

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Autoreferát dizertační práce

**STUDIUM ÚLOHY BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ
V CHEMICKÉ KARCINOGENEZI**

Mgr. Eliška Kondrová

2008

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor, předseda oborové rady: Preventivní medicína,
Doc. MUDr. Alexandr Martin Čelko, CSc.

Školící pracoviště: Státní zdravotní ústav, Praha

Autor: Mgr. Eliška Kondrová

Školitel: RNDr. Pavel Souček, CSc.

Oponenti: Doc. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.
PharmDr. Jana Vobořilová, Ph.D.
RNDr. Lucie Dohalská, Ph.D.

Autoreferát byl rozeslán dne

Obhajoba se koná dne 24. června 2008 na 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy

S dizertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty
Univerzity Karlovy

OBSAH

Souhrn	1
Abstract	2
1. ÚVOD	3
1.1 Biotransformace a biotransformační enzymy	3
1.2 Metody studia biotransformace	4
1.3 Toxicita chinonů	6
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	8
3. MATERIÁL A METODIKA	9
4. VÝSLEDKY	10
4.1 Stanovení destrukce cytochromů P450 v bakteriálních membránových systémech.....	10
4.2 Stanovení destrukce cytochromů P450 a vzniku oxidativního stresu vlivem působení metabolitů benzenu v jaterních mikrosomech miniprasat.....	10
4.3 Destrukce cytochromů P450 a vznik oxidativního stresu vlivem působení doxorubicinu v jaterních mikrosomech miniprasat, jeho ovlivnění fenolickými antioxidanty.....	13
5. DISKUZE.....	16
6. ZÁVĚRY	20
7. POUŽITÁ LITERATURA	21
8. SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA.....	24

Souhrn

Biotransformační studie *in vitro* jsou nezbytnou součástí toxikologického výzkumu i vývoje nových léčiv, neboť umožňují významnou měrou snížit počet testů na lidských dobrovolnících a poskytují detailnější informace o metabolismu studované látky. Díky limitované dostupnosti lidské jaterní tkáně je pro studium interakcí biotransformačních enzymů s xenobiotiky třeba využívat alternativní modelové systémy a modelové zvířecí druhy. Vzhledem k tomu, že u nejběžnějšího laboratorního druhu, potkana, nejsou přítomny aktivity nejvýznamnějších lidských biotransformačních enzymů, velmi přínosné mohou být informace získané s použitím miniprasat jako modelového druhu.

Rekombinantní lidské biotransformační enzymy exprimované v bakteriálních buňkách mohou být použity ke studiu biotransformace ve formě izolovaných bakteriálních membrán. Tyto systémy poskytují informace o metabolismu studované látky definovaným enzymem, jejich výhodou oproti izolovaným enzymům je přitom nízká cena a snadnější a rychlejší příprava s menšími ztrátami enzymové aktivity během izolace.

Mezi reaktivní metabolity benzenu zodpovědné za jeho toxické účinky patří 1,4-hydrochinon a jeho oxidovaná forma 1,4-benzochinon, přičemž za jejich možné mechanismy účinku je považováno jak kovalentní tak i oxidativní poškození DNA a proteinů. Strukturální motiv chinonu je obsažen i v molekule anthracyklinového cytostatika doxorubicinu (DOX) a při vzniku nežádoucích účinků DOX se rovněž negativně uplatňují oxidativní mechanismy.

Cílem práce bylo:

- 1) Připravit modelový systém s lidskými biotransformačními enzymy exprimovanými v bakteriálních membránách a porovnat vlastnosti tohoto systému s jaterními mikrosomy pokusných miniprasat. Zhodnotit možné využití těchto dvou systémů pro testování interakcí látek se strukturálním motivem chinonů s biotransformačními enzymy.
- 2) Popsat molekulární mechanismus dříve pozorovaných toxických následků interakcí jednoduchých chinonů s biotransformačními enzymy.
- 3) Popsat možnosti použití jaterních mikrosomů miniprasat jako modelového systému k testování nežádoucích účinků anthracyklinů.

Závěry:

- 1) Lidské cytochromy P450 exprimované v bakteriích *Escherichia coli* a izolované jako bakteriální membrány představují užitečný nástroj pro studium metabolismu xenobiotik exprimovaným enzymem, ale nejsou příliš vhodné pro studium oxidativního stresu a destruktivního působení xenobiotik na cytochromy P450.
- 2) Experimenty s miniprasečími mikrosomy ukázaly, že mechanismy buněčné toxicity hydrochinonu (produkce hydroxylových radikálů) a benzochinonu (kovalentní vazba na makromolekuly) se u miniprasat a lidí neliší. Navrhujeme proto jaterní mikrosomy miniprasat jako vhodný *in vitro* modelový systém pro testování oxidativního stresu a molekulární toxicity indukované látkami obsahujícími ve své struktuře chinon. Výhodou tohoto systému je poměrně časově nenáročná příprava a lepší dostupnost v porovnání se systémy používajícími modelové buněčné linie nebo primokultury.
- 3) Při interakci miniprasečích mikrosomů s doxorubicinem docházelo k aktivaci doxorubicinu s následnou zvýšenou tvorbou hydroxylových radikálů. Za aktivaci doxorubicinu byla pravděpodobně zodpovědná NADPH:cytochrom P450 reduktáza.

Studie vlivu polyfenolů na toxicitu doxorubicinu v systému s jaterními mikrosomy miniprasat ukázala, že tento modelový systém umožňuje jejich interakce s doxorubicinem studovat a mohl by sloužit pro účely primárního screeningu biologických, zejména antioxidačních, vlastností těchto látek. Jako vhodné kandidáty pro další studie se zdají být fisetin, kaempferol a myricetin

Abstract

In vitro biotransformation studies are an integral part of both toxicological research and drug development. They allow for a significant reduction of tests on human volunteers and provide detailed information about the metabolism of a given compound. Due to limited availability of human liver tissue, it is necessary to make use of alternative model systems and model animal species in the study of the interactions between biotransformation enzymes and xenobiotics. Since the activities of the most important human biotransformation enzymes are absent in the most commonly used laboratory species, rat, information gained in experiments with minipigs is very valuable.

Recombinant human biotransformation enzymes expressed in bacteria can be used in biotransformation studies in the form of isolated bacterial membranes. These model systems provide information about the metabolism of a given xenobiotic by a defined enzyme and their advantages compared to purified enzymes include low cost and quicker and easier preparation with lower loss of enzymatic activity during isolation.

Reactive metabolites of benzene responsible for its toxic properties include 1,4-benzoquinone and 1,4-hydroquinone. Their proposed mechanisms of action are both covalent and oxidative damage to DNA and proteins. The lead anthracycline cytostatic drug, doxorubicin, also contains a quinone structure in its molecule and oxidative mechanisms also play a negative role in the side effects of doxorubicin therapy.

The aims of this study were:

- 1) To prepare a model system with recombinant human biotransformation enzymes expressed in bacterial membranes and to compare the properties of this system with minipig liver microsomes. To assess the usefulness of these two systems for the study of the interactions of compounds containing quinone in their structure with biotransformation enzymes.
- 2) To explore the molecular mechanisms of the toxic outcomes of the interaction between simple quinones and biotransformation enzymes.
- 3) To assess the possibilities of the use of minipig liver microsomes as a model system for the testing of the side effects of anthracyclines.

Conclusions:

- 1) Human cytochromes P450 expressed in *Escherichia coli* and isolated as bacterial membranes represent a useful tool for the study of xenobiotic metabolism but they are not suitable for the study of oxidative stress formation and the destructive effect of xenobiotics on cytochromes P450.
- 2) The experiments with minipig liver microsomes have shown that the mechanisms of cellular toxicity of hydroquinone (the production of oxygen radicals) and benzoquinone (covalent binding to macromolecules) do not differ in humans and minipigs. We therefore propose minipig liver microsomes as a suitable *in vitro* model system for the study of oxidative stress and molecular toxicity induced by compounds containing quinone in their structure.
- 3) In the presence of minipig liver microsomes, doxorubicin was reduced to its semiquinone and consequently stimulated the production of hydroxyl radicals. The enzyme responsible for the reduction of doxorubicin was presumably NADPH:cytochrome P450 reductase.

The study of the influence of flavonoids on the toxicity of doxorubicin in minipig liver microsomes has shown that this model system allows the testing of these interactions and it could be used in primary screening of potentially beneficial substances, especially antioxidants. Fisetin, kaempferol and myricetin are proposed as suitable candidates for further testing.

1. Úvod

1.1 Biotransformace a biotransformační enzymy

Biotransformace je proces přeměny cizorodých látek neboli xenobiotik v živém organismu napomáhající jejich eliminaci [1]. se nazývají xenobiotika [1] a mohou být přírodního nebo syntetického původu. Xenobiotika vstupující do organismu mohou být vyloučena v nezměněné formě, mohou projít neenzymatickou přeměnou anebo mohou být metabolizována, tj. přeměněna enzymaticky. Metabolizovány jsou především látky, které by díky vysoké lipofilitě nemohly být z organismu vyloučeny. Biotransformační reakce tedy zpravidla směřují ke snížení lipofility xenobiotik.

Biotransformační enzymy se vyvinuly pravděpodobně na ochranu organismů před xenobiotiky přírodního, např. rostlinného původu a vyznačují se některými vlastnostmi, které je odlišují od enzymů endogenního metabolismu. Jedná se zejména o nízkou substrátovou specifitu a dokonce i nízkou specifitu produktu (tj. možnost katalýzy různých reakcí jedním enzymem).

Důsledky biotransformačních reakcí pro účinky xenobiotika na organismus mohou být rozmanité, v nejjednodušším případě, kdy z jednoho xenobiotika vzniká jeden metabolit, existují čtyři možnosti:

- 1) ani xenobiotikum ani metabolit nejsou biologicky aktivní
- 2) pouze xenobiotikum je biologicky aktivní
- 3) xenobiotikum i metabolit jsou biologicky aktivní
- 4) za biologickou aktivitu je zodpovědný výhradně metabolit

Biologickou aktivitou se přitom rozumí žádoucí i nežádoucí účinky, případně toxicita. Biotransformační reakce tedy mohou mít charakter aktivační nebo deaktivující, toxikační nebo detoxikační. Aktivita metabolitu se přitom může výrazně kvalitativně i kvantitativně lišit od aktivity původního xenobiotika. Studium biotransformace je proto významnou součástí farmakologického i toxikologického výzkumu a vývoje nových léčiv.

Za nejvýznamnější nadrodinu biotransformačních enzymů první fáze biotransformace jsou považovány hemthiolátové enzymy cytochromy P450 (P450, E.C. 1.14.14.1, [2]), které jsou terminálními oxidasami tzv. mikrosomálního monooxygenasového systému. Základními složkami tohoto systému jsou flavinový enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR, E.C. 1.6.2.4.), P450 a membránové lipidy. Subcelulárně je MFO systém lokalizován převážně v membráně endoplazmatického retikula (v tzv. mikrosomální frakci) v orgánech exponovaných xenobiotikům (játra, plíce, ledviny, gastrointestinální trakt).

Systematická nomenklatura P450 je založena na shodě aminokyselinových sekvencí. P450 se dělí na rodiny označované číselně (sekvenční homologie >40%) a na podrodiny značené písmeny (sekvenční homologie >60%) [3]. Jednotlivé enzymy náležící do podrodin mají opět číselné označení, příkladem výsledného pojmenování enzymu tedy může být 2E1, 3A4 apod.

Jako monooxygenasy se označují enzymy katalyzující zpravidla oxidace, při kterých je do molekuly substrátu zaveden jeden atom kyslíku, nejčastěji ve formě hydroxylové skupiny. Monooxygenasová reakce je také nejtypičtější reakcí katalyzovanou P450. V průběhu reakce dochází k aktivaci molekulárního kyslíku postupně dvěma elektrony, jejichž donorem je CPR. Jeden atom kyslíku je potom zabudován do molekuly substrátu a druhý je redukován na vodu.

Kromě monooxygenasové aktivity mohou P450 působit i jinými mechanismy. Jsou schopny katalyzovat některé redukční reakce, pokud elektrony poskytnuté CPR nejsou využity k aktivaci kyslíku, ale redukují přímo substrát [4]. P450 mohou také produkovat peroxid vodíku a jiné reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species - ROS) a to při interakci se substrátem, který má sice afinitu k danému P450, ale obtížně se hydroxyluje. V tom případě dojde k aktivaci kyslíku, ale už ne k jeho zabudování do molekuly substrátu a aktivní forma kyslíku je uvolněna

do okolí. Některé P450 generují ROS díky své NADPH – oxidasové aktivitě i v nepřítomnosti substrátu [5].

CPR je membránový enzym katalyzující přenos elektronů z NADPH na P450 [6], [7]. CPR funguje jako dělič elektronového páru na základě stabilizace semichinonových forem flavinů FAD a FMN (tj. forem redukováných jedním elektronem) [7]. CPR může být celkem redukována čtyřmi elektrony, během katalytického cyklu se fyziologicky pohybuje mezi stavy, kdy je redukována jedním až třemi elektrony [8].

1.2 Metody studia biotransformace

Biotransformační studie *in vitro* jsou nezbytnou součástí toxikologického výzkumu i vývoje nových léčiv, neboť umožňují významnou měrou snížit počet testů na lidských dobrovolnících a poskytují detailnější informace o metabolismu studované látky. Podle složitosti systému rozlišujeme následující *in vitro* systémy pro studium biotransformace:

Purifikované enzymy a rekonstituované systémy

Jednotlivé biotransformační enzymy mohou být izolovány z tkání zvoleného modelového laboratorního zvířete nebo lidského materiálu nebo mohou být k purifikaci použity rekombinantní lidské enzymy exprimované v mikroorganismech, např. v bakteriích *Escherichia coli*. V případě P450 musí mít funkční rekonstituovaný systém tři složky: P450, CPR a fosfolipidovou frakci.

Použití purifikovaných enzymů při studiu metabolismu umožňuje získání detailních informací o vlastnostech daného enzymu při interakci se studovanou látkou a o jejích metabolitech tvořených tímto enzymem.

Membránové frakce obsahující lidské rekombinantní enzymy

Rekombinantní lidské biotransformační enzymy exprimované v bakteriálních buňkách mohou být použity ke studiu biotransformace také ve formě izolovaných bakteriálních membrán, enzymy exprimované v eukaryotických (např. hmyzích) buňkách potom ve formě mikrosomů (viz dále). Například membrány *E. coli* představují poměrně levný a dobře reprodukovatelný systém pro expresi lidských P450, přičemž tyto enzymy si zachovávají katalytické kinetické parametry i inhibiční vlastnosti srovnatelné s lidskými jaterními mikrosomy při použití jednotlivých enzymů i jejich směsí [9].

Stejně jako u purifikovaných enzymů tyto systémy poskytují informace o metabolismu studované látky definovaným enzymem, jejich výhodou je přitom snadnější a rychlejší příprava s menšími ztrátami enzymové aktivity během izolace. Lze je také využít pro studium vlivu polymorfismu P450 na jejich aktivitu (komerčně dostupné je např. stanovení genotypu P450 2C9 – [10]) nebo pro studium lékových interakcí podmíněných daným P450. Nevýhodou membránových systémů mohou být příměsi nedefinovaných hostitelských (např. bakteriálních či hmyzích) enzymů. Nejedná se však zpravidla o enzymy metabolizující xenobiotika, projeví se proto jen při studiu určitých typů reakcí.

Jaterní mikrosomy

Mikrosomy jsou fragmenty endoplazmatického retikula získané z dané tkáně homogenizací a diferenční centrifugací [11], [12]. Vzhledem k obsahu biotransformačních enzymů a významu jater při metabolismu cizorodých látek se pro studium biotransformace většinou používají jaterní mikrosomy.

Mikrosomy mohou pomoci identifikovat metabolity studované látky tvořené širokým spektrem jaterních enzymů. S použitím mikrosomů lze studovat i kinetiku metabolismu nebo inhibici biotransformačních enzymů daným xenobiotikem [13]. Mikrosomy poskytují spíše kvalitativní než kvantitativní odhad metabolismu látky v organismu, protože jsou oproti jaterní tkáni obohaceny o biotransformační enzymy, koncentrace a dostupnost substrátu se mohou lišit od

situace *in vivo* a není přítomná kompetice s jinými enzymy [10], [13]. Další nevýhodou lidských jaterních mikrosomů může být vysoká interindividuální variabilita obsahu a aktivity jednotlivých P450, jindy mohou být lidské jaterní mikrosomy naopak využity ke studiu této variability [10], [13]. Pro získání reprezentativního vzorku lidských mikrosomů je třeba použít tkáň od více než dvaceti dárců [13], což může v praxi představovat problém. V neposlední řadě je tedy nevýhodou použití lidských jaterních mikrosomů jejich horší dostupnost pro většinu laboratoří.

Cytosolická frakce

Při izolaci mikrosomů lze získat také cytosolickou frakci buněk dané tkáně. Jaterní cytosolická frakce obsahuje rozpustné enzymy, mezi které patří enzymy účastnící se první i druhé fáze biotransformace.

S9 frakce

Jaterní S9 frakce obsahuje enzymy první i druhé fáze biotransformace, umožňuje následné působení mikrosomálních i cytosolických enzymů a tím získání kompletnější představy o metabolickém profilu studované látky. Nevýhodou používání S9 frakce pro studium biotransformace je celkově nižší enzymatická aktivita [10], [13].

Primární hepatocyty

Výsledky získané s použitím lidských primárních hepatocytů velmi dobře korelují se situací *in vivo*. Primární hepatocyty jsou však použitelné pro experimenty pouze po dobu několika hodin, což velmi snižuje jejich dostupnost. Po delší dobu je lze uchovávat ve zmrazeném stavu.

Kultura hepatocytů

Výhodou hepatocytů v kultuře je jejich použitelnost po delší dobu. Po několik dní si hepatocyty v kultuře zachovávají i funkční regulační mechanismy umožňující např. sledovat snížení nebo zvýšení aktivity biotransformačních enzymů vlivem xenobiotik [13]. Nevýhodou systému je postupná ztráta vlastností specifických pro jaterní tkáň, např. exprese P450.

Nevýhodou použití obou zmíněných typů hepatocytů může být absence jiných typů jaterních buněk, obtížná a časově náročná izolace často spojená s poškozením určitého procenta hepatocytů a také již zmíněná interindividuální variabilita v obsahu a aktivitě biotransformačních enzymů.

Jaterní buněčné linie

Lidské jaterní buněčné linie jsou obvykle odvozeny od primárních tumorů jaterního parenchymu. Jejich výhodou oproti primárním hepatocytům je snadnější kultivace, vzhledem k méně diferencovanému charakteru buněk a nízké expresi enzymů první i druhé fáze biotransformace však patří k méně používaným modelovým *in vitro* systémům [10].

Transgenní buněčné linie

Tento systém lze využít k preparativním účelům pro stanovení struktury metabolitů nebo např. k posouzení potenciálních lékových interakcí na metabolické úrovni [13]. Nevýhodou tohoto systému je jeho vysoká cena.

Jaterní řezy

Tento model umožňuje posoudit vliv vzájemných mezibuněčných interakcí a zachovává i transportní mechanismy pro xenobiotika. Také je možné sledovat indukci biotransformačních enzymů vlivem xenobiotik, přičemž obsah P450 se s časem snižuje méně výrazně než v případě hepatocytů [13]. Nevýhodou je omezený průnik média do nitra řezu a snížená dostupnost substrátu pro biotransformační enzymy. Další nevýhodou je nemožnost uchovávání ve zmrazeném stavu a nedostupnost jaterních řezů za komerčních podmínek [10].

Perfundovaná játra

Izolovaná perfundovaná játra jsou považována za nejuvěrnější napodobení situace *in vivo*, jejich použití jako *in vitro* modelu má však řadu nevýhod. Hlavním omezením je nedostupnost lidských jater pro tento typ experimentu, dále nízká reprodukovatelnost výsledků, omezená životnost jater a náročnost provedení experimentů. Perfundovaná játra zvířecích modelů se proto používají zejména v případech, kdy je vyžadován sběr a analýza žluči [10].

Je zřejmé, že každý model pro studium metabolismu xenobiotik *in vitro* má výhody i nevýhody a jeho výběr je třeba zvážit s ohledem na konkrétní studovaný problém. Obecně se pro odhad metabolismu cizorodých látek u člověka upřednostňují systémy využívající lidské biotransformační enzymy, neboť existují značné mezidruhové rozdíly v obsahu jednotlivých P450, jejich aktivitě i regulaci [14]. Vzhledem k nízké dostupnosti lidské jaterní tkáně se jedná většinou o rekombinantní enzymy. Pro studium dalších dopadů interakce xenobiotik s biotransformačními enzymy, např. pro studium tvorby oxidativního stresu, je naopak vhodné výsledky získané na lidských rekombinantních enzymech porovnat také s použitím „nativních“ systémů, tedy systémů obsahujících biotransformační enzymy společně s dalšími enzymy endogenního metabolismu a simulujících tak lépe situaci *in vivo*. V těchto případech se jedná většinou o tkáň či subcelulární frakce získané z vhodných zvířecích modelů.

V jaterních mikrosomech miniprasat byly nalezeny cytochromy P450 s aktivitami odpovídajícími nejdůležitějším lidským P450 [15], [16]. Ve srovnání s nejpoužívanějším modelovým zvířecím druhem, potkanem, je zejména významný miniprasečí P450 3A29, který odpovídá aktivitou a indukčními vlastnostmi lidskému P450 3A4. Dále byly v jaterních mikrosomech miniprasat nalezeny aktivity typické pro lidské P450 2A6, 2D6, 2E1 a 2C9 [16]. Miniprasata jsou proto navrhována jako vhodnější zvířecí model pro studium lidské biotransformace než například běžně používaný potkan.

1.3 Toxicita chinonů

Reaktivní metabolity benzenu

Chronická expozice benzenu má za následek zvýšené riziko závažných poruch krvetvorby jako jsou např. aplastická anémie nebo akutní myeloidní leukémie [17], [18]. Klíčová role v toxicitě benzenu je připisována jeho metabolismu [18], [19]. Mezi reaktivní metabolity benzenu zodpovědné za jeho toxické účinky patří 1,4-hydrochinon (HQ) a jeho oxidovaná forma 1,4-benzochinon (BQ). U benzenu i jeho reaktivních metabolitů HQ a BQ byly pozorovány také negativní účinky na cytochromy P450 [20], [21]. Destrukce cytochromů P450 vlivem HQ a BQ může mít následky pro organismus, neboť *in vivo* ovlivňuje toxicitu a účinky xenobiotik. Dále může být poškození cytochromů P450 v závislosti na mechanismu také považováno za obecný marker poškození bílkovin vlivem metabolitů benzenu. Jedním z cílů předkládané práce bylo tento mechanismus popsat a případně zobecnit.

Jelikož lidské a potkanní jaterní cytochromy P450 jsou rozdílně citlivé vůči toxickému působení metabolitů benzenu i vůči působení oxidativního stresu [21], potkan není vhodným modelovým druhem pro studium těchto interakcí. Lidská jaterní tkáň je ale pro mnoho laboratoří jen omezeně dostupná a je tedy třeba hledat vhodný modelový systém pro studium úlohy biotransformačních enzymů v toxicitě metabolitů benzenu a chinonů obecně. V rámci této práce byly použity dva *in vitro* přístupy, a to využití rekombinantních lidských cytochromů P450 v bakteriálních membránách a experimenty s využitím jaterních mikrosomů miniprasat.

Anthracykliny

Anthracykliny patří mezi nejúčinnější a nejpoužívanější cytostatika v terapii solidních nádorů i leukémií [22], [23]. Vůdčí molekulou této skupiny látek je cytostatikum doxorubicin (DOX).

Nejzávažnějším nežádoucím účinkem anthracyklinových cytostatik, limitujícím jejich terapeutické dávky, je jejich akutní a chronická kardiotoxicita. Klinickým nálezem jsou arytmie a kongestivní srdeční selhání [24], [23]. Za možné příčiny kardiotoxicity DOX je považována řada mechanismů včetně ovlivnění homeostázy železa, produkce ROS a apoptózy [23], [25], [26], přičemž klinický obraz je pravděpodobně výsledkem komplexních interakcí všech těchto procesů. Většina autorů se však shoduje, že produkce ROS by mohla být spouštěcím mechanismem vedoucím k ostatním zmiňovaným změnám, a to zejména v akutní fázi kardiotoxicity [23].

Iničiační reakcí pro produkci ROS je jednoelektronová redukce DOX na odpovídající semichinonový radikál (SQ). Dalším krokem je aktivace molekulárního kyslíku reakcí se SQ za tvorby superoxidového radikálu a následně peroxidu vodíku a hydroxylových radikálů [26], [27]. Zvýšená tvorba těchto ROS v přítomnosti DOX může mít za následek poškození buněčných makromolekul (např. mitochondriální DNA – [28]), iniciaci peroxidace lipidů nebo zvýšené uvolňování železa z ferritinu a ovlivnění homeostázy železa [23] a je tak významným mechanismem toxicity DOX.

V lidské potravě je obsaženo široké spektrum polyfenolických látek rostlinného původu s antioxidačními vlastnostmi. Pravděpodobně nejpočetnější strukturální skupinou mezi nimi jsou flavonoidy. Mezi popisované účinky flavonoidů v organismu patří antioxidační, antivirotické, antikarcinogenní nebo protizánětlivé účinky [29]. Mnohé flavonoidy jsou chelátory železa, což spolu s jejich antioxidačním působením předurčuje tyto látky jako látky potenciálně příznivé pro zmírnění nežádoucích účinků anthracyklinových cytostatik.

S cílem vystupňovat příznivé účinky přirozených flavonoidů jsou syntetizovány a v různých modelech testovány jejich strukturálně příbuzné analogy. Tyto látky patří do různých tříd flavonoidů a dělí se na aurony, chalkony, flavony, flavonoly, chromony a isoflavony. V rámci této práce byl testován syntetický analog flavonoidů 4-hydroxy-6-methoxyauron.

2. Hypotézy a cíle práce

Cílem práce bylo:

- 1) Připravit modelový systém s lidským biotransformačními enzymy exprimovanými v bakteriálních membránách a porovnat vlastnosti tohoto systému s jaterními mikrosomy pokusných miniprasat. Zhodnotit možné využití těchto dvou systémů pro testování interakcí chinonů s biotransformačními enzymy. Dílčím cílem bylo také porovnat odolnost jednotlivých enzymů P450 vůči působení modelových xenobiotik (metabolity benzenu).
- 2) Popsat molekulární mechanismus možných toxických následků interakcí jednoduchých chinonů s biotransformačními enzymy.
- 3) Popsat možnosti použití jaterních mikrosomů miniprasat jako modelového systému k testování nežádoucích účinků anthracyklinů

3. Materiál a metodika

Materiál

Všechny použité chemikálie byly v analytické kvalitě. K přípravě všech roztoků byla použita ultračistá voda.

Použité biologické materiály zahrnovaly buňky *Escherichia coli* DH5 α získané od firmy Life Technologies Ltd., plasmidy pro expresi lidských rekombinantních P450 a CPR získané darem od F. P. Guengeriche (Center in Molecular Toxicology, Vanderbilt University, Nashville, TN) a E. M. J. Gillam (Department of Pharmacology and Physiology, University of Queensland, Brisbane, Australia) a purifikované lidské P450 2E1 a 3A4 a polyklonální protilátky proti těmto P450 získané také jako dar od F. P. Guengeriche.

V experimentech byla použita jaterní tkáň dvou samců brněnské bílé variety Goettingenských miniprasat odchovaných ve Výzkumném ústavu veterinární medicíny v Brně, ČR.

Metodika

Lidské P450 a CPR byly exprimovány v bakteriích *E. coli* již popsanou a zavedenou metodikou podle [30] a [31] a byly izolovány v bakteriálních membránách.

Jaterní mikrosomy miniprasat byly připraveny diferencíální centrifugací podle [12].

Stabilita P450 exprimovaných v bakteriálních membránách po inkubaci pouze v pufru anebo s přídatkem 0,5 mM NADPH byla stanovena spektrofotometricky po redukci CO podle [32]. Dále byla u vybraných P450 v membránách stejnou metodou stanovena destrukce CYP vlivem reaktivních metabolitů benzenu BQ a HQ.

Obdobná série spektrofotometrických stanovení destrukce P450 byla potom provedena u vzorků jaterních mikrosomů miniprasat, kde byl rovněž zjišťován vliv NADPH a reaktivních metabolitů benzenu na obsah P450. V jaterních mikrosomech miniprasat byl navíc také stanoven vliv reaktivních metabolitů benzenu na aktivity jednotlivých P450 pomocí stanovení 6-hydroxylace markerového substrátu chlorzoxazonu (P450 2E) a 6 β -hydroxylace testosteronu (P450 3A). Hladiny apoproteinu těchto P450 byla stanovena pomocí imunoblotingu.

Pro objasnění mechanismu toxických účinků reaktivních metabolitů benzenu byla dále pomocí elektronové spinové rezonance (ESR) sledována tvorba hydroxylových radikálů v systému jaterních mikrosomů miniprasat s NADPH a BQ nebo HQ.

Stanovení destrukce P450 v jaterních mikrosomech miniprasat vlivem DOX bylo stanoveno obdobně jako u vzorků s metabolity benzenu – spektrofotometricky byl stanoven obsah celkového P450, aktivity P450 2E a 3A byly stanoveny pomocí hydroxylace markerových substrátů a obsah apoproteinu byl stanoven pomocí imunoblotingu.

Metodou ESR byly sledovány tři typy volných radikálů vznikajících při interakci DOX s biologickými materiály obsahujícími biotransformační enzymy (miniprasečí jaterní mikrosomy, bakteriální membrány obsahující CPR) a NADPH. Sledovanými radikály byly semichinon DOX, superoxidové radikály a hydroxylové radikály. Kvantitativní hodnocení tvorby bylo provedeno u hydroxylových radikálů vznikajících v prostředí miniprasečích jaterních mikrosomů. V tomto systému byl dále otestován vliv vybraných fenolických antioxidantů na tvorbu hydroxylových radikálů.

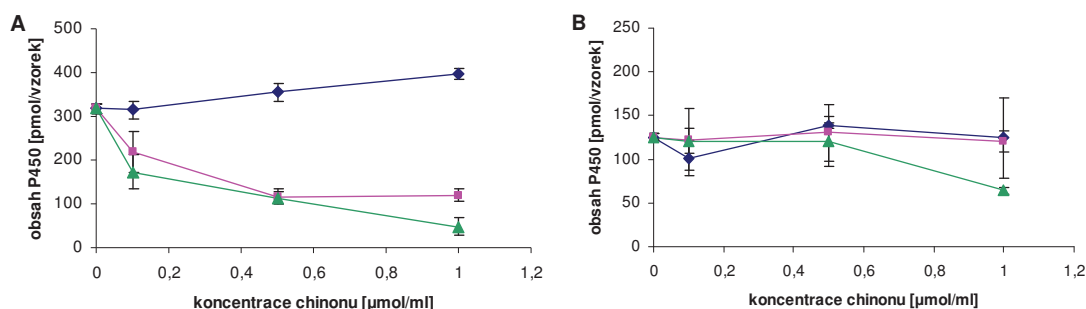
4. Výsledky

4.1 Stanovení destrukce cytochromů P450 v bakteriálních membránových systémech

Jednotlivé P450 exprimované v bakteriálních membránách se velmi lišily svou stabilitou při 60-ti min inkubaci při 37°C v nepřítomnosti i přítomnosti NADPH. Při inkubaci bez NADPH byl nejstabilnější P450 2C9 a ostatní testované enzymy následovaly v pořadí 2A6>2E1>3A4>1A2. Při inkubaci s 0,1 mM NADPH byl nejstabilnější z testovaných enzymů opět P450 2C9. Přítomnost 0,5 mM NADPH, což je koncentrace běžně používaná v pokusech *in vitro*, však již u všech testovaných enzymů způsobila degradaci více než 60 % P450. Vliv NADPH byl nejvýraznější u P450 2A6, kde po inkubaci s 0,5 mM NADPH již nebyl nativní enzym detekován vůbec.

Lidská CPR v bakteriálních membránách bez exprese P450 (monocistronický vektor) byla při inkubaci s 0,5 mM NADPH stabilní.

Nejstabilnější bakteriální systém, P450 2C9-CPR, byl použit ke sledování vlivu metabolitů benzenu na obsah P450 2C9.



Obr. 1 Destrukce lidského P450 2C9 v bakteriálních membránách vlivem metabolitů benzenu

Membrány obsahující P450 2C9-CPR byly inkubovány 60 min s C (♦), HQ (■) nebo BQ (▲) v nepřítomnosti NADPH (A) nebo s 0,5 mM NADPH (B).

HQ i BQ v nepřítomnosti NADPH (Obr. 1A) způsobovaly statisticky významnou destrukci P450 2C9 již v nejnižší testované koncentraci, tj. 0,1 mM ($P=0,0025$ pro BQ, $P=0,0083$ pro HQ), C neměl negativní účinek na obsah P450 2C9. V přítomnosti 0,5 mM NADPH (Obr. 1B) se účinek C, HQ a BQ neprojevil tak výrazně. Významnou destrukci způsobil pouze 1 mM BQ ($P=0,004$). Celkově tedy nebylo možné přispěvek metabolitů benzenu k destrukci P450 2C9 odlišit od účinků samotného NADPH.

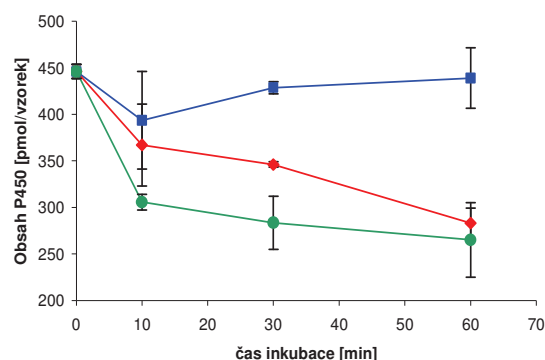
4.2 Stanovení destrukce cytochromů P450 a vzniku oxidativního stresu vlivem působení metabolitů benzenu v jaterních mikrosomech miniprasat

NADPH způsobovalo statisticky významnou destrukci P450 po 60 min inkubace již v nejnižší použité koncentraci, tj. 0,1 mM (Obr. 2, $P<0,001$). 0,5 mM NADPH potom způsobilo významnou destrukci P450 již po 10 min inkubace (Obr. 2, $P=0,048$).

Srovnání destrukčního působení HQ, BQ a C ukazuje, že v inkubacích bez NADPH byl nejúčinnější BQ (Obr. 3A), HQ působil destrukci P450 v závislosti na koncentraci, zatímco nejmenší poškození způsoboval C. V přítomnosti NADPH nebyl účinek testovaných látek významný ve srovnání s účinkem samotného NADPH, ale byla pozorována významně větší destrukce vlivem BQ oproti HQ ($P=0,043$, Obr. 3B).

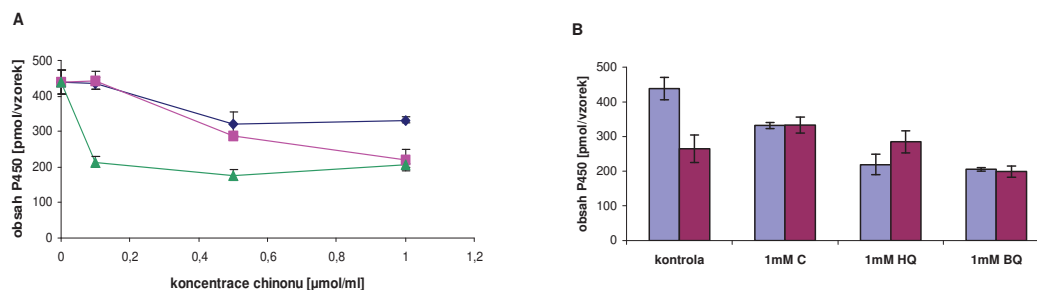
Za účelem studia možných mechanismů destrukce P450 metabolity benzenu bylo provedeno sledování vzájemných přeměn BQ a HQ v prostředí mikrosomů MP1 bez i za přítomnosti NADPH. V inkubacích s BQ přítomnost NADPH velmi podporovala jeho redukci na HQ, redukce však v menší míře probíhala i v nepřítomnosti NADPH. V inkubacích s HQ byla míra oxidace menší, na BQ se přeměnilo maximálně 5-10 % původně inkubovaného HQ.

Studium mechanismu destrukce P450 vlivem metabolitů benzenu dále pokračovalo analýzami poškození enzymatické aktivity a apoproteinu dvou P450, které mají u miniprasat velmi podobné



Obr. 2 Kinetika destrukce P450 v miniprasečích mikrosomech MP1 vlivem NADPH

Mikrosomy MP1 byly inkubovány 10, 30 nebo 60 min bez NADPH (■), s 0,1 mM NADPH (◆) nebo s 0,5 mM NADPH (●).



Obr. 3 Destrukce P450 v miniprasečích mikrosomech MP1 vlivem metabolitů benzenu

(A) Mikrosomy MP1 byly inkubovány 60 min s C (◆), HQ (■) nebo BQ (▲) v nepřítomnosti NADPH. (B) Mikrosomy MP1 byly inkubovány 60 min s 1 mM C, HQ nebo BQ v nepřítomnosti (■) nebo přítomnosti (■) 0,5 mM NADPH.

hladiny a aktivity jako u lidí. Vliv BQ a HQ na aktivity P450 2E a 3A je shrnut v Tab. 1. Inkubace s BQ ukázaly, že aktivita P450 2E byla vůči jeho působení výrazně citlivější než aktivita P450 3A. Aktivita P450 2E byla poškozována velmi rychle již nejnižšími koncentracemi BQ bez ohledu na přítomnost NADPH. HQ v inkubacích bez NADPH ovlivňoval aktivitu P450 2E v závislosti na koncentraci, zatímco aktivita P450 3A zůstala po 60 min inkubace s HQ v koncentracích do 0,5 mM stabilní. V přítomnosti NADPH byla aktivita P450 2E méně ovlivněna než v jeho nepřítomnosti, zatímco aktivita P450 3A byla naopak výrazněji ovlivněna HQ za přítomnosti NADPH.

Množství P450 2E apoproteinu stanovené pomocí imunoblotingu bylo sníženo ve vzorcích inkubovaných s BQ bez NADPH. NADPH ani HQ obsah P450 2E významně neovlivnily. Množství P450 3A apoproteinu bylo rovněž nejvíce sníženo v inkubacích s BQ a to v závislosti na koncentraci BQ. NADPH ani HQ obsah P450 3A významně neovlivnily.

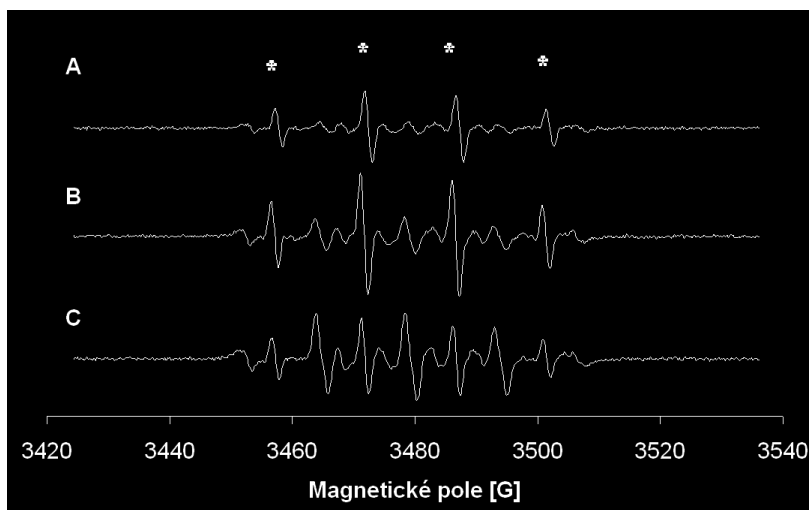
Jako další možný mechanismus destrukce P450 byl sledován vznik hydroxylových radikálů během inkubace mikrosomálních preparátů s metabolity benzenu v koncentracích 0,1 mM – 1 mM. Na Obr. 4 je zobrazeno typické spektrum ESR zaznamenané po inkubaci mikrosomů MP1 s NADPH (A), HQ s NADPH (B) a BQ s NADPH (C). Kvartetová soustava signálů se středem na $g=2,0041$, poměrem intenzit 1:2:2:1 a štěpící konstantou $a_N=a_H=14,71$ G odpovídá aduktu hydroxylových radikálů s DMPO (DMPO- \cdot OH) [33]. Při inkubaci pouze s NADPH byla

Tab.1 Aktivity P450 2E a 3A v mikrosomech MP1 po inkubaci s benzochinonem a

		Koncentrace chinonu	Aktivita P450 2E [pmol/min/nmol P450]		Aktivita P450 3A [pmol/min/nmol P450]	
			10 min	60 min	10 min	60 min
BQ	Bez NADPH	0.1 mM	190 ± 3 *	163 ± 167 *	588 ± 165	87 ± 8 *
		0.5 mM	67 ± 1 *	57 ± 2 *	652 ± 15	116 ± 8 *
		1 mM	160 ± 3 *	16 ± 12 *	759 ± 193	104 ± 2 *
	0.5mM NADPH	0.1 mM	119 ± 45 *	473 ± 124	672 ± 33	137 ± 2 *
		0.5 mM	179 ± 152 *	87 ± 17 *	385 ± 152	167 ± 49 *
		1 mM	128 ± 96 *	136 ± 27 *	217 ± 83 *	189 ± 25 *
HQ	Bez NADPH	0.1 mM	705 ± 71 *	919 ± 89	572 ± 127	730 ± 72
		0.5 mM	688 ± 98 *	49 ± 87 *	548 ± 50	542 ± 135
		1 mM	307 ± 169 *	152 ± 96 *	391 ± 133 *	428 ± 77 *
	0.5mM NADPH	0.1 mM	621 ± 120 *	977 ± 293	487 ± 107	312 ± 110 *
		0.5 mM	615 ± 199 *	714 ± 102 *	449 ± 50 *	243 ± 130 *
		1 mM	650 ± 200	725 ± 27 *	431 ± 117	177 ± 91 *
Neinkubované mikrosomy			974 ± 57		633 ± 23	

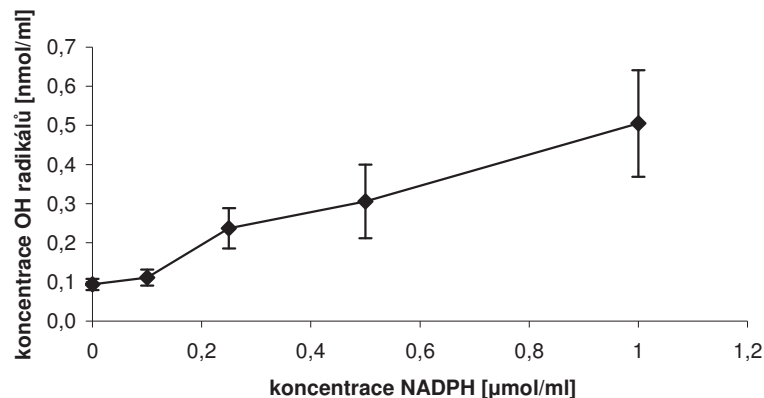
Hodnoty, které se statisticky významně liší od hodnoty neinkubovaných mikrosomů, jsou označeny hvězdičkami

pozorována tvorba hydroxylových radikálů v závislosti na koncentraci NADPH (Obr. 5, $P < 0,001$). HQ stimuloval produkci hydroxylových radikálů v přítomnosti i nepřítomnosti NADPH a byl jedinou testovanou látkou, která měla významný účinek ($P = 0,034$ pro 1 mM HQ). BQ v přítomnosti NADPH neměl statisticky významný vliv na tvorbu hydroxylových radikálů, i když bylo možné pozorovat mírnou stimulaci u 0,1 mM BQ a naopak inhibici při vyšších koncentracích.



Obr. 4 Typická spektra ESR naměřená po inkubaci mikrosomů miniprasečích MP1 s NADPH a metabolity benzenu v přítomnosti DMPO

Mikrosomy MP1 byly inkubovány s 1 mM NADPH (A), 0,5 mM HQ a 0,5 mM NADPH (B) nebo s 0,5 mM BQ a 0,5 mM NADPH (C) v přítomnosti 400 mM DMPO. Signály hydroxylových radikálů jsou označeny hvězdičkami.



Obr. 5 Tvorba hydroxylových radikálů v miniprasečích mikrosomech MP1 vlivem NADPH
Mikrosomy MP1 byly inkubovány s 0, 0,1, 0,25, 0,5 a 1 mM NADPH jak bylo popsáno v kapitole 4.2.

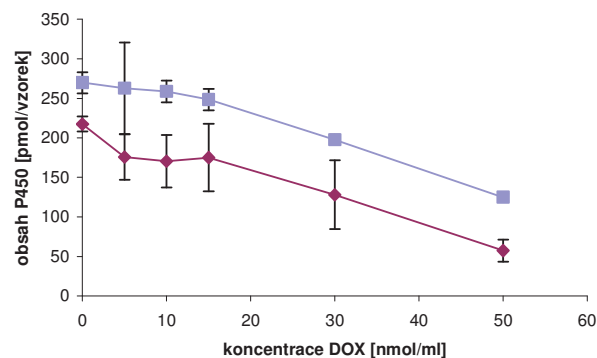
4.3. Destrukce cytochromů P450 a vznik oxidativního stresu vlivem působení doxorubicinu v jaterních mikrosomech miniprasat, jeho ovlivnění fenolickými antioxidanty

Jaterní mikrosomy miniprasete byly dále využity jako modelový systém pro testování nežádoucích účinků klinicky významných látek obsahujících v molekule chinonický motiv. Jako zástupce těchto látek bylo studováno anthracyklinové cytostatikum DOX.

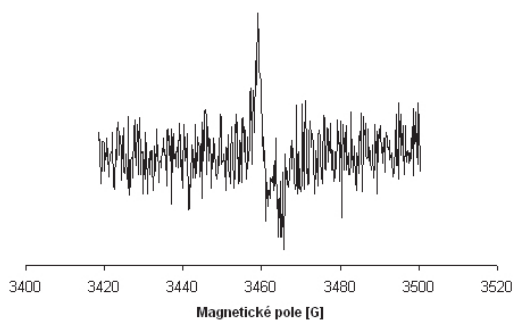
DOX působil statisticky významnou destrukci P450 v přítomnosti ($P=0,0002$) i nepřítomnosti ($P=0,0013$) NADPH (Obr. 6).

Aktivity ani obsah proteinu P450 2E a 3A v mikrosomech MP2 nebyly významně ovlivněny inkubací s DOX v rozmezí koncentrací 5-50 μM v nepřítomnosti ani v přítomnosti NADPH.

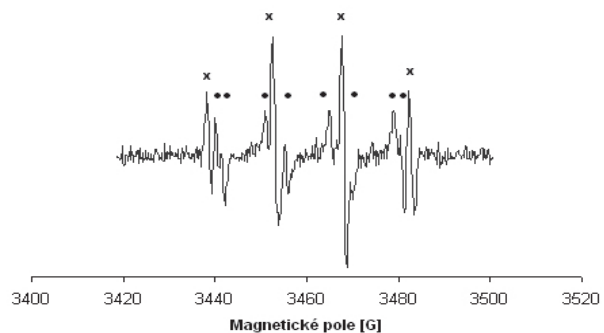
V přítomnosti DOX byla dále sledována tvorba tří typů radikálů – semichinonového radikálu DOX, který je iniciačním krokem tvorby ROS, superoxidových radikálů, které jsou výsledkem přímé reakce semichinonu s molekulárním kyslíkem a tedy prvními vznikajícími kyslíkovými radikály, a hydroxylových radikálů, které jsou konečným reaktivním agens celé této kaskády. Tvorba radikálu semichinonu DOX byla sledována v bakteriálních membránách s obsahem CPR a v jaterních mikrosomech miniprasat za anaerobních podmínek. Nejnižší koncentrace DOX, při které byl semichinon detekován v systému s membránami CPR, DOX a NADPH, byla 300 μM. Spektrum ESR se signálem semichinonu DOX je zobrazeno na Obr. 7. Oproti tomu, již v mnohem nižší koncentraci DOX (30 μM), byl v systému s membránami CPR pozorován vznik spektra složeného z kvartetu náležejícího OH radikálům a spektra superoxidových radikálů (Obr. 8).



Obr. 6 Destrukce P450 v miniprasečích mikrosomech MP2 vlivem doxorubicinu
Mikrosomy MP2 byly inkubovány 60 min s 0, 5, 10, 15, 30 a 50 μM DOX v nepřítomnosti (■) nebo s 0,5 mM NADPH (◆).



Obr. 7 Spektrum ESR se signálem semichinonu DOX
 Membrány obsahující CPR byly inkubovány s 300 μM DOX a 1 mM NADPH v anaerobním prostředí bez DMPO.

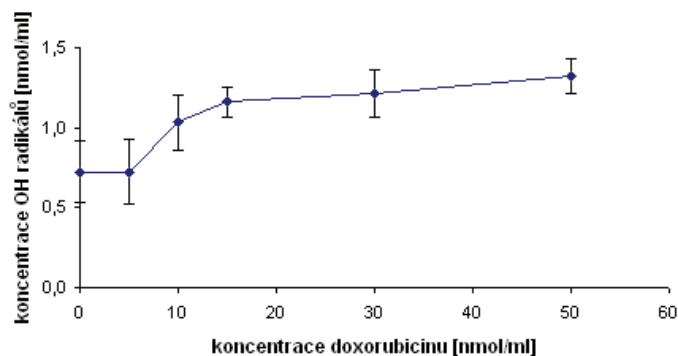


Obr. 8 Spektrum ESR se signály superoxidových a hydroxylových radikálů
 Membrány obsahující CPR byly inkubovány s 30 μM DOX a 0,5 mM NADPH v aerobním prostředí v přítomnosti 400 mM DMPO. Výsledné spektrum je složeno ze signálů OH radikálů (x) a superoxidových radikálů (•).

V systému s mikrosomy MP2, 0,5 mM NADPH a DOX byl detekován pouze kvartet signálů odpovídající aduktu $\text{DMPO}\cdot\text{OH}$. DOX stimuloval tvorbu OH radikálů v závislosti na koncentraci ($P=0,002$, Obr. 9). Ve stejném systému bez NADPH nebyla zaznamenána významná tvorba OH radikálů (výsledky nezobrazeny).

Přírodní a syntetické polyfenoly byly použity ke sledování antioxidační aktivity vůči působení DOX v modelovém systému miniprasečích mikrosomů.

Z testovaných polyfenolických antioxidantů byl významný inhibiční účinek na tvorbu OH radikálů vlivem DOX zaznamenán u fisetinu, kaempferolu a myricetinu v nejvyšší použité koncentraci (100 μM , Tab. 2).



Obr. 9 Tvorba hydroxylových radikálů v miniprasečích mikrosomech MP2 vlivem doxorubicinu

Mikrosomy MP2 byly inkubovány s 0, 5, 10, 15, 30 a 50 μM DOX v přítomnosti 0,5 mM NADPH.

Tab.2 Vliv fenolických antioxidantů na tvorbu hydroxylových radikálů v mikrosomech MP2 s 30μM doxorubicinem a NADPH

Testované antioxidanty	Koncentrace hydroxylových radikálů [nmol/ml]		
	30 μM	50 μM	100 μM
Fisetin	1,28 ± 0,19	1,22 ± 0,01	0,79 ± 0,02*
Kaempferol	1,49 ± 0,19	1,18 ± 0,27	0,79 ± 0,10*
Morin	1,41 ± 0,06	1,18 ± 0,16	1,01 ± 0,19
Kvercetin	1,50 ± 0,18	1,20 ± 0,43	1,09 ± 0,18
Myricetin	1,18 ± 0,08	1,10 ± 0,08	0,64 ± 0,06*
Eriodictyol	1,39 ± 0,06	1,52 ± 0,18	1,32 ± 0,09
4-hydroxy-6-methoxyauron	1,49 ± 0,12	1,27 ± 0,08	1,12 ± 0,24
Kontrola (methanol)	1,33 ± 0,07	1,29 ± 0,18	1,17 ± 0,15

Hodnoty které se statisticky významně liší od kontroly jsou označeny hvězdičkami

5. Diskuze

Jedním z cílů předkládané práce byla příprava stabilního membránového systému pro použití k testování destrukčních účinků xenobiotik na P450 a úlohy oxidativního stresu v tomto působení. Stabilita izolovaných bakteriálních membrán s obsahem pěti významných lidských P450 byla nejprve otestována inkubací při 37 °C bez přídavku NADPH nebo v přítomnosti různých koncentrací NADPH. V tomto systému byly zjištěny velké rozdíly ve stabilitě mezi jednotlivými preparáty P450. Nalezené rozdíly mohly být zapříčiněny odlišnou strukturou vlastních molekul enzymů nebo specifickými a zatím nedefinovanými vlastnostmi membránových preparátů. Pro účely testování destrukčních účinků xenobiotik na P450 však nebyl žádný z výsledných preparátů vhodný, neboť v přítomnosti běžně laboratorně používané koncentrace NADPH (0,5 mM) téměř všechny exprimované P450 (kromě P450 1A2) degradovaly během 60-ti minutové inkubace z více než 70 %.

Výrazná destrukce P450 exprimovaných v membránových systémech během inkubace v přítomnosti NADPH byla pravděpodobně způsobena tzv. cyklem naprázdno bez substrátu (P450 futile cycle), během něhož vznikají ROS a který již byl popsán v podmínkách *in vitro* v přítomnosti NADPH u purifikovaných P450 i v mikrosomech [34], [35]. Důvodem, proč se účinek NADPH projevil výrazněji právě v membránových systémech oproti mikrosomům, může být vyšší poměr CPR : P450, který může být příčinou vyššího hromadění ROS [36], a zároveň nepřítomnost ostatních mikrosomálních enzymů s antioxidační funkcí. Membránové systémy připravené v rámci této práce byly rovněž použity pro studium metabolismu nové generace cytostatických léčiv ze skupiny taxanů [37]. Membrány P450 3A4 po 30 min inkubaci s 1 mM NADPH a substrátem účinně metabolizovaly studované taxany. V přítomnosti substrátu, kdy neprobíhal cyklus naprázdno, byly tedy P450 exprimované v membránových systémech metabolicky aktivní, což se potvrdilo i při testování aktivity vybraných P450 (P450 2E1) pomocí jejich markerových substrátů. Pro studium mechanismu toxického působení metabolitů benzenu, které bylo jedním z hlavních cílů této práce, byl použit nejstabilnější z membránových systémů (P450 2C9). Při inkubaci studovaných látek s membránami obsahujícími P450 2C9 a CPR se projevil výrazný destruktivní účinek BQ a HQ zejména v nepřítomnosti NADPH, což odpovídá dříve sledovanému trendu s potkaními i lidskými mikrosomy [21], [38]. Přítomnost pouze 0,5 mM NADPH měla výraznější vliv na úbytek P450 než přítomnost metabolitů benzenu a i tento výsledek rovněž odpovídal našim zkušenostem s potkaními mikrosomy [38].

Pro další studium účinků metabolitů benzenu byly použity mikrosomy z jater pokusných miniprasat, jejichž podobnost s lidskými jaterními mikrosomy v oblasti hladin a aktivit jednotlivých P450 již byla prokázána [15], [16]. Tyto mikrosomální preparáty jsou z těchto důvodů a především vzhledem k velmi omezené dostupnosti lidských jater doporučovány jako vhodný modelový systém pro studium lidské biotransformace. Rozsah destrukce P450 vlivem NADPH v jaterních mikrosomech miniprasat byl větší než v případě lidských mikrosomů [21], během inkubace v přítomnosti 1 mM NADPH degradovalo 49 % celkového P450. Jaterní P450 miniprasat byly tedy citlivější vůči působení oxidativního stresu generovaného cyklem P450 naprázdno. Předpokládáme, že důvodem tohoto rozdílu může být nižší antioxidační kapacita jaterních mikrosomů miniprasat. Miniprasečí mikrosomy byly však při inkubaci s NADPH významně stabilnější než všechny sledované bakteriální systémy (kde se destrukce jednotlivých P450 pohybovala mezi 60-80 %) a při inkubacích bez NADPH potom nedocházelo ke snížení celkového obsahu P450 prakticky vůbec. Tyto experimenty potvrdily nižší odolnost P450 v bakteriálních membránách vůči oxidativnímu stresu ve srovnání s mikrosomy. Při dalším používání bakteriálních membrán pro studium vlastností P450 je tedy třeba tuto skutečnost respektovat.

Ze studovaných metabolitů benzenu způsoboval BQ nejrozsáhlejší destrukci celkového P450 v mikrosomech inkubovaných bez NADPH i v jeho přítomnosti. Koncentrační závislost jeho působení se podobala i účinkům BQ na P450 2C9 v membránách, kdy bez NADPH došlo k výrazné destrukci již v nejnižší použité koncentraci (0,1 mM), zatímco ve vyšších

koncentracích již nebylo zvýšení destrukce výrazné. I v tomto případě však byly membrány významně citlivější než mikrosomy (téměř totální destrukce vlivem 1 mM BQ v membránách oproti 60 % destrukci v mikrosomech). Destrukční účinek HQ na celkový P450 v mikrosomech byl také méně výrazný než na P450 2C9 v membránách a lišil se i průběhem koncentrační závislosti. V obou systémech platilo, že v přítomnosti NADPH byl destruktivní účinek testovaných chinonů méně výrazný než v jeho nepřítomnosti.

Na základě výsledků této práce se lidské P450 exprimované v membránách *E. coli* a izolované v podobě membrán nezdají být vhodné pro testování destruktivního účinku xenobiotik na P450. Jejich využití pro metabolické studie, zejména pro identifikaci specifického P450 zodpovědného za metabolismus xenobiotik však tímto závěrem není zpochybněno.

Za účelem objasnění mechanismu pozorované destrukce P450 byly provedeny experimenty sledující vzájemné přeměny mezi BQ a HQ v prostředí mikrosomů. Zároveň byl sledován vliv těchto látek na aktivity a hladiny významných P450 a tvorbu markerů oxidativního stresu (hydroxylových radikálů) v jaterních mikrosomech pokusných miniprasat. V rámci této práce byly sledovány aktivity P450 2E a 3A, neboť markerové substráty a aktivity u těchto miniprasecích enzymů odpovídají jejich protějškům u lidí [15]. Pro ostatní z P450 přítomných v lidských játrech a identifikovaných také u miniprasat (např. 1A, 2A, 2C a 2D) markerové substráty a aktivity nekorelují tak dobře.

Úbytek celkového obsahu P450 vlivem samotného NADPH v jaterních mikrosomech miniprasat nekoreloval se snížením aktivit 2E a 3A. Na tomto úbytku se pravděpodobně podílely ve větší míře jiné P450, které byly vůči působení NADPH citlivější a tudíž přispěly k celkovému snížení obsahu P450.

Tvorba hydroxylových radikálů v mikrosomech inkubovaných 10 min s NADPH byla koncentračně závislá a korelovala s destrukcí P450. Časový průběh destrukce P450 naznačuje, že tvorba hydroxylových radikálů může hrát roli v destrukci P450 vlivem NADPH.

Při inkubacích s metabolity benzenu byla tvorba hydroxylových radikálů nejvíce stimulována HQ, zatímco BQ produkoval hydroxylové radikály na srovnatelné úrovni pouze v nízkých koncentracích. Obdobné působení těchto látek bylo již pozorováno při použití potkaních jaterních mikrosomů [39] a podporuje předpoklad, že tvorba ROS hraje roli v toxicitě HQ [40], [41].

Při srovnání účinku BQ na aktivity jednotlivých P450 se ukázalo, že aktivita P450 2E byla citlivější vůči jeho působení než aktivita 3A. BQ také zřetelně snižoval elektroforeticky stanovený obsah apoproteinu P450 2E i 3A. V případě P450 2E probíhala inaktivace rychleji než destrukce apoproteinu, což by mohlo znamenat, že BQ interaguje s molekulou tohoto enzymu více způsoby. Předpokládáme, že BQ atakuje přednostně hem a s nižší afinitou se potom váže i na apoprotein. Účinek na apoprotein P450 3A odpovídal účinku na jeho aktivitu. P450 2E byl tedy inaktivován rychleji než 3A, ale účinek na jeho apoprotein byl pomalejší než tato inaktivace.

Srovnání citlivosti aktivit P450 2E a 3A vůči HQ ukázalo, že převládající mechanismus účinku HQ se liší od BQ. To bylo potvrzeno i výsledky imunoblotingu, kde HQ na rozdíl od BQ nesnižoval obsah apoproteinu P450 2E nebo 3A. Srovnání destruktivních účinků HQ a BQ je v souladu s názorem, že u BQ převládá jako mechanismus toxicity kovalentní vazba na proteiny, zatímco toxické účinky HQ jsou pravděpodobně způsobeny převážně stimulací tvorby ROS [21], [40]. ROS jsou schopné navodit destrukci hemu P450 [34], což bylo také nejpravděpodobnějším mechanismem destrukce P450 v inkubacích s HQ v našich experimentech. Jelikož se při vzájemných přeměnách HQ a BQ tvoří semichinonový radikál [42], může docházet i k aktivaci kyslíku a tvorbě ROS [40]. Podle našich výsledků přítomnost NADPH podporuje v prostředí mikrosomů průběh redukčních reakcí. Přesto však, vzhledem k přítomnosti oxidas, zřejmě dochází k enzymaticky podmíněnému redoxnímu cyklu HQ, jehož oxidace probíhá pouze do stádia semichinonu a ne až na BQ. To vysvětluje proč NADPH s HQ tvořily významné množství hydroxylových radikálů a naznačuje, že P450 3A by mohl být citlivější vůči inaktivaci vlivem ROS než P450 2E.

Destrukční účinek reaktivních metabolitů benzenu na P450 byl pravděpodobně způsoben částečně kovalentní vazbou BQ na protein a částečně působením ROS vznikajícími při vzájemných přeměnách BQ a HQ nebo během redoxního cyklu HQ. Celková destrukce P450 vlivem BQ a HQ v miniprasečích mikrosomech nedosáhla hodnot zaznamenaných u lidských mikrosomů [21]. Tento rozdíl může být připsán buď rozdílným vlastnostem jednotlivých enzymů vyplývajícím ze strukturálních odlišností nebo odlišným zastoupením těchto enzymů v jaterní tkáni lidí a miniprasat. Odhadovaný průměrný obsah P450 2E v játrech miniprasat použitých v této studii je nižší než u lidí [15], což může mít vliv na celkový rozsah destrukce P450 vlivem metabolitů benzenu. Je také důležité připomenout, že lidská populace je mnohem více heterogenní vzhledem k obsahu a aktivitám jednotlivých P450 než jakýkoli laboratorně využívaný modelový druh. Také u námi použitého druhu miniprasat byla interindividuální variabilita aktivit hlavních P450 relativně malá [15]. Co se týče obsahu a vlastností jednotlivých P450, jako jsou např. polymorfismy, indukce nebo inhibice P450, mohou tedy miniprasata odpovídat pouze určité části lidské populace.

Dalším významným cílem této práce bylo vytvoření dostupného *in vitro* modelového systému vhodného k testování látek potenciálně prospěšných pro zmírnění nežádoucích účinků anthracyklinových cytostatik. Limitujícím nežádoucím účinkem této skupiny cytostatik je jejich akutní i chronická kardiotoxicita. Za významný mechanismus vzniku kardiotoxicity anthracyklinů je považována nadměrná produkce ROS, jako potenciálně prospěšné látky jsou tedy testovány mj. antioxidanty. Jako zástupce anthracyklinů byl pro tuto studii vybrán DOX. Mechanismus jeho interakcí s enzymy obsaženými v miniprasečích jaterních mikrosomech byl studován analogicky s jednoduchými chinony BQ a HQ, přičemž cílem této části studie bylo otestovat možnost použití jaterních mikrosomů miniprasat jako modelového systému k testování vlivu polyfenolických antioxidantů na tvorbu ROS stimulovanou DOX.

DOX působil destrukci celkového P450 v jaterních mikrosomech miniprasete v závislosti na koncentraci, zatímco aktivity P450 2E a 3A neovlivňoval. Zároveň ve stejném rozmezí koncentrací stimuloval tvorbu hydroxylových radikálů v závislosti na koncentraci. Předpokládáme, že v použitém systému s jaterními mikrosomy miniprasete docházelo k jednoelektronové redukci pomocí CPR na semichinon DOX a následné aktivaci kyslíku s tvorbou superoxidového radikálu a hydroxylových radikálů. Ionty železa schopné katalyzovat produkci hydroxylových radikálů [43] mohly pocházet z poškozeného hemu P450. Jelikož semichinon DOX velice rychle reaguje s kyslíkem za tvorby superoxidu, jeho stanovení pomocí ESR vyžaduje speciální zařízení umožňující udržet naprosto anaerobní podmínky po celou dobu měření vzorku pomocí stálého proudu argonu. V podmínkách našeho měření (bez možnosti uchovat vzorek pod argonem i během měření) se podařilo detekovat semichinon DOX až v relativně vysoké, klinicky *in vivo* nedosažitelné, koncentraci DOX (300 μM). Superoxidové radikály je však možné stanovit v aerobním prostředí po adukci s DMPO, což se v námi použitém systému s membránami CPR a NADPH potvrdilo. Prokázali jsme tedy nepřímě, že CPR redukuje DOX a tím spouští celou kaskádu redukce kyslíku a tvorby ROS. Jelikož spektrum superoxidu se překrývá se spektrem hydroxylových radikálů a je příliš složité na to, aby ho bylo možné kvantitativně vyhodnotit, zvolili jsme pro kvantitativní analýzu spektrum hydroxylových radikálů, které jsou konečným reaktivním agens celé této kaskády. Jako modelový systém byly pro toto hodnocení použity mikrosomy, neboť oproti membránám s CPR představují komplexnější systém obsahující oxidační i redukční enzymy a lépe simulují situaci *in vivo*. Ve spektrech hydroxylových radikálů získaných ze vzorků s mikrosomy nebyly žádné interferující signály a také proto byl tento systém vhodnější pro kvantitativní analýzu.

Ve vyšších koncentracích DOX (30 μM a vyšší) docházelo k destrukci P450 i v inkubacích bez NADPH. Pravděpodobně se zde uplatnil neenzymatický mechanismus, neboť ROS mohou být tvořeny i následkem přímé reakce DOX s ionty železa. DOX předává jeden elektron Fe^{3+} za tvorby Fe^{2+} , které následně může redukovat molekulární kyslík [25], [43]. V přítomnosti NADPH však byla zaznamenána tvorba ROS i destrukce P450 v nižších koncentracích, které

více odpovídají klinicky dosahovaným koncentracím (7,5-10 μM , [23]). Považujeme proto tvorbu ROS v souladu s literaturou za významný mechanismus toxicity DOX.

Polyfenolické antioxidanty testované v rámci této práce byly vybrány z početné skupiny flavonoidů na základě své schopnosti inhibovat peroxidaci lipidů v systému s potkaními jaterními mikrosomy a NADPH [44]. Z testovaných flavonoidů byl pozorován významný inhibiční účinek na tvorbu hydroxylových radikálů stimulovanou DOX v mikrosomech u fisetinu, kaempferolu a myricetinu, avšak pouze v nejvyšší použité koncentraci (100 μM). Tato koncentrace je *in vivo* pomocí nutriční intervence prakticky nedosažitelná [45]. Námí použitý modelový systém s jaterními mikrosomy a 30 μM DOX lze, vzhledem k toxicitě DOX, považovat pouze za prescreeningový, neboť se liší od situace *in vivo* koncentrací DOX i cílovou tkání toxicity DOX. Nicméně pro odhad interakcí mezi DOX a polyfenolickými látkami, zejména z hlediska schopnosti vychytávání ROS, se tento systém zdá vhodným. Další validace pomocí studia vztahů mezi strukturou a účinkem sledovaných látek je účelná. Fisetin, kaempferol a myricetin lze doporučit k dalšímu studiu v jiných modelových systémech jako potenciálně prospěšné pro zmírnění nežádoucích účinků doxorubicinu.

6. Závěry

Cílem práce bylo prozkoumat možnost využití bakteriálních systémů exprimujících lidský monooxygenázový systém pro studium interakcí mezi látkami s motivem chinonu ve struktuře a cytochromy P450 a následně aplikovat získané znalosti na vývoj modelového systému pro testování vedlejších účinků anthracyklinových cytostatik.

Na základě analýzy získaných výsledků a s využitím publikované vědecké literatury, lze uzavřít:

1) Lidské cytochromy P450 exprimované v bakteriích *Escherichia coli* a izolované jako bakteriální membrány představují užitečný nástroj pro studium metabolismu xenobiotik exprimovaným enzymem, ale nejsou příliš vhodné pro studium oxidativního stresu a destrukčního působení xenobiotik na cytochromy P450.

Díky limitované dostupnosti lidské jaterní tkáň je třeba využívat alternativní modelové systémy a modelové zvířecí druhy pro studium interakcí biotransformačních enzymů s xenobiotiky. Vzhledem k tomu, že u nejběžnějšího laboratorního druhu, potkana, nejsou bez chemické indukce přítomny aktivity nejvýznamnějších lidských cytochromů P450, informace získané s použitím miniprasat jako modelového druhu mohou být velmi přínosné. Z tohoto důvodu byly k dalším experimentům využity miniprasečí jaterní mikrosomy.

2) Experimenty s miniprasečími mikrosomy ukázaly, že mechanismy buněčné toxicity hydrochinonu (produkce hydroxylových radikálů) a benzochinonu (kovalentní vazba na makromolekuly) se u miniprasat a lidí neliší. Navrhujeme proto jaterní mikrosomy miniprasat jako vhodný in vitro modelový systém pro testování oxidativního stresu a molekulární toxicity indukované látkami obsahujícími ve své struktuře chinon. Výhodou tohoto systému je poměrně časově nenáročná příprava a lepší dostupnost v porovnání se systémy používanými modelové buněčné linie nebo primokultury.

3) Při interakci miniprasečích mikrosomů s doxorubicinem docházelo k aktivaci doxorubicinu s následnou zvýšenou tvorbou hydroxylových radikálů. Za aktivaci doxorubicinu byla pravděpodobně zodpovědná NADPH:cytochrom P450 reduktáza.

Studie vlivu polyfenolů na toxicitu doxorubicinu v systému s jaterními mikrosomy miniprasat ukázala, že tento modelový systém umožňuje jejich interakce s doxorubicinem studovat a mohl by sloužit pro účely primárního screeningu biologických, zejména antioxidačních, vlastností těchto látek. Jako vhodné kandidáty pro tyto studie se zdají být fisetin, kaempferol a myricetin

7. Použitá literatura

- [1] **Testa B., Krämer S.D.**, The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 1. Principles and overview, *Chem Biodivers.* 2006; 3(10):1053-101.
- [2] **Nebert D.W., Dalton T.P.**, The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis, *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(12):947-60.
- [3] **Nebert D.W., Adesnik M., Coon M.J., Estabrook R.W., Gonzalez F.J., Guengerich F.P., Gunsalus I.C., Johnson E.F., Kemper B., Levin W., et al.**, The P450 gene superfamily: recommended nomenclature, *DNA.* 1987; 6(1):1-11.
- [4] **Isin E.M., Guengerich F.P.**, Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes, *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1770(3):314-29.
- [5] **Gonzalez F.J.**, Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1, *Mutat Res.* 2005; 569(1-2):101-10.
- [6] **Wang M., Roberts D.L., Paschke R., Shea T.M., Masters B.S., Kim J.J.**, Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(16):8411-6.
- [7] **Gutierrez A., Grunau A., Paine M., Munro A.W., Wolf C.R., Roberts G.C., Scrutton N.S.**, Electron transfer in human cytochrome P450 reductase, *Biochem Soc Trans.* 2003; 31(Pt 3):497-501
- [8] **Munro A.W., Noble M.A., Robledo L., Daff S.N., Chapman S.K.**, Determination of the redox properties of human NADPH-cytochrome P450 reductase, *Biochemistry.* 2001; 40(7):1956-63.
- [9] **Hagen N., Olsen A.K., Andersen J.V., Tjørnelund J., Hansen S.H.**, Characterization of mixtures of recombinant human cytochrome p450s as a screening model for metabolic stability in drug discovery, *Xenobiotica.* 2002; 32(9):749-59.
- [10] **Brandon E.F., Raap C.D., Meijerman I., Beijnen J.H., Schellens J.H.**, An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons, *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003; 189(3):233-46.
- [11] **Pelkonen O., Kaltiala E.H., Larmi T.K., Kärki N.T.**, Cytochrome P-450-linked monooxygenase system and drug-induced spectral interactions in human liver microsomes, *Chem Biol Interact.* 1974; 9(3):205-16.
- [12] **Van der Hoeven T.A., Coon M.J.**, Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes., *J Biol Chem.* 1974; 249(19):6302-10.
- [13] **Hariparsad N., Sane R.S., Strom S.C., Desai P.B.**, In vitro methods in human drug biotransformation research: implications for cancer chemotherapy, *Toxicol In Vitro.* 2006; 20(2):135-53.
- [14] **Nedelcheva V., Gut I.**, P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer, *Xenobiotica.* 199; 24(12):1151-75.
- [15] **Anzenbacher P., Souček P., Anzenbacherová E., Gut I., Hrubý K., Svoboda Z., Květina J.**, Presence and activity of cytochrome P450 isoforms in minipig liver microsomes. Comparison with human liver samples, *Drug Metab Dispos.* 1998; 26(1):56-9.

- [16] **Souček P., Zuber R., Anzenbacherová E., Anzenbacher P., Guengerich F.P.**, Minipig cytochrome P450 3A, 2A and 2C enzymes have similar properties to human analogs, *BMC Pharmacol.* 2001;1:11.
- [17] **Bolton J.L., Trush M.A., Penning T.M., Dryhurst G., Monks T.J.**, Role of quinones in toxicology, *Chem Res Toxicol.* 2000; 13(3):135-60.
- [18] **Snyder R., Hedli C.C.**, An overview of benzene metabolism, *Environ Health Perspect.* 1996; 104 Suppl 6:1165-71.
- [19] **Ross D.**, The role of metabolism and specific metabolites in benzene-induced toxicity: evidence and issues, *J Toxicol Environ Health A.* 2000; 61(5-6):357-72.
- [20] **Gut I., Nedelcheva V., Souček P., Stopka P., Tichavská B.**, Cytochromes P450 in benzene metabolism and involvement of their metabolites and reactive oxygen species in toxicity, *Environ Health Perspect.* 1996; 104 Suppl 6:1211-8.
- [21] **Souček P.**, Cytochrome P450 destruction by quinones: comparison of effects in rat and human liver microsomes, *Chem Biol Interact.* 1999; 121(3):223-36.
- [22] **Dobbs N.A., Twelves C.J., Gillies H., James C.A., Harper P.G., Rubens R.D.**, Gender affects doxorubicin pharmacokinetics in patients with normal liver biochemistry, *Cancer Chemother Pharmacol.* 1995;36(6):473-6.
- [23] **Minotti G., Recalcati S., Menna P., Salvatorelli E., Corna G., Cairo G.**, Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms, *Methods Enzymol.* 2004;378:340-61.
- [24] **Hortobágyi G.N.**, Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview, *Drugs.* 1997;54 Suppl 4:1-7.
- [25] **Singal P.K., Li T., Kumar D., Danelisen I., Iliskovic N.**, Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation, *Mol Cell Biochem.* 2000; 207(1-2):77-86.
- [26] **Xu X., Persson H.L., Richardson D.R.**, Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron, *Mol Pharmacol.* 2005; 68(2):261-71.
- [27] **Barnabé N, Zastre JA, Venkataram S, Hasinoff BB**, Deferiprone protects against doxorubicin-induced myocyte cytotoxicity, *Free Radic Biol Med.* 2002;33(2):266-75.
- [28] **Conklin K.A.**, Coenzyme q10 for prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity, *Integr Cancer Ther.* 2005; 4(2):110-30.
- [29] **Middleton E. Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C.**, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol Rev.* 2000; 52(4):673-751.
- [30] **Gillam E.M., Baba T., Kim B.R., Ohmori S., Guengerich F.P.**, Expression of modified human cytochrome P450 3A4 in *Escherichia coli* and purification and reconstitution of the enzyme, *Arch Biochem Biophys.* 1993; 305(1):123-31.
- [31] **Souček P.**, Expression of cytochrome P450 2A6 in *Escherichia coli*: purification, spectral and catalytic characterization, and preparation of polyclonal antibodies, *Arch Biochem Biophys.* 1999; 370(2):190-200.
- [32] **Omura T., Sato R.**, The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature, *J Biol Chem.* 1964; 239:2370-8.

- [33] **Buettner G.R.**, Spin trapping: ESR parameters of spin adducts, *Free Radic Biol Med.* 1987; 3(4):259-303.
- [34] **Schaefer W.H., Harris T.M., Guengerich F.P.**, Characterization of the enzymatic and nonenzymatic peroxidative degradation of iron porphyrins and cytochrome P-450 heme, *Biochemistry.* 1985; 24(13):3254-63.
- [35] **Guengerich F.P., Strickland T.W.**, Metabolism of vinyl chloride: destruction of the heme of highly purified liver Microsomal cytochrome P-450 by a metabolite, *Mol Pharmacol.* 1977; 13(6):993-1004.
- [36] **Crespi C.L., Miller V.P.**, The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes--state of the art and prospects for the future, *Pharmacol Ther.* 1999;84(2):121-31.
- [37] **Gut I., Ojima I., Václavíková R., Šimek P., Horský S., Linhart I., Souček P., Kondrová E., Kuznetsova L.V., Chen J.**, Metabolism of new-generation taxanes in human, pig, minipig and rat liver microsomes, *Xenobiotica.* 2006; 36(9):772-92.
- [38] **Souček P., Filipcová B., Gut I.**, Cytochrome P450 destruction and radical scavenging by benzene and its metabolites, Evidence for the key role of quinones, *Biochem Pharmacol.* 1994 Jun 15;47(12):2233-42.
- [39] **Souček P., Gut I., Stopka P.**, Effect of the microsomal system on interconversions between hydroquinone, benzoquinone, oxygen activation, and lipid peroxidation, *Chem Biol Interact.* 2000; 126(1):45-61
- [40] **DeCaprio A.P.**, The toxicology of hydroquinone--relevance to occupational and environmental exposure, *Crit Rev Toxicol.* 1999; 29(3):283-330.
- [41] **do Céu Silva M., Gaspar J., Duarte Silva I., Leão D., Rueff J.**, Mechanisms of induction of chromosomal aberrations by hydroquinone in V79 cells, *Mutagenesis.* 2003; 18(6):491-6.
- [42] **Zang L.Y., Stone K., Pryor W.A.**, Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance, *Free Radic Biol Med.* 1995; 19(2):161-7.
- [43] **Horenstein M.S., Van der Heide R.S., L'Ecuyer T.J.**, Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention, *Mol Genet Metab.* 2000; 71(1-2):436-44
- [44] **Kondrová E., Ozgová Š., Gut I.**, Přírodní fenolické látky jako antioxidanty a prooxidanty a mechanismy jejich působení, *České pracovní lékařství*, 2006; 4: 19-24.
- [45] **Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C.**, Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, *Am J Clin Nutr.* 2005; 81(1 Suppl):230S-242S.

Seznam publikací doktoranda

Publikace, které jsou podkladem dizertace:

- a) **Kondrová E., Stopka P., Souček P.**, Cytochrome P450 destruction by benzene metabolites 1,4-benzoquinone and 1,4-hydroquinone and the formation of hydroxyl radicals in minipig liver microsomes., *Toxicol In Vitro*. 2007; 21(4):566-75, **IF= 1,754**
- Gut I., Ojima I., Václavíková R., Šimek P., Horský S., Linhart I., Souček P., Kondrová E., Kuznetsova L.V., Chen J.**, Metabolism of new-generation taxanes in human, pig, minipig and rat liver microsomes, *Xenobiotica*. 2006; 36(9):772-92., **IF=1,427**
- Václavíková R., Kondrová E., Ehrlichová M., Boumendjel A., Kovář J., Stopka P., Souček P., Gut I.**, The effect of flavonoid derivatives on doxorubicin transport and metabolism., *Bioorg Med Chem*. 2008;16(4):2034-42., **IF=2,624**
- b) **Kondrová E., Ozgová Š., Gut I.**, Přirozené fenolické látky jako antioxidanty a prooxidanty a mechanismy jejich působení, *České pracovní lékařství*, 2006; 4: 19-24.