09 ± 0,01	0,76 ± 0,08	0,14 ± 0,01
	4	0,06 ± 0,01	0,63 ± 0,10	0,18 ± 0,03
	40	0,07 ± 0,01	0,66 ± 0,09	0,16 ± 0,02
slezina	Kontrola	0,003 ± 0,001	0,07 ± 0,02	0,01 ± 0,003
	0,4	0,03 ± 0,01	0,16 ± 0,05	0,07 ± 0,02
	4	0,23 ± 0,03	1,16 ± 0,15	0,95 ± 0,12



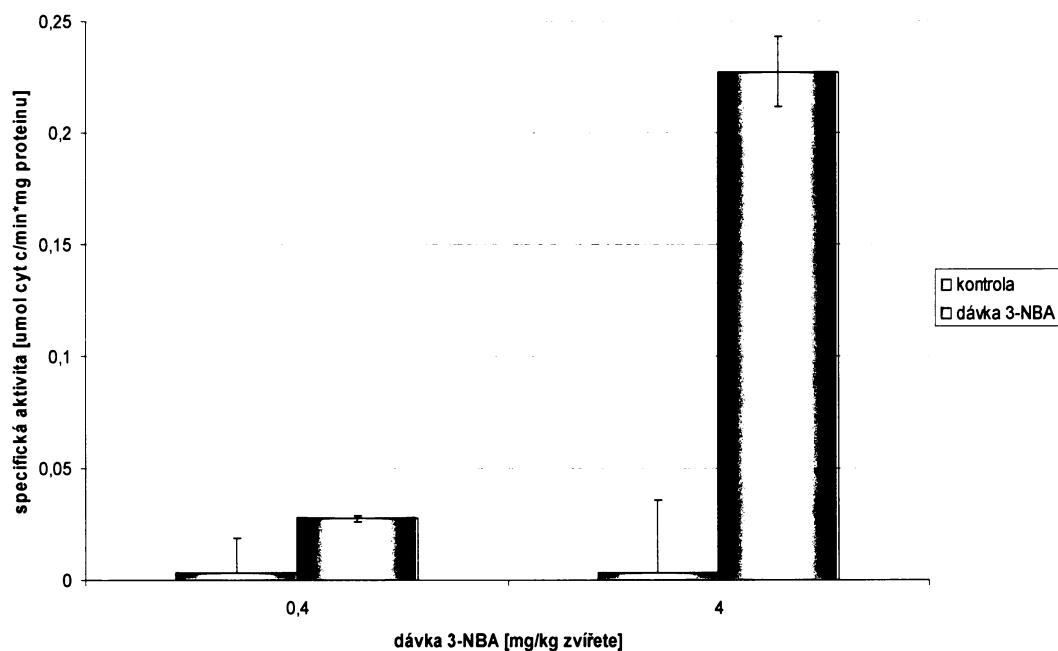
Obr. 33 Vliv premedikace potkanů 3-NBA na aktivitu NADPH:P450 reduktázy v jaterní tkáni

Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k tabulce 4



Obr. 34 Vliv premedikace potkanů 3-NBA na aktivitu NADPH:P450 reduktázy v ledvinné tkáni

Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k tabulce 4



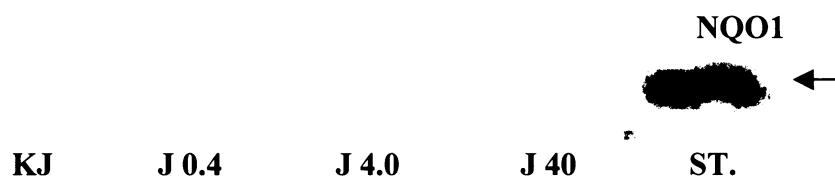
Obr. 35 Vliv premedikace potkanů 3-NBA na aktivitu NADPH:P450 reduktázy ve slezinné tkáni

Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k tabulce 4

4.3.6. VLIV PREMEDIKACE LABORATORNÍCH POTKANŮ 3-NBA NA EXPRESI DT-DIAFORÁZY V CYTOSOLECH IZOLOVANÝCH Z TKÁNĚ JATER, LEDVIN, PLIC, SLEZINY A SRDCE

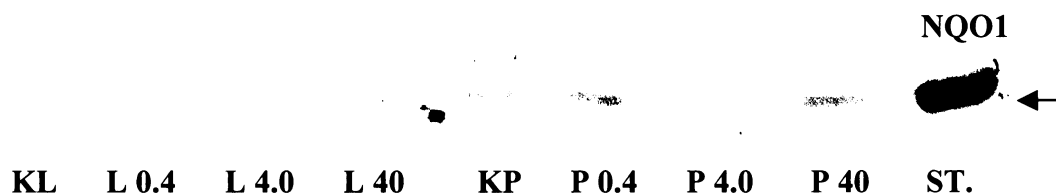
Další část diplomové práce se zabývá vlivem premedikace laboratorních potkanů 3-NBA na enzymy cytosolární frakce tkání těchto potkanů. Některé cytosolární enzymy totiž rovněž participují na metabolismu cizorodých látek. Zaměřili jsme se na cytosolární enzym DT- diaforázu (NQO1), jejíž ovlivnění 3-NBA bylo sledováno v jaterní, ledvinné, plicní, slezinné a srdeční tkáni experimentálních zvířat premedikovaných 3-NBA. Zjišťovali jsme, jak je 3-NBA ovlivněna její exprese. K tomu jsme opět užili metodu „Western blot“ za použití specifické protilátky proti tomuto enzymu.

Příklady membrán ukazující expresi enzymu DT-diaforázy v jaterní, ledvinné a plicní tkáni jsou uvedeny na **obrázcích 36 a 37**.



Obr. 36 *Expres DT-diaforázy v cytosolu izolovaném z jaterní tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA*

Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k obr. 21



Obr. 37 *Expres DT-diaforázy v cytosolu izolovaném z ledvinné a plicní tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA*

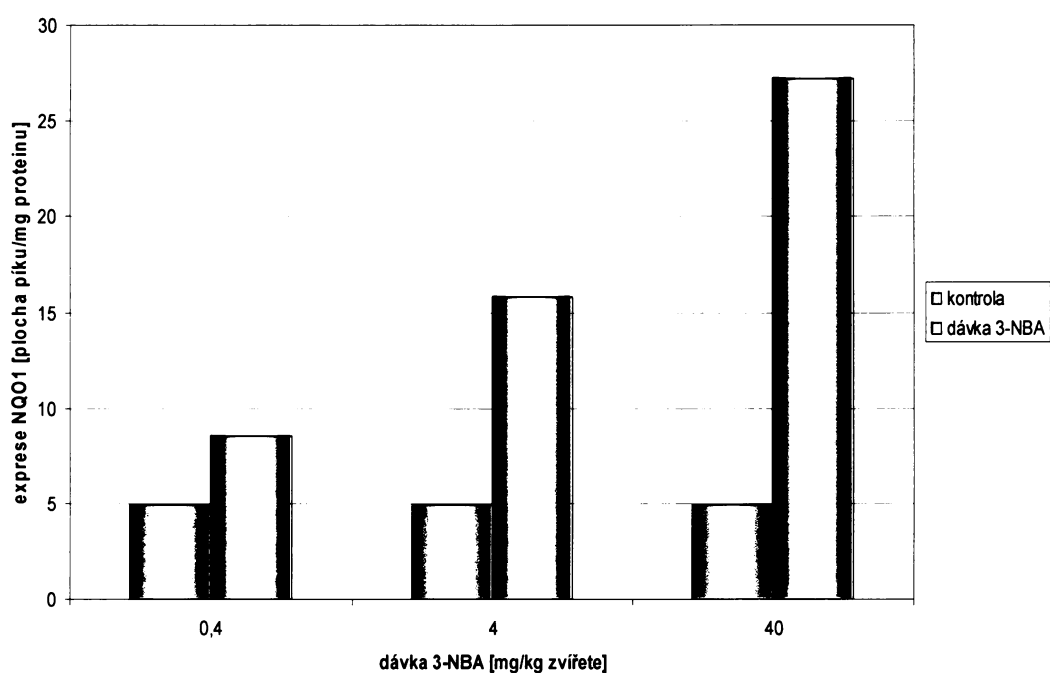
Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k obr. 21

Výsledky z metody „Western blot“ byly kvantifikovány v programu Elfoman a jsou uvedeny v **tabulce 8** na **obrázcích 38, 39 a 40**.

Z výsledků je patrné, že 3-NBA indukuje expresi DT-diaforázy v cytosolu jaterní tkáně, která se zvyšuje až 5,5x s rostoucí koncentrací látky použité k premedikaci (viz **Tab. 8, Obr. 38**). V případě cytosolů izolovaných z ledvin a plic experimentálních zvířat je expres tohoto enzymu indukována až při premedikaci zvířat nejvyšší dávkou 3-NBA (viz **Tab. 8, Obr. 39 a 40**). Vzhledem k nízké expresi DT-diaforázy v cytosolech slezinné a srdeční tkáně nebyla metodou „Western blot“ v cytosolech těchto tkání detekována.

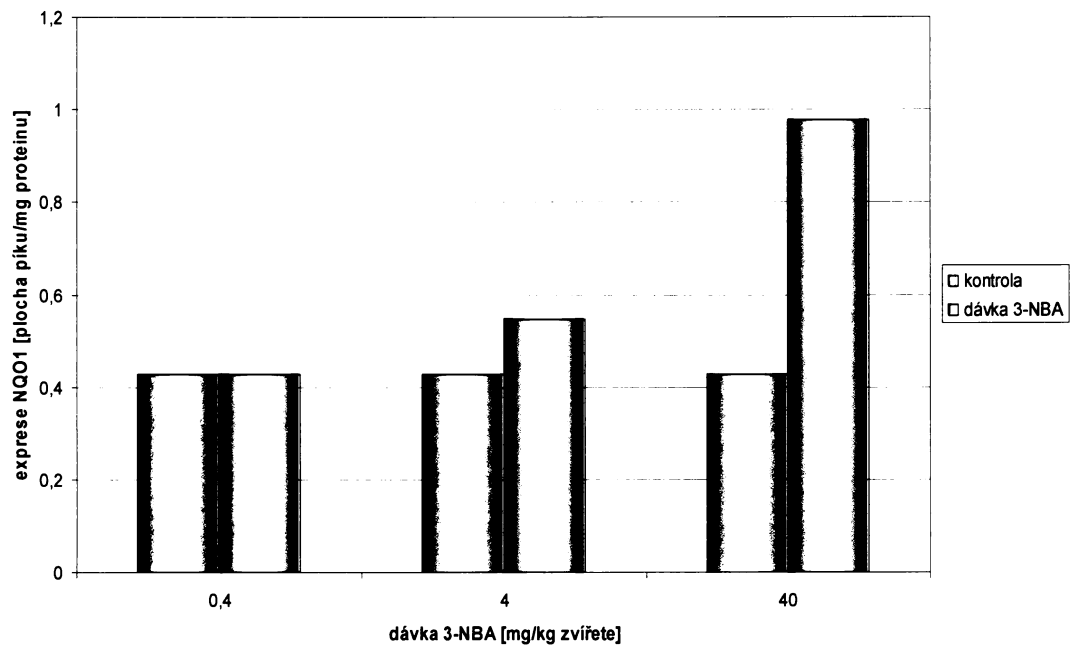
Tab. 8 Vliv premedikace potkanů na expresi proteinů DT-diaforázy v jaterní, ledvinné a plicní tkáni

druhy mikrosomální frakce	dávka 3-NBA [mg/kg zvířete]	exprese NQO1 [plocha píku/mg proteinu]
játra	Kontrola	4,92
	0,4	8,59
	4	15,84
	40	27,20
ledviny	Kontrola	0,43
	0,4	0,43
	4	0,55
	40	0,98
plíce	Kontrola	2,44
	0,4	2,54
	4	2,12
	40	5,10



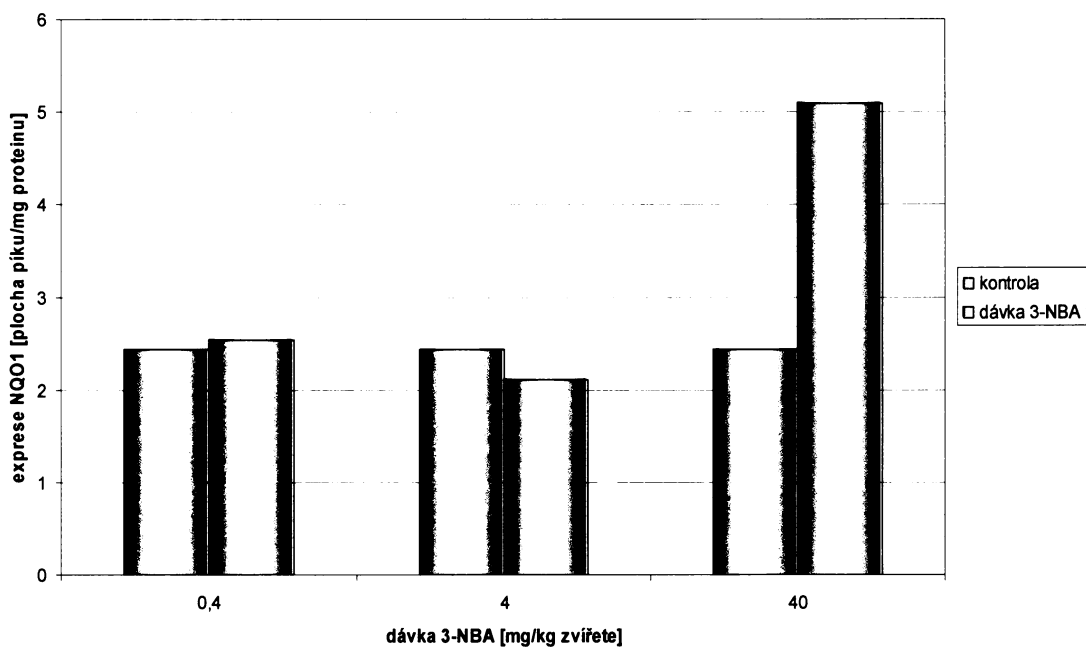
Obr. 38 Stanovení obsahu NQO1 pomocí specifické protilátky v cytosolech izolovaných z jaterní tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA

Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k tab. 4



Obr. 39 Stanovení obsahu NQO1 pomocí specifické protilátky v cytosolech izolovaných z ledvinné tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA

Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k tab. 4



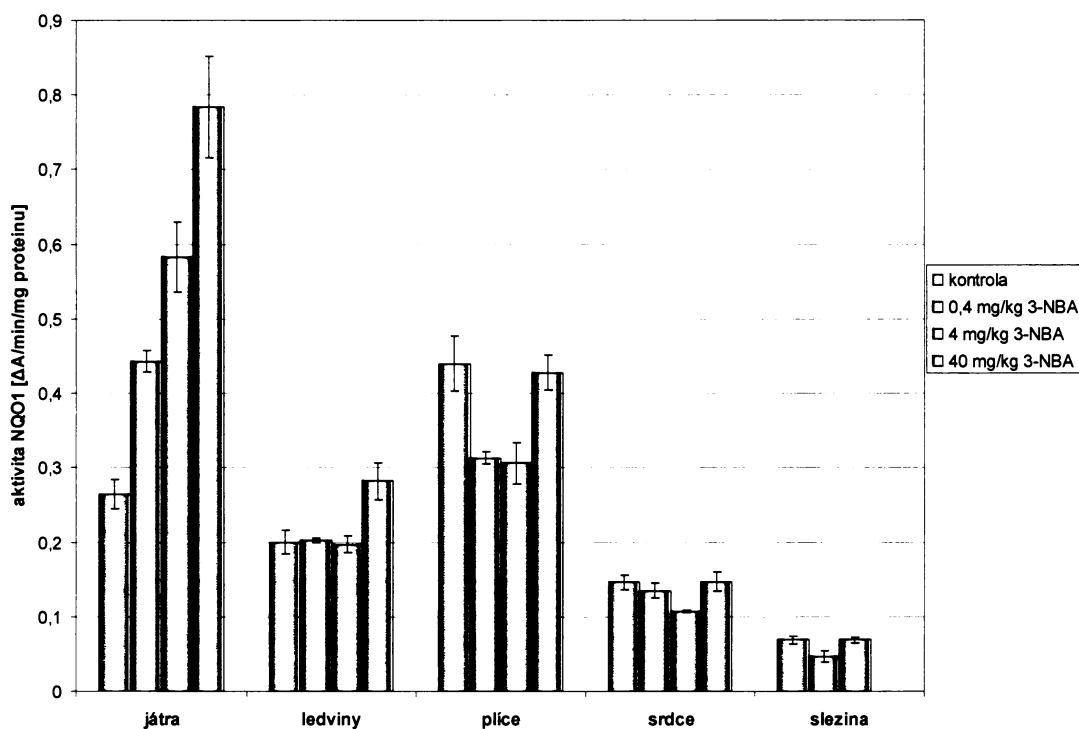
Obr. 40 Stanovení obsahu NQO1 pomocí specifické protilátky v cytosolech izolovaných z plicní tkáně potkanů premedikovaných 3-NBA

Pozn. Zkratky uvedené v obrázku jsou vysvětleny v legendě k tab. 4

4.3.7. VLIV PREMEDIKACE LABORATORNÍCH POTKANŮ 3-NBA NA AKTIVITU DT-DIAFORÁZY V CYTOSOLECH IZOLOVANÝCH Z TKÁNĚ JATER, LEDVIN, PLIC, SLEZINY A SRDCE

Kromě vlivu premedikace potkanů výše uvedenou látkou na expresi cytosolárního enzymu DT-diaforázy (NQO1) jsme také sledovali jak 3-NBA ovlivňuje specifickou aktivitu tohoto biotransformačního enzymu. Výsledky jsou uvedeny na **obrázku 41**.

Se zvyšující se koncentrací 3-NBA dochází v cytosolu jaterní tkáně ke zvýšení aktivity DT-diaforázy (**Obr. 41**). Cytosol tkáně ledvin vykazuje oproti kontrolnímu cytosolu z nepremedikovaných zvířat zvýšení aktivity DT-diaforázy při premedikaci pouze nejvyšší koncentrací 3-NBA (**Obr. 41**). V cytosolech plicní tkáně experimentálních zvířat se premedikací 3-NBA aktivita DT-diaforázy příliš nemění, v cytosolech srdeční a slezinné tkáně nebyla premedikací experimentálních zvířat 3-NBA aktivita DT-diaforázy prakticky ovlivněna (**Obr. 41**).



Obr. 41 Vliv premedikace potkanů 3-NBA na aktivitu DT-diaforázy v jaterní, ledvinné, plicní, srdeční a slezinné tkáni

5. DISKUZE

Cílem diplomové práce bylo rozšířit poznatky o fyziologických účincích aromatických nitrosloučenin, konkrétně 3-nitrobenzanthronu (3-NBA), který je silným mutagenem a potenciálním karcinogenem pro živočišné organismy. Studium této sloučeniny je významné nejen kvůli její toxicitě, ale i proto, že tato látka je polutantem přítomným v ovzduší městských aglomerací a pracovním prostředím některých technologických výroby. O jeho fyziologických účincích na organismy však dosud detailní informace chybí. Podstatné je, že 3-NBA je genotoxickou sloučeninou, která je schopna kovalentně modifikovat DNA. Tyto poznatky byly zjištěny jak v experimentech *in vivo*, tak i *in vitro*^{112,114,117}. 3-NBA je v průběhu metabolismu v modelovém organismu laboratorního potkana aktivován na reaktivní metabolity generující adukty s DNA detekované v několika tkáních tohoto experimentálního modelu. Z předchozích studií je zřejmé, že klíčovým místem metabolické aktivace této aromatické nitrosloučeniny je nitroskupina¹⁰⁴. Redukcí nitroskupiny totiž může vznikat hydroxylamin, který je nestabilní a ochotně tvoří nitreniový ion, který buď sám nebo přeměněný na ion karbeniový, je schopný reagovat s nukleofilními centry molekul DNA za tvorby aduktů. Výše uvedený předpoklad reakčního mechanismu je však třeba prokázat dalšími studiemi.

Bylo zjištěno, že na redukční aktivaci 3-NBA se podílí nejen enzymové systémy jaterních mikrosomů, ale i enzymy přítomné v cytosolární frakci jaterní tkáně modelového organismu¹³². Prokázalo se také, že adukty s DNA generované metabolity vzniklými redukční aktivací 3-NBA jsou totožné jak v případě aktivace 3-NBA enzymovými systémy mikrosomů jater, tak i při aktivaci 3-NBA enzymy cytosolární frakce jaterní tkáně¹³². Nejeftektivněji je 3-NBA v jaterních mikrosomech aktivován enzymem NADPH:P450 reduktázou¹³¹. Z cytosolárních enzymů jaterní tkáně se na aktivaci 3-NBA nejvíce podílí enzym DT-diaforáza (NQO1)¹³². Ukázalo se také, že cytosolární enzymové systémy jaterní tkáně redukčně aktivují 3-NBA mnohem účinněji než enzymové systémy jaterních mikrosomů¹³².

Předkládaná diplomová práce se zabývá dvěma oblastmi. První z nich je zaměřena na studium metabolismu 3-NBA cytosolárními enzymy jaterní tkáně modelového organismu laboratorního potkana *in vitro*, separace vzniklých metabolitů a jejich analýza pomocí HPLC. Druhá oblast je doplněním studie

provedené kolegyní Lucií Kutnerovou¹³¹, a sice zda enzymy, které v organismu zprostředkovávají metabolickou aktivaci 3-NBA, mohou být touto látkou v organismu nějak ovlivňovány. Pro poznání, zda 3-NBA může ovlivňovat hladiny a aktivity enzymů, které jsou účinné v jeho aktivačním metabolismu, byl jako experimentální model využit laboratorní potkan. Důvodem je fakt, že aktivace 3-NBA v mikrosomech jaterních tkání člověka a laboratorního potkana je majoritně zprostředkována stejným enzymem a také proto, že se tvoří analogické adukty. Lze tedy předpokládat, že v obou testovaných organismech probíhá aktivace obdobným způsobem a laboratorní potkan je tak vhodným experimentálním modelem¹³¹.

Cíle diplomové práce byly splněny. Sledováním metabolismu 3-NBA cytosolárními enzymy jaterní tkáně experimentálních zvířat premedikovaných Sudanem I jsme potvrdili majoritní úlohu DT-diaforázy při redukci 3-NBA. K největší přeměně 3-NBA na majoritní metabolit 3-aminobenzanthron (3-ABA) došlo při použití NADH a NADPH jako koenzymů, což ukazuje, že na metabolismu 3-NBA z cytosolárních enzymů nejvíce participuje právě DT-diaforáza. Kromě hlavního metabolitu 3-ABA jsme detekovali 2 další metabolity s neznámou strukturou, které mohou být některými z meziproductů biotransformace 3-NBA na 3-ABA. Dále jsme stanovili optimální podmínky pro redukci 3-NBA enzymy cytosolární frakce jaterní tkáně experimentálních zvířat. K nejefektivnější přeměně 3-NBA na 3-ABA dochází po 60 minutové inkubaci s cytosolární frakcí o koncentraci proteinů 2 mg/ml.

Vzhledem k výsledkům získaným při sledování redukce 3-NBA cytosolárním systémem, které signalizují majoritní participaci DT-diaforázy na této reakci, studovali jsme redukci 3-NBA také samotnou DT-diaforázou. Zajímala nás závislost přeměny 3-NBA NQO1 na různých podmínkách inkubace jako je koncentrace NQO1 v inkubační směsi, doba inkubace nebo koncentrace samotného 3-NBA za konstantního množství NQO1 ve směsi.

S rostoucí koncentrací DT-diaforázy se v inkubační směsi zvyšuje i redukce 3-NBA. Ke zvyšování tvorby majoritního metabolitu 3-ABA však dochází pouze do určité koncentrace enzymu ve směsi, pak se jeho množství dále nezvyšuje. Z dřívějších studií je možné předpokládat, že intermediátem, vzniklým při redukci 3-NBA je N-OH-3-ABA. Tento předpoklad byl vysloven a též potvrzen již v dřívějších studiích prováděných v laboratoři, kde byla předkládána diplomová

práce vypracovávána. Zjištěno totiž bylo, že 3-NBA je redukčně aktivován za tvorby aduktů s DNA, které jsou shodné s adukty tvořenými N-OH-3-ABA¹¹⁶.

V případě našich experimentů tedy lze předpokládat, že tento intermediát tvoří elektrofilní produkt, který se může vázat na nukleofilní centra proteinu NQO1. Je-li v inkubační směsi přítomno větší množství NQO1, je i větší množství reaktivního intermediátu vázáno na její molekulu, aniž by docházelo k jeho redukci na 3-ABA. Co se týče dvou dalších metabolitů s neznámou strukturou, i když nemůžeme ani odhadovat o jaké sloučeniny se jedná, je zřejmé, že „vycházejí“ z 3-NBA a jejich množství se mění v závislosti na enzymu, který tuto sloučeninu metabolizuje (redukuje).

Se zvyšující se dobou inkubace NQO1 s 3-NBA dochází k úbytku 3-NBA v inkubační směsi a k nárůstu produkce 3-ABA až do inkubace trvajících 120 minut. Při delší době inkubace dochází k poklesu tvorby 3-ABA, pravděpodobně kvůli snížení aktivity DT-diaforázy, která umožňuje redukční přeměnu 3-NBA na 3-ABA. Co skutečně způsobuje tento jev je však nutné prozkoumat ještě další detailní studií.

Se zvyšující se koncentrací 3-NBA v inkubační směsi dochází ke zvýšení množství vzniklého metabolitu 3-ABA až do 10 μ M koncentrace 3-NBA. Při nejvyšší použité koncentraci 3-NBA však dochází jak k poklesu množství nepřeměněného 3-NBA tak i vzniklého 3-ABA.

Ve druhé části diplomové práce bylo sledováno potenciální ovlivnění mikrosomálních enzymů jako jsou NADPH:P450 reduktáza a cytochromy P450 podrodin 1A a 2B. Dále pak cytochromu P450 2E1 a cytochromů P450 podrodiny 3A. Vliv 3-NBA na cytochromy P450 podrodiny 2D (potkaní CYP2D1) nebyl v práci sledován. Je o něm totiž známo, že je konstitutivním cytochromem P450, jehož exprese není induktory ovlivněna⁷³. Dále bylo sledováno i potenciální ovlivnění cytosolárních enzymů, hlavně DT-diaforázy. Z orgánů, které byly sledovány z hlediska vlivu premedikace užitého živočišného modelu 3-nitrobenzanthronem na jejich enzymy, byly vybrány játra, ledviny, plíce, slezina a srdce. Játra jako orgán, kde je lokalizováno největší množství enzymů biotransformující xenobiotika^{71,73}, ledviny jako orgán vylučovací a plíce proto, že jsou pro vystavení lidské populace působení 3-NBA asi nejdůležitější. Slezina a srdce byly potom vybrány jako orgány, kde je množství biotransformačních enzymů naopak nízké.

Aktivita enzymu, který se podílí na aktivaci 3-NBA v lidských a potkaních

játrech nejvýznamněji, tedy NADPH:P450 reduktázy, je v jaterní, ledvinné i slezinné tkáni zvýšena. V případě jaterní tkáně došlo ke zvýšení aktivity NADPH:P450 reduktázy hlavně u zvířat premedikovaných nejvyšší dávkou 3-NBA (40 mg/kg), specifická aktivita tohoto enzymu vyjádřená na hmotnost analyzovaného orgánu (jater) však byla snížena. V ledvinné tkáni došlo ke zvýšení specifické aktivity u zvířat premedikovaných dávkou 3-NBA 0,4 a 40 mg/kg a ve slezinné tkáni byl pozorován vysoký nárůst specifické aktivity NADPH:P450 reduktázy hlavně u zvířat premedikovaných dávkou 3-NBA 4 mg/kg. V plicních a srdečních mikrosomech nebylo ovlivnění aktivity tohoto enzymu detailně vyhodnocováno vzhledem k jeho nízkým hladinám v těchto tkáních. Co se týče vlivu 3-NBA na expresi NADPH:P450 reduktázy, ke zvýšení exprese dochází u mikrosomů jaterní tkáně zvířat premedikovaných nejvyšší dávkou 3-NBA (40 mg/kg), což koresponduje i se zvýšením aktivity tohoto enzymu v jaterní tkáni experimentálních zvířat. V případě mikrosomů ledvin a plic potkanů premedikovaných 3-NBA je exprese tohoto enzymu potlačena. K expresi NADPH:P450 reduktázy u mikrosomů slezinné a srdeční tkáně dochází ve velmi malé míře a nebyla použitou metodou „Western blot“ detekována.

Studovaný mutagen a karcinogen, 3-NBA, však také ovlivňuje expresi a aktivitu některých cytochromů P450. Nejpodstatnější vliv byl pozorován na enzymy podrodiny 1A. CYP1A1 a 1A2 jsou působením 3-NBA silně indukovány. Indukce byla prokázána jak sledováním exprese proteinů těchto enzymů metodou „Western blot“, tak i sledováním jejich aktivity za použití markerových substrátů. K nejsilnější indukci CYP1A1/2 dochází působením 3-NBA v játrech. To je důležitý poznatek, právě vzhledem k tomu, že se oba enzymy aktivace 3-NBA mohou účastnit. Exprese cytochromů P450 podrodiny 2B, které na aktivaci 3-NBA také participují, je 3-NBA v jaterní tkáni snížena.

Vedle cytochromů P450 participujících na aktivaci 3-NBA bylo sledováno ovlivnění i dalších enzymů této skupiny. Jmenovitě CYP2E1 a 3A. V případě CYP2E1 byla jeho exprese působením 3-NBA slabě zvýšena, avšak až při nevyšších koncentracích 3-NBA, kterým byly laboratorní potkani vystaveni (40 mg/kg). Exprese CYP3A nebyla 3-NBA v použitém experimentálním modelu v játrech prakticky ovlivněna.

Kromě vlivu 3-NBA na enzymy mikrosomální frakce jsme se zabývali i jeho vlivem na enzymy frakce cytosolární, které rovněž participují na aktivaci 3-NBA.

Konkrétně jsme se zaměřili na ovlivnění exprese a aktivity DT-diaforázy. 3-NBA indukuje expresi DT-diaforázy v cytosolu jaterní tkáně až 5,5x, v případě cytosolů ledvin a plic experimentálních zvířat je exprese tohoto enzymu indukována při premedikaci zvířat nejvyšší dávkou 3-NBA (40 mg/kg). Ke zvýšení specifické aktivity DT-diaforázy dochází hlavně v cytosolu jaterní tkáně, a to úměrně se zvyšující se koncentrací 3-NBA použitého k premedikaci experimentálních zvířat. Cytosol tkáně ledvin vykazuje zvýšení aktivity DT-diaforázy v případě použití nejvyšší dávky 3-NBA (40 mg/kg). Změna aktivity DT-diaforázy tedy koresponduje se změnami v expresi tohoto cytosolárního enzymu a potvrzuje, že 3-NBA skutečně ovlivňuje tento biotransformační enzym v organismu.

Získané výsledky považujeme za cenné. Ilustrují nejen potenciál potkaních a lidských enzymů metabolizovat studovaný polutant, 3-NBA, ale ukazují i indukční potenciál této sloučeniny pro některé z enzymů, které participují na jeho metabolické aktivaci. Všechny tyto výsledky navíc podtrhují význam studia uvedeného polutantu. V další fázi výzkumu této sloučeniny je tedy nutné sledovat jeho toxické působení na lidskou populaci s předpokladem návrhů vedoucích ke snížení jeho negativních genotoxických účinků.

6. ZÁVĚR

Výsledky získané při řešení diplomové práce ilustrují, že vytčené cíle práce byly splněny. V práci bylo zjištěno, jaký cytosolární enzym přítomný v cytoplazmě jaterní tkáně modelového organismu, laboratorního potkana, participuje na redukci 3-NBA. Zjištěn byl i vliv studovaného polutantu na enzymy, které v organismech biotransformují xenobiotika. Nejdůležitější poznatky získané v diplomové práci lze shrnout následovně:

- 1) Enzymem cytosolární frakce jaterní tkáně modelového organismu, který nejvíce participuje na redukční aktivaci 3-NBA, je DT-diaforáza (NQO1).
- 2) Metabolickou přeměnou 3-NBA cytosolárními enzymy vzniká majoritní metabolit 3-ABA a dále dva potenciální metabolity s dosud neurčenou strukturou.
- 3) Redukce 3-NBA je závislá na koncentraci redukčního enzymu, době inkubace a koncentraci použitého 3-NBA v inkubační směsi.
- 4) Premedikací experimentálního modelu laboratorního potkana 3-nitrobenzantronem je stimulována exprese cytochromů P450 podrodiny 1A (CYP1A1/2). Studovaná sloučenina je silným induktorem těchto enzymů v jaterní tkáni použitého živočišného modelu.
- 5) Exprese cytochromů P450 podrodiny 2B je působením 3-nitrobenzantronu snížena.
- 7) Exprese cytochromů P450 2E1 a 3A premedikací laboratorní potkanů 3-nitrobenzantronem prakticky ovlivněny nejsou.
- 8) Exprese a aktivita NADPH:P450 reduktázy je působením 3-NBA zvýšena v mikrosomech jaterní tkáně experimentálních zvířat.

- 9) Premedikace laboratorních potkanů 3-nitrobenzanthronem indukuje expresi DT-diaforázy v cytosolech jaterní, ledvinné a plicní tkáně modelového organismu. Aktivita DT-diaforázy je premedikací zvýšena v cytosolech jaterní a ledvinné tkáně.

Diplomová práce přináší původní vědecké výsledky, z nichž některé byly již publikovány formou posteru na VIX. Pracovním setkání biochemiků a molekulárních biologů, organizovaném v únoru tohoto roku v Brně. Výsledky podtrhují význam studia sledované sloučeniny, která je polutantem ovzduší městského a pracovního prostředí. Je patrné, že 3-NBA je nejen silným mutagenem pro živočišné organismy, ale i potenciálním genotoxikantem pro lidskou populaci.

7. SEZNAM LITERATURY

1. Vokurka, M.: Praktický slovník medicíny, Maxdorf, Praha (1994)
2. Stiborová, M., Mikšanová, M.: Živa, 47:4 (1999)
3. Bednář, B.: Patologie, Avicenum, Praha (1982)
4. Diamandopoulos, G.T., Meissner, W.A.,: v knize "Anderson's Pathology" (Kissane, J.M., ed.), Mosby, St. Louis, str.772 (1985)
5. Zámečník, J.: Radioterapie, Avicenum, Praha (1990)
6. Vonka, V.: Kapitoly z molekulové biologie, skriptum 2. LFUK, H&H, Jinočany (1992)
7. De Vita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A.: Cancer Principles and Practice of Oncology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001)
8. Němečková, A.: Lékařská chemie a biochemie, Avicenum, Praha (1991)
9. Menn, J.J.: Environ. Health Perspect., 27:113 (1978)
10. Večerková, J.: Biotransformace léčiv a její význam pro toxikologickou praxi, skriptum 1. LFUK, Karolinum, Praha (1997)
11. Marešová, L.: Diplomová práce, PřF UK, Praha (1992)
12. Stiborová, M.: Chem. Listy, 96:10 (2002)
13. Grimm, E., Neumann, S., Jacob, F.: Biochem. Physiol. Pflanzen, 180:383 (1985)
14. Neumann, S., Grimm, E., Jacob, F.: Biochem. Physiol. Pflanzen, 180:257 (1985)
15. Mikšanová, M.: Diplomová práce, PřF UK, Praha (1999)
16. Tomalis, L., Aitio, A., Wilbourn, J., Shuker, L.: Jpn. J. Cancer Res., 80:795 (1989)
17. Stiborová, M., Frei, E., Breuer, A., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: Mutat. Res., 493:153 (2001)
18. Stiborová, M., Frei, E., Sopko, B., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: Carcinogenesis, 23:617 (2002)
19. Stiborová, M., Frei, E., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: Chem. Res. Toxicol., 14:1128 (2001)
20. Stiborová, M., Hájek, M., Frei, E., Schmeiser, H.H.: Gen. Physiol. Biophys., 20:375 (2001)

21. Stiborová, M., Schmeiser, H.H., Frei, E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 63:857 (1997)
22. Howard, P.C., Beland, F.A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 104:727 (1982)
23. Djuric, Z., Fifer, E.K., Yamazoe, Y., Beland, F.A.: *Carcinogenesis*, 9:357 (1988)
24. Coon, M.J.: *Nutr. Rev.*, 36:3198 (1978)
25. Gut, I., Souček, P., Hodek, P.: *Pracovní lékařství*, 1:15 (1992)
26. Stiborová, M.: *Xenobiochemie. Přednáška na PřF UK, Praha, katedra biochemie* (2002)
27. Schacter, B.A., Nelson, E.B., Marver, H.S., Masters, B.S.S.: *J. Biol. Chem.*, 247:3601 (1972)
28. Horecker, B.L.: *J. Biol. Chem.*, 183:593 (1950)
29. Enoch, H.G., Strittmatter, P.: *J. Biol. Chem.*, 254:8976 (1979)
30. Whitlock, J.P.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39:103 (1999)
31. Kasper, C.B.: *J. Biol. Chem.*, 246:577 (1971)
32. Wang, M., Roberts, L.D., Paschke, R., Shea, M.T., Masters, S.S.B., Kim, P.J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:8411 (1997)
33. Nadler, S.G., Strobel, H.W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 261:418 (1988)
34. Tamburini, P.P., Schenkman, J.B.: *Mol. Pharmacol.*, 30:178 (1986)
35. Oprian, D.D., Coon, M.J.: *J. Biol. Chem.*, 257:8935 (1982)
36. Vermilion, J.L., Coon, M.J.: *J. Biol. Chem.*, 253:8812 (1978)
37. Vermilion, J.L., Ballou, D.P., Massey, V., Coon, M.J.: *J. Biol. Chem.*, 256:266 (1981)
38. Fuhr, U. : *Clin Pharmakokinet.* 38:493 (2000)
39. White, R.D., Shea, D., Solow, A.R., Stegman, J.J.: *Biochem. Pharmacol.*, 53:1029 (1997)
40. Makovec, T., Breskvar, K.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 357:310 (1998)
41. Zhang, J., Falany, J.L., Xie, X.W., Falany, C.N.: *Chem. Biol. Interactions*, 124:133 (2000)
42. Hájek, M.: *Diplomová práce, PřF UK, Praha* (2000)
43. Ueng, T.H., Hwang, W.P., Chen, R.M., Wang, H.W., Kuo, M.L., Park, S.S., Guengerich, F.P.: *J. Toxicol. Environ. Health*, 54:509 (1998)

44. O'Leary, K.A., Li, H.C., Ram, P.A., Mcquiddy, P., Waxman, D.J., Kasper, C.B.: *Mol. Pharmacol.*, 1:46 (1997)
45. Ram, P.A., Waxman, D.J.: *J. Biol. Chem.*, 5:3294 (1992)
46. Dee, A., Carlson, G., Smith, C., Masters, B.S., Waterman, M.R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 128:650 (1985)
47. Stiborová, M., Stiborová-Rupertová, M., Bořek-Dohalská, L., Wiessler, M., Frei, E.: *Chem. Res. Toxicol.*, 16:38 (2003)
48. Shen, A.L., Kasper, C.B.: *Handbook of Experimental Pharmacology*, 35 (1993)
49. Reid, T.M., Morton, K.C., Wang, C.Y., King, C.M.: *Environ. Mutagen.*, 6:705 (1984)
50. Coon, M.J., Persoon, A., V.: v knize "Enzymatic Basis of Detoxification I" (Ed. Jakoby, W.B.), Academic Press, New York, str.117 (1980)
51. Heineman, F.S., Ozols, J.: *J. Biol. Chem.*, 258:4195 (1983)
52. Tanugushi, H., Imai, Y., Sato, R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 232:585 (1984)
53. Garfinkel, D.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 77:493 (1958)
54. Klingenberg, M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 75:376 (1958)
55. Omura, T., Sato, R.: *J. Biol. Chem.*, 239:2370 (1964)
56. <http://bioinf.leeds.ac.uk/promise/>
57. Hudeček, J.: Hemoproteiny, přednáška na PřF UK, Praha (1999)
58. Guengerich, F.P., Holladay, L.A.: *Biochemistry*, 18:5442 (1979)
59. Felsted, R.L., En-Yuen Chu, A., Chaykin, S.: *J. Biol. Chem.*, 7:2580 (1973)
60. Benel, J.R., Foureman, C.L.: *Mol. Environ. Res.*, 14:405 (1984)
61. Anari, M.R., Khan, S., Jatoe, S.D., O'Brein, P.J.: *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 22:305 (1997)
62. Dahl, A.R., Hadley, W.M.: *Toxicol. Appl. Pharm.*, 67:200 (1983)
63. Andersson, L.A., Dawson, L.A.: *Structure and Bonding*, 64:1 (1991)
64. Martínek, V.: Diplomová práce, PřF UK, Praha (1999)
65. Coon, M.J., Ding, X., Pernecky, S.J., Vaz, A.D.N.: *Faseb J.*, 6:669 (1992)
66. Ziegler, D.M., Pettit, F.H.: *Biochemistry*, 5:2932 (1966)
67. Kuto, M., Shimizu, S.: *Can. J. Biochem.*, 65:729 (1987)
68. Guengerich, F.P.: v knize *Cytochrom P450* (Ortiz de Montellano, P.R., ed.), Plenum Press, New York, str. 473-535 (1995)

69. Kasper, C.B., Henton, D.C., Foureman, G.L., Curtis, J.F., Hughes, M.F.: v knize *Enzymatic Basis of Detoxication II*. (Ed. Jacoby, W.B.), Academic Press, New York, str. 3 (1980)
70. Lau, P.P., Strobel, H.W.: *J. Biol. Chem.*, 257:5257 (1982)
71. Ortiz de Montellano, P.R.: v knize *Cytochrome P450* (Ed. Ortiz de Montellano, P.R.), Plenum Press, New York, str. 483 (1995)
72. Schwiekl, H., Taylor, J.A., Kitareewan, S., Linko, P., Nagorney, D., Goldstein, J.A.: *Pharmacogenetics*, 3:239 (1993)
73. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: *Chem. Listy*, 93:229 (1999)
74. Stiborová, M.: *Biochemie chemické karcinogeneze, Přednáška na PŘF UK, Praha, Katedra biochemie* (2001)
75. Kaminsky, L.S., Fasco, M.J.: *Crit. Rev. Toxicol.*, 21:407 (1992)
76. Hollenberg, R.F.: *FASEB J.*, 6:686 (1992)
77. Nelson, D.R., Koyamans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Freyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I., Nebert, D.W.: *Pharmacogenetics*, 6:1 (1996)
78. Stiborová, M.: *XXI. Xenobiochemické sympozium, Dolní Věstonice, přednáška* (2001)
79. Stiborová, M.: *Kompartimentace biochemických dějů v praxi. Přednáška na PŘF UK, Praha, katedra biochemie* (2002)
80. Segura-Aguilar, J., Kaiser, R., Lind, C.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1120:33 (1992)
81. Li, R., Bianchet, M.A., Talalay, P., Amzel, L.M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92:8846 (1995)
82. Benson, A.M., Hunkeler, M.J., Talalay, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77:5216 (1980)
83. Lind, C., Vadi, H., Ernster, L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 190:97 (1978)
84. Hajos, K.D., Winston, G.W.: *Carcinogenesis*, 12:697 (1991)
85. Horie, S., Watanabe, T., Ohta, A.: *J. Biochem.*, 92:661 (1982)
86. Huang, M.-T., Miwa, G.T., Cronheim, N., Lu, A.Y.H.: *J. Biol. Chem.*, 254:11223 (1979)
87. Kumar, G.S., Lipman, R., Cummings, J., Tomasz, M.: *Biochemistry*, 36:14128 (1997)

88. Patterson, A.V., Saunders, M.P., Chinje, E.C., Patterson, L.H., Stratford, I.J.: *Anti-Cancer Drug Des.*, 13:541 (1998)
89. Ross, D., Beall, H.D., Siegel, D., Traver, R.D., Gustafson, D.L.: *British j. Cancer*, 74:27 (1996)
90. Schlager, J.K., Powis, G.: *Int. J. Cancer*, 45:403 (1990)
91. Patterson, A.V., McKeown, S.R., Robson, T., Gallagher, R., Raleigh, S.M., Orr, S.: *Anti-Cancer Drug Des.*, 14:473 (1999)
92. Joseph, P., Xie, T., Xu, Y., Jaiswal, A.K.: *Oncol. Res.*, 6:525 (1994)
93. Schulz, W.A., Krummeck, A., Rosinger, I., Eickelmann, P., Neuhaus, Ch., Ebert, T., Schmitz-Drager, B.J., Sies, H.: *Pharmacogenetics*, 7:235 (1997)
94. Chen, H., Luni, A., Seifried, A., Wilkens, L.R., Le Marchand, L.: *Cancer Res.*, 59:3045 (1999)
95. Rosvold, E.A., McGlynn, K.A., Lustbader, E.D., Buetow, K.H.: *Pharmacogenetics*, 5:199 (1995)
96. Robertson, J.A., Chen, H.-C., Nebert, D.W.: *J. Biol. Chem.*, 261:15794 (1986)
97. Montano, M.M., Katzenellenbogen, B.S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 6:2581 (1997)
98. De Long, M.J., Prochaska, H.J., Talalay, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83:787 (1986)
99. Voet, D., Voet, J.G.: *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha, str. 850 (1995)
100. Pritsos, C.A.: *Chem. Biol. Interactions*, 129:195 (2000)
101. Knox, W.E.: *J. Biol. Chem.*, 163:699 (1946)
102. Knox, W.E., Grossman, W.I.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 70:2172 (1948)
103. Romao, M.J., Archer, M., Moura, I., Moura, J.J., LeGall, J., Engh, R., Schneider, M., Hof, P., Huber, R.: *Science*, 270:1170 (1995)
104. Stiborová, M.: *Chem. Listy*, 96:784 (2002)
105. Enya, T., Suzuki, T., Watanabe, T., Hirayama, T., Hisamatsu, Y.: *Environ. Sci. Technol.*, 31:2772 (1997)
106. Adachi, S., Kawanura, K., Takemoto, K., Suzuki, H., Hisamatsu, Y. In: *Relationship between respiratory disease and exposure to air pollution* (Heinrich, U., Dungworth, D.L., Brain, J.D., Droscholl, K.E., Grafstorm, R.C., Harris, C.C., Mohr, U., Eds.) pp. 315-319, ILSI Press, Washington, DC (2000)
107. Phousonghouang, P.T., Grosovsky, A.J., Eastmond, D.A., Covarrubias, M., Arey, J.: *Mutat. Res.*, 472:93 (2000)

108. Lamy, E., Kassie, F., Gminski, R., Schmeiser, H.H., Mersch-Sunderman, V.: *Toxicol. Lett.*, 146:103 (2003)
109. Arlt, V.M., Cole, K.J., Phillips, D.H.: *Mutagenesis*, 19:149 (2004)
110. Enya, T., Kawanishi, M., Suzuki, H., Matsui, S.T., Hisamatsu, Y.: *Chem. Res. Toxicol.*, 11:1460 (1998)
111. Bieler, C.A., Wiessler, M., Erdinhger, L., Suzuki, H., Enya, T., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.*, 439:307 (1999)
112. Bieler, C.A., Arlt, V.M., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Cancer Lett.*, 200:9 (2003)
113. Borlak, J., Hansen, T., Yuan, Z., Sikka, H.C., Kunar, S., Schmidbauer, S., Frank, H., Jacob, J., Seidel, A.: *Polycyclic Aromat. Compds*, 21:73 (2000)
114. Arlt, V.M., Bieler, C.A., Mier, W., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Int. J. Cancer*, 93:450 (2001)
115. Arlt, V.M., Glatt, H.R., Muckel, E., Pabel, U., Sorg, B.L., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H.: *Carcinogenesis*, 23:1937 (2002)
116. Arlt, V.M., Sorg, B.L., Osborne, M., Hewer, A., Seidel, A., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300:107 (2003)
117. Arlt, V.M., Glatt, H.R., Muckel, E., Pabel, U., Sorg, B.L., Seidel, A., Frank, H., Schmeiser, H., H., Phillips, D., H.: *Int. J. Cancer*, 105:583 (2003)
118. Arlt, V.M., Stiborova, M., Hewer, A., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H.: *Cancer Res.*, 63:2752 (2003)
119. Kawanishi, M., Enya, T., Suzuki, H., Takebe, H., Matsui, S., Yagi, T.: *Mutat. Res.*, 470:133 (2000)
120. Seidel, A., Dahman, D., Krekeler, H., Jacob, J.: *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 204:333 (2002)
121. Murahashi, T., Watanabe, T., Otake, S., Hatioti, Y., Takamura, T., Wakabayshi, K., Hirayama, T.: *J. Chromatogr. A* 992, 101 (2003)
122. Murahashi, T., Iwanaga, E., Watanabe, T., Hirayama, T.: *J. Health Sci.*, 49:386 (2003)
123. Watanabe, T., Hasei, T., Yoshifumi, T., Otake, S., Murahashi, T., Takamura, T., Hirayama, T.: *Mutat. Res.*, 538:121 (2003)
124. Wiechelman, K.J., Braun, R.D., Fitzpatrick, J.D.: *Analyt. Biochem.*, 175:231 (1988)

125. Stocasa, G.I., Kuylenstierna, B., Ernster, I., Bergstrand, A.: *J. Cell Biol.*, 32:415 (1967)
126. Stiborová, M., Frei, E., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 125:38 (1999)
127. Laemmli, U.K.: *Nature*, 227:680 (1970)
128. Burke, M.D., Thompson, S., Elcombe, C.R., Halpert, J., Haaparanta, T., Mayer, R.T.: *Biochem. Pharmacol.*, 34:3337 (1985)
129. Brian, W.R., Sari, M.A., Iwasaki, M., Shimada, T., Kaminsky, L.S. a Guengerich, F.P.: *Biochemistry* 29:11280 (1990)
130. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E.: *Cancer Res.*, 62:5678 (2002)
131. Kutnerová, L.: *Diplomová práce, PřF UK, Praha* (2004)
132. Arlt, V.M., Stiborova, M., Henderson, C.J., Osborne, M.R., Bieler, C.A., Frei, E., Martinek, V., Sopko, B., Wolf, C.R., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H.: *Cancer Res.*, 65:2644 (2005)

Souhlasím se zapůjčením této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum výpůjčky	Poznámka