

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd



**MODIFIKACE VYBRANÝCH  
BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ V PRŮBĚHU  
STÁRNUTÍ (U POTKANA)**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Hradec Králové 2013

Erika Vyskočilová

## **PROHLÁŠENÍ:**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Na tomto místě bych chtěla poděkovat PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a všestrannou pomoc při vypracování této diplomové práce. Ráda bych také poděkovala Doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za převzetí úlohy školitele po dobu mateřské dovolené Dr. Boušové a Mgr. Haně Bártíkové, Ph.D. za pomoc s vyhodnocením blotů a jejich kvantifikací.

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra biochemických věd

Kandidát: Erika Vyskočilová

Školitel: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Název diplomové práce: MODIFIKACE VYBRANÝCH BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ V PRŮBĚHU STÁRNUTÍ (U POTKANA)

Stárnutí je nezastavitelný biologický proces charakterizovaný progresivním útlumem funkce orgánových systémů a současným nárůstem oxidačního poškození v důsledku kumulace reaktivních forem kyslíku (ROS). Zvýšená aktivita antioxidantních enzymů, například peroxidasy a katalasy, v průběhu stárnutí tedy souvisí se zvýšenou produkcí ROS. Aktivita biotransformačních enzymů například cytochromu P450 (CYP) a glutathion-*S*-transferasy (GST) se také v průběhu stárnutí mění. Zpravidla, u velmi mladých a velmi starých jedinců je aktivita nižší než v období dospělosti. Cílem práce bylo sledovat změny v aktivitě a expresi vybraných jaterních biotransformačních (GST, CYP 1A, 2B, 3A4) a antioxidantních (peroxidasa, katalasa, superoxiddismutasa) enzymů u potkanů v souvislosti s věkem. Potkaní samci kmene Wistar byli utraceni dekapitací v celkové anestezii ve věku 6 týdnů a 21 měsíců (6 jedinců v každé skupině). Následně byla jejich játra zpracována na subcelulární frakce (mikrosomy a cytosol), v nichž byly spektrofluorimetry a spektrofotometry stanoveny specifické aktivity enzymů. Expres GST byla sledována pomocí imunoblotingu se specifickou protilátkou proti GSTA a normalizována na množství  $\beta$ -aktinu. Specifická aktivita GST byla u 21-ti měsíčních potkanů téměř šestinásobně zvýšená, což bylo provázeno také zvýšením exprese tohoto enzymu. Naproti tomu specifické aktivity CYP 1A, 2B a katalasy se s rostoucím věkem snižovaly. Specifická aktivita CYP 2B byla 4,5 krát nižší u 21-ti měsíčních potkanů oproti 6-ti týdním, zatímco specifická aktivita CYP 1A2 klesla jen o čtvrtinu. V aktivitě peroxidasy a superoxiddismutasy nebyly v průběhu stárnutí pozorovány statisticky významné změny. Získané výsledky mohou přispět k pochopení změn v metabolismu xenobiotik v průběhu stárnutí, které mohou být vyvolány změnami v aktivitě a expresi biotransformačních a antioxidantních enzymů.

## ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Erika Vyskočilová

Supervisor: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Title of diploma thesis: MODIFICATION OF SELECTED BIOTRANSFORMATION ENZYMES DURING AGEING (IN RAT)

Ageing is an inevitable biological process characterized by progressive functional decline of all organ systems with simultaneous increase in oxidative damage as a result of reactive oxygen species (ROS) accumulation. Increased activity of antioxidant enzymes, such as peroxidase and catalase, is related to increased production of ROS during ageing. Activity of biotransformation enzymes such as cytochrome P450 (CYP) and glutathion-*S*-transferase (GST) changes during ageing too. In general, activity of enzymes is lower in very young and very old individuals than in the period of adulthood. The aim of the present work was to study age-related changes in activities and expression of selected xenobiotic-metabolizing enzymes (GST, CYP 1A, CYP 2B, CYP 3A4) and antioxidant enzymes (catalase, peroxidase, superoxiddismutase) in rat liver. Male Wistar rats were sacrificed by decapitation under ether anesthesia at the age of 6 weeks and 21 months (6 individuals in each group). Subsequently, liver specimens were processed to obtain the subcellular fractions (microsomes and cytosol) in which the specific activities of enzymes were assessed by spectrofluorimetric and spectrophotometric methods. GST protein expression was also monitored by immunoblotting with specific antibody against GSTA and normalized to the amount of  $\beta$ -actin. Specific activity of GST was about 6-fold higher in 21-month-old rats, which was accompanied by an increase in the GST protein expression. In contrast, specific activity of CYP1A2, CYP2B and catalase significantly decreased with increasing age. Specific activity of CYP 2B was 4.5-fold lower in 21-month-old rats than in 6-week-old ones, while specific activity of CYP1A2 decreased by one fourth only. No significant changes in peroxidase and superoxiddismutase activity with age were observed. The obtained results can contribute to the understanding of age-related changes in xenobiotic metabolism, which can be caused by alterations in the activity and/or expression of these biotransformation and antioxidant enzymes.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Játra a jejich stárnutí</b>	<b>9</b>
2.1.1 Fyziologie a morfologie jater	10
2.1.2 Změny v morfologii jater během stárnutí	12
2.1.3 Změny ve fyziologii jater během stárnutí	13
<b>2.2 Biotransformace xenobiotik</b>	<b>16</b>
2.2.1 Cytochrom P450	18
2.2.2 Glutathion- <i>S</i> -transferasa	21
<b>2.3 Oxidační stres a antioxidační enzymy</b>	<b>23</b>
2.3.1 Superoxiddismutasa	26
2.3.2 Katalasa	27
2.3.3 Peroxidasy	28
<b>3. CÍL PRÁCE</b>	<b>30</b>
<b>4. MATERIÁL A METODIKA</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Chemikálie</b>	<b>31</b>
<b>4.2 Pomůcky a přístroje</b>	<b>32</b>
<b>4.3 Příprava subcelulárních frakcí</b>	<b>34</b>
<b>4.4 Stanovení aktivity jednotlivých isoform cytochromu P450</b>	<b>35</b>
<b>4.5 Stanovení aktivity glutathion-<i>S</i>-transferasy</b>	<b>37</b>
<b>4.6 Stanovení aktivity superoxiddismutasy</b>	<b>39</b>
<b>4.7 Stanovení aktivity katalasy</b>	<b>40</b>

<b>4.8 Stanovení aktivity peroxidasy</b>	<b>42</b>
<b>4.9 Elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)</b>	<b>43</b>
<b>4.10 Imunoblotting (Western blotting)</b>	<b>46</b>
<b>4.11 Chemiluminiscence</b>	<b>49</b>
<b>4.12 Stanovení bílkoviny pomocí BCA</b>	<b>49</b>
<b>4.13 Statistická analýza dat</b>	<b>50</b>
<b>5. VÝSLEDKY</b>	<b>51</b>
<b>5.1 Stanovení aktivity jednotlivých isoform cytochromu P450</b>	<b>51</b>
5.1.1 CYP1A1	51
5.1.2 CYP1A2	53
5.1.3 CYP2B	55
5.1.4 CYP3A	57
<b>5.2 Stanovení aktivity glutathion-<i>S</i>-transferasy</b>	<b>59</b>
<b>5.3 Stanovení aktivity superoxiddismutasy</b>	<b>61</b>
<b>5.4 Stanovení aktivity katalasy</b>	<b>63</b>
<b>5.5 Stanovení aktivity peroxidasy</b>	<b>65</b>
<b>5.6 SDS-PAGE a Western blotting vzorků</b>	<b>67</b>
<b>6. DISKUZE</b>	<b>70</b>
<b>7. ZÁVĚR</b>	<b>76</b>
<b>8. SEZNAM ZKRATEK</b>	<b>77</b>
<b>9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>79</b>

# 1. ÚVOD

Tato diplomová práce vznikla na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Praze, pod odborným vedením dr. Boušové. Skupina dr. Boušové a prof. Dršaty se zabývá vlivem různých patologických stavů (např. neenzymové glykace či oxidačního stresu) i fyziologického procesu stárnutí na aktivitu různých enzymů. V této práci se zabývám vlivem věku na aktivitu/expresi vybraných biotransformačních a antioxidantních enzymů z potkaních jater, což rozšíří již známé poznatky z tohoto oboru. Ačkoliv je stárnutí přirozený proces, dochází v jeho průběhu k různým patologickým změnám, které se následně odráží na metabolické aktivitě organismu.

Problematika stárnutí a s ním související změny v metabolismu nabývají větší důležitosti v souvislosti se stárnutím populace, zvyšující se zátěží organismu léčivy a různými xenobiotiky. Aktivita enzymů u stárnoucího organismu se zpravidla liší, v důsledku toho se může lišit i odpověď na xenobiotika a může docházet k negativnímu ovlivnění organismu. Z výsledků získaných v této práci můžeme usuzovat na změny probíhající v důsledku stárnutí.

Jako modelové zvíře pro sledování aktivity vybraných biotransformačních a antioxidantních enzymů byl vybrán potkan kmene Wistar. Pro porovnání aktivity jsme vytvořili dvě skupiny zvířat (6-týdenní a 21-měsíční), kde v každé bylo šest jedinců. Aktivitu enzymů jsem sledovala v subcelulárních frakcích (cytosol, mikrosomy) jaterních buněk. Stanovovala jsem aktivitu glutathion-S-transferasy (spektrofotometricky) a vybraných isoform cytochromu P450 (spektrofluorimetricky) jako zástupců biotransformačních enzymů, protože se z velké míry podílí na metabolismu xenobiotik. Z antioxidantních enzymů jsem sledovala aktivity peroxidasy, katalasy a superoxiddismutasy (spektrofotometricky), jejichž změny mohou ovlivnit odpověď organismu na oxidační stres. Využila jsem také denaturující polyakrylamidovou gelovou elektroforézu s následným imunoblottingem a chemiluminiscenční detekcí k potvrzení exprese glutathion-S-transferasy.



## 2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Játra a jejich stárnutí

Stárnutí je multifaktoriální proces zahrnující morfologické a biochemické změny v jednotlivých buňkách a v celém organismu. Přesný mechanismus podstaty stárnutí není dosud plně pochopen (Maurya & Rizvi, 2010). Stárnutí je také spojováno se změnami v buněčné, humorální a vrozené imunitě (Vishwas et al., 2013).

Ačkoliv mechanismus stárnutí na buněčné a molekulární úrovni není zcela pochopen, byla na základě studie na mozkových buňkách vyslovena teorie buněčného procesu stárnutí. Tato teorie naznačuje, že jedním z primárních mechanismů buněčného procesu stárnutí je zpomalená proteolýza. Ve studiích byly postranní srdeční komory mladých potkanů naplněny inhibítorem proteas leupeptinem a došlo též k akumulaci autoflorescenčních sloučenin podobných „pigmentu stáří“ lipofuscinu (Kitani, 2004).

Nicméně zatím nejsou důkazy, že by akumulace lipofuscinu v souvislosti s věkem nebo obrat v lyzosomální enzymové aktivitě ovlivňoval funkci hepatocytů, včetně vnitřního oxidačního metabolismu xenobiotik nebo jejich jaterní clearance (Schmucker, 2001).

V návaznosti na tuto teorii ukázalo několik následujících studií na odchylky v proteinovém obratu doprovázejícím stárnutí. Bylo zjištěno snížení proteolytické enzymové aktivity nebo naopak nárůst koncentrace proteasového inhibitoru (nebo obou). V hepatocytech starých zvířat došlo ke zpomalení degradace proteinů (Kitani, 2004).

Velmi intenzivně studovaným procesem z hlediska stárnutí je změna metabolismu léčiv v játrech. Zcela zjevně má tato tkáň bezprostřední klinický dopad na farmakoterapii ve stáří. Vzhledem k tomu, že metabolická kapacita jater je věkem změněna, může být změněn také farmakokinetický profil léčiv, což eventuálně může vést ke změně jejich farmakodynamiky (Kitani, 1994). Z tohoto hlediska mají anatomické a funkční změny v játrech (a také ledvinách) kvantitativně větší vliv na farmakokinetiku, zahrnující změny v enzymové odpovědi na biotransformaci xenobiotik (Hines, 2008).

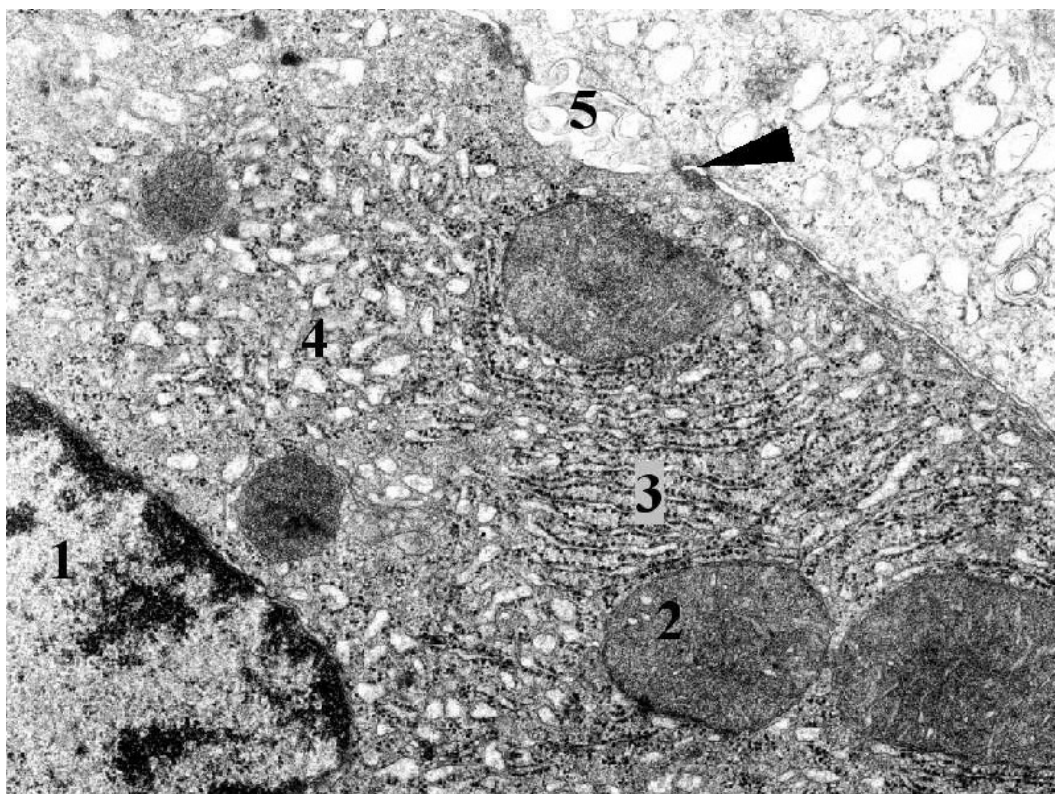
### 2.1.1 Fyziologie a morfologie jater

Játra jsou nejtěžším orgánem v těle a vykonávají řadu rozdílných fyziologických a biochemických funkcí (Kitani, 1994). Funkce vykonávané játry mohou být klasifikovány do tří hlavních kategorií: metabolická aktivita, sekreční aktivita a biotransformace (van Bezooijen, 1984).

Hepatocyty, parenchymové buňky jater, tvořící až dvě třetiny všech jaterních buněk, jsou zodpovědné za biotransformaci endogenních i exogenních sloučenin rozpustných v tucích. Jejich další funkcí je udržování homeostázy živin, filtrace částic, syntéza proteinů, bioaktivace steroidů a tvorba žluče. Výrazným znakem hepatocytů je kruhové jádro a početné mitochondrie, které ukazují na významnou roli jater v energetickém metabolismu. Hepatocyty také obsahují endoplazmatické retikulum (ER). Přítomnost ribosomů obsahujících drsné ER ukazuje na hlavní funkci jater, kterou je syntéza proteinů. Hladké endoplazmatické retikulum integruje velké množství biotransformačních enzymů, ostatní enzymy se nacházejí v cytosolu (Sevior et al., 2012). Tato intracelulární struktura je tedy přímo zodpovědná za jaterní kapacitu k metabolismu xenobiotik (van Bezooijen, 1984). Struktura hepatocytu zobrazená pomocí elektronového mikroskopu je vyobrazena v Obr. 1.

Hepatocyty jsou organizovány do trámců, které jsou rozdělené cévními kanálky neboli sinusoidami. Tyto struktury jsou důležité pro přímou exkreci produktů biotransformace z jater do žluče a krve (Sevior et al., 2011).

Mezi neparenchymové buňky, které tvoří 20 – 40 % celkové buněčné populace jaterní tkáně, patří především buňky endotelové, Kupfferovy, Iltovy (též zvané lipocyty), Pit buňky a epitelové buňky žlučových cest (Červinková, 2010). První čtyři typy buněk mohou být považovány za hlavní komponenty retikuloendotelového systému (van Bezooijen, 1984).



Obr. 1. Hepatocyt v elektronové mikroskopii, 1 – jádro, 2 – mitochondrie v cytoplasmě, 3 – drsné ER, 4 – hladké ER, 5 – žlučová kapilára ohraničená spojovacím komplexem hepatocytů (<http://ultrastruktura.upol.cz/v%C3%BDuka/AtlasEM/tr/slides/tr010.html>)

Hepatoblasty jsou alespoň bipotentní. Reprezentují populaci progenitorových buněk buď pro hepatocyty nebo pro cholangiocyty. Populace nediferencovaných dospělých jaterních buněk tvoří 1 – 3 % normálních jaterních buněk, je heterogenní a skládá se z kmenových buněk a takzvaných oválných buněk, fenotypově odpovídajících fetálním hepatoblastům. Předpokládá se, že během jaterní regenerace a za některých patologických podmínek oválné buňky intenzivně proliferují a diferencují. Oba tyto procesy jsou kontrolovány řadou růstových faktorů (růstový faktor hepatocytů, transformující růstový faktor  $\alpha$  a  $\pi$ , fibroblastový růstový faktor, a insulinu podobný růstový faktor I a II) a modifikovány vlivem mesenchymu, hvězdicových buněk, extracelulární matrix, pohlaví, věku a hepatotoxickými vlivy (Czekaj et al., 2010).

Předpokládá se, že hepatocelulární proliferační aktivita v játrech mladých potkanů je vyšší než v játrech dospělých, protože játra mladých potkanů jsou v procesu růstu (Asaoka et al., 2010).

Lipidové složení jaterní mikrosomální membrány ovlivňuje aktivitu jaterního monoxygenasového systému. Okolo 80 % membrány je tvořeno lipidy a fosfolipidy. Molární poměr cholesterolu/fosfolipidů má značnou důležitost pro fyzikálně chemické vlastnosti membrány (van Bezooijen, 1984).

### 2.1.2 Změny v morfologii jater během stárnutí

Předpokládá se, že v průběhu stárnutí dochází k mnoha fyziologicko-chemickým změnám buněčné membrány. Kvalita povrchu membrány hepatocytu, pokud je změněna stárnutím, může výrazně ovlivnit buněčné funkce (Kitani, 1994). Bylo pozorováno značné zvýšení obsahu cholesterolu v jaterních mikrosomech, které ukazuje na zvýšení rigidity lipidové domény této membránové frakce. Ztráta fluidity v této doméně pak brání schopnosti jednotlivých isoform cytochromu P450 efektivně interagovat s dalšími komponenty monoxygenasového systému (Schmucker, 2001).

Změny v hmotnosti jater s rostoucím věkem jsou důležité z hlediska jaterní biotransformační kapacity. Podstatný je také poměr hmotnosti jater a těla. Poměr hmotnosti jater ku hmotnosti těla se pohybuje v rozsahu 2,2 – 4,4 % v závislosti na druhu, pohlaví a věku zkoumaných zvířat. Studie ukázaly, že věkově závislé změny tohoto poměru u potkanů jsou podmíněné pohlavím a zátěží (van Bezooijen, 1984). U potkanů se hmotnost jater s věkem zvyšuje, u lidí má naopak tendenci klesat. Tento rozdíl je důležitý při interpretaci dat z *in vivo* studií, například farmakokinetických (Kitani, 1994).

Objemová frakce hepatocytárního kompartmentu není stárnutím ovlivněna, zabírá 80 – 85 % celkového objemu jater během celého života potkanů. Počet hepatocytů na objem jaterní tkáně klesá během první poloviny života, ale obnovuje se během druhé poloviny života (Schmucker, 2001).

Výraznou změnou v jaterní morfologii v souvislosti s věkem je posun hepatocytů do stavu s vyšším počtem chromozomových sad v jádře. Toto zvýšení v polyploidii potkaních hepatocytů s věkem je druhově závislé. Doba začátku a konce změn v ploidii se liší druh od druhu. Celkově nejvýraznější změny v ploidním stavu se vyskytují během prvního roku života. Počet hepatocytů na jednotku jaterního objemu se s věkem snižuje. Protože léčiva jsou transportována přes membránu hepatocytu a oblast sinusoidální membrány účastníci se absorpce léčiv může být relativně zmenšena, může

být rychlost absorpce ovlivněna pozorovaným zvýšením v plošnosti hepatocytu (van Bezooijen, 1984).

Poměr povrchu ku objemu hladkého ER se lineárně zvyšuje během prvních dvanácti měsíců života a pozvolna klesá mezi dvacátým až třicátým měsícem života. Tento poměr odráží koncentraci membrány na objem jater a může korelovat s biochemickými hodnotami, např. koncentrací jaterního CYP. Vzhledem k tomu, že relativní povrch drsného ER zůstává u potkanů během stárnutí nezměněný, pokles výtěžku mikrosomálních proteinů potvrzený stereologickými daty demonstruje ztrátu hladkého ER (Schmucker, 2001).

K hlavním změnám v jaterní morfologii v průběhu stárnutí přibývají navíc specifické histopatologické změny. Bylo pozorováno spontánní poškození jater různých druhů potkanů. Toto poškození se liší v závislosti na věku a samozřejmě ovlivňuje jaterní metabolickou kapacitu (van Bezooijen, 1984). Ačkoliv jaterní regenerační potenciál zůstává u stárnoucích potkanů nezměněný, rychlost regenerace jater u velmi starých zvířat klesá (Schmucker, 2001).

Dochází dále také k oxidačnímu poškození proteinů, které se pak stávají nefunkčními, ztrácí katalytickou aktivitu nebo strukturní integritu. Proteiny mitochondriální matrix podstupují jak oxidační, tak glykační modifikaci a následně dochází k jejich akumulaci (Bakala et al., 2012).

### **2.1.3 Změny ve fyziologii jater během stárnutí**

Vliv věku na metabolismus xenobiotik je stále sporný jak u potkanů, tak u lidí (Wauthier et al., 2004). Věkově závislé změny v kapacitě jednotlivých hepatocytů k metabolismu léčiv, změny průtoku krve játry, vazebná kapacita proteinů a jaterní absorpce mohou ovlivnit biotransformační kapacitu jater jako celku (van Bezooijen, 1984). Jaterní organogeneze začíná od 4. týdne gestace. Schéma enzymového vývoje a změny v přítomnosti enzymů a jejich hladin mohou mít významný dopad na terapeutické i nežádoucí účinky léčiv (Sevior et al., 2012). Změny fyziologických a biochemických funkcí v závislosti na věku jsou velmi radikální jen během prvních 6 měsíců života potkana, poté se stabilizují.

Drastické snížení funkcí jaterního mikrosomálního systému monooxygenas, nejprve popsáné v játrech samců potkana, ukázalo na možnou feminizaci samčích jater

v průběhu stárnutí. V samičích játrech potkana, stejně tak u myši, se tento systém s věkem nemění. U samců potkana došlo s rostoucím věkem k poklesu aktivity enzymů druhé fáze biotransformace, zatímco u samic potkana i myši byla jejich aktivita nezměněna (Kitani, 1994).

Vývojové změny v metabolismu léčiv byly popsány u novorozenců a malých dětí a mohou vznikat v důsledku kvantitativní a/nebo kvalitativní modifikace cytochromu P450 v průběhu zrání.

Výsledky studií například ukazují, že aktivita CYP3A je zralá při narození a klesá s přibývajícím věkem (Vauzelle-Kervroedan et al., 1996). Změny ve farmakokinetice u CYP3A se zdají být multifaktoriální. Možné příčiny zahrnují snížení exprese jaterního nebo střevního proteinu, redukci hmotnosti jater a možná snížení průtoku krve játry (Warrington et al., 2004). Důležitými faktory, které určují efekt stárnutí na metabolickou kapacitu jater, mohou být difuze kyslíku, transport xenobiotik k vazebnému místu na CYP a dodání NADPH flavoproteinu (van Bezooijen, 1984).

Věkově závislé snížení aktivity metabolismu léčiv, pozorované u starých samců potkana, je úzce spjato s vymizením CYP2C11, hlavní specifické samčí formy v jaterních mikrosomech, která katalyzuje 2 $\alpha$ - a 16 $\alpha$ -hydroxylaci testosteronu. Expze určitých forem CYP je regulována endokrinními faktory jako růstovými nebo pohlavními hormony. Endokrinní faktory se mění s věkem a změny v těchto faktorech ovlivňují hladinu CYP. Snížená hladina samčího specifického CYP u starých potkanů se vyskytuje díky snížení hladiny sérového testosteronu. Věkově závislé změny v metabolismu testosteronu odráží pokles pohlavně spjatých rozdílů v expresi CYP (Ymaoka et al., 1991).

Funkční kapacita retikuloendotelového systému je určována clearance určitých látek z krevního oběhu. V průběhu stárnutí pak bylo pozorováno snížení této kapacity u potkanů i myši. Biochemické studie zaměřené hlavně na lyzosomální enzymy ukázaly na nepříliš výrazný pokles enzymové aktivity v Kupfferových a endoteliálních buňkách. Změny ve vazebné kapacitě proteinů pro xenobiotika mohou ovlivnit jejich biotransformaci. Tyto změny mohou nastat kvůli změnám v koncentraci proteinů v séru, která je výsledkem jejich syntézy a eliminace. Pokles byl pozorován během prvního roku života u potkanů.

Vliv stárnutí na kapacitu izolovaných hepatocytů k syntéze albuminu, důležitého transportního proteinu pro anionty, mastné kyseliny, xenobiotika a mnoho dalších, byl studován u potkanů. Snížení syntézy albuminu bylo pozorováno mezi 3. a 24. měsícem věku, poté následovalo ostré zvýšení v pokročilém věku. Pozorované zvýšení syntézy albuminu a dalších proteinů v pokročilém věku může být kompenzační reakcí jater na zvýšenou eliminaci albuminu díky např. zvýšené proteolytické aktivitě, zvýšené endocytóze nebo výskytu změněných, malfunkčních proteinů.

V mikrosomální frakci jater byly zaznamenány změny ve složení fosfolipidů, cholesterolu a mastných kyselin. V průběhu stárnutí se snižuje množství celkových fosfolipidů, zvyšuje se koncentrace cholesterolu a v důsledku toho také molární poměr cholesterolu k fosfolipidům. Zvýšení tohoto poměru může způsobit snížení permeability a fluidity membrán a také aktivity hlavních membránově vázaných enzymů, např. monooxygenas.

Změny v metabolismu uhlovodíků v souvislosti s věkem mohou ovlivnit kapacitu jater k metabolismu xenobiotik. Například produkce NADPH může kontrolovat rychlost metabolismu xenobiotik, protože přívod tohoto redukovaného kofaktoru je velmi důležitý pro udržování oxidačně-redukčního stavu páru  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ , který hraje důležitou roli v tvorbě redukovaného glutathionu.

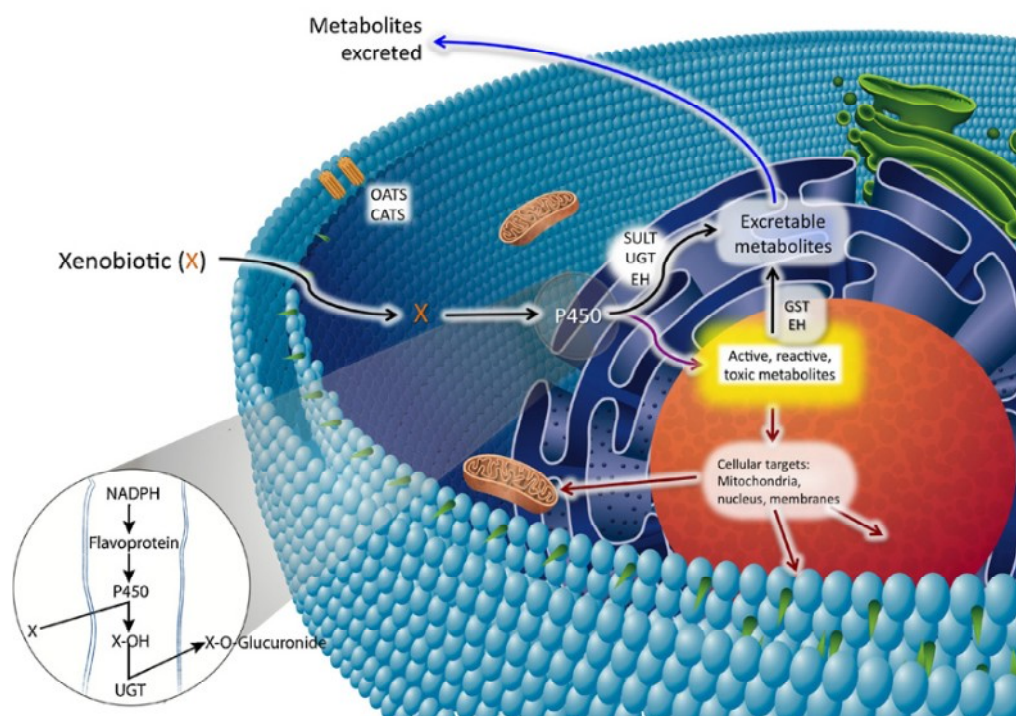
Průtok krve játry potkanů se snižuje zejména během prvních 12 měsíců života (van Bezooijen, 1984). Stereologické analýzy ukázaly na věkově závislé zvýšení jaterního objemu z 15 % na 50 %. Postupné zvýšení bylo pozorováno během dospívání (do 16 měsíců), následováno bylo poklesem v průběhu stáří (20-30 měsíců) (Schmucker, 2001).

Průtok žluče, rychlost exkrece žlučových šťáv a jejich složení v přirozené žluči může být také ovlivněno věkem. Avšak bylo zjištěno, že po dosažení dospělosti průtok žluče a rychlost exkrece žlučových šťáv klesá u potkanů s věkem jen pomalu, s výjimkou samiček kmene Fischer 344 (Kitani, 1994).

## 2.2 Biotransformace xenobiotik

Biotransformace je rozhodující proces, který určuje, jak rychle budou toxické sloučeniny odstraněny z orgánů/organismu. Avšak ve výjimečných případech může biotransformace produkovat také reaktivní intermediáty, které mají větší toxicitu než parentní látka (Saghir et al., 2012).

Biotransformační reakce jsou zpravidla rozděleny do dvou fází. Pro 1. fázi je klíčový cytochrom P450, enzymy druhé fáze jsou charakteristické schopností konjugovat exogenní molekuly s endogenními kofaktory (Sevior et al., 2012). Průběh přeměny xenobiotika v hepatocytu je znázorněn na Obr. 2.



Obr. 2. Průběh přeměny xenobiotika v hepatocytu (Sevior et al., 2012)

První fáze biotransformace se skládá z reakcí, ve kterých jsou lipofilní substráty transformovány oxidací, hydrolýzou a redukcí. Nejčastější reakcí první fáze je oxidace, která je katalyzována vícefunkčním oxidasovým systémem. Součástí tohoto systému je soustava hemoproteinů společně nazývaných jako cytochrom P450, cytochrom b5 a flavoprotein, NADPH-CYP-reduktasa (van Bezooijen, 1984). Podstatná část enzymů první fáze se nachází v játrech, jsou ale přítomné i v jiných orgánech včetně ledvin, mozku, plic a střev (de Zwart et al., 2008).



Většina biotransformačních reakcí první fáze pro léčiva a další xenobiotika je katalyzována CYP z rodin CYP1, CYP2 a CYP3 (Lewis et al., 2004).

Biotransformace je regulována souborem nukleárních receptorů (pregnanový X receptor, konstitutivní androstanový receptor, receptory aktivované peroxisomovými proliferátory a receptor pro aromatické uhlovodíky) obvykle nazývaných xenosensory, které vážou řadu endogenních a exogenních molekul (induktorů) a tím iniciují indukci. Aktivita biotransformačních enzymů a transportérů může být také inhibována (Sevior et al., 2012).

Inhibice je snížení enzymové aktivity v důsledku přímé interakce s léčivem nebo jinou chemikálií. Tento proces může být považován za závažnější, než je enzymová indukce, protože inhibice se odehrává spíše okamžitě a nemá čas se rozvíjet. Dále se také zdá, že více interakcí mezi léčivy navzájem je způsobeno právě enzymovou indukcí. Existují různé typy enzymové inhibice a jejich klinický dopad je pak ovlivněn základním mechanismem (Guengerich, 1997).

Terminologicky bylo navrženo, že reakce první fáze probíhají před reakcemi druhé fáze, která je v některých případech následována ještě třetí fází (exkrece). Avšak není zcela jisté, že biotransformace xenobiotik probíhá přesně v tomto pořadí. Navíc je obtížné rozdělit skupiny enzymů do jednotlivých kategorií biotransformace.

Dalšími enzymy první fáze biotransformace jsou flavinové monooxygenasy (FMO), esterasy, amidasy, alkohol- a aldehyddehydrogenasy, aldehyd- a keton-reduktasy a další.

Enzymy druhé fáze jsou například UDP-glukuronosyltransferasy, glutathion-S-transferasy, sulfottransferasy, arylamin-N-acetyltransferasy a methyltransferasy, jejichž exprese a aktivita se zdá být asociována s vývojem. Výsledkem těchto reakcí je inaktivace/detoxikace chemických látek, méně často pak bioaktivace těchto látek spojením s enzymy druhé fáze biotransformace (Saghir et al., 2012).

V porovnání s lidmi začíná exprese biotransformačních enzymů u potkanů relativně pozdě, většinou až postnatálně, zatímco u lidí je většina enzymů exprimována už prenatálně. Tento specifický rozdíl v metabolismu může limitovat extrapolaci dat získaných na zvířecích modelech na člověka (Saghir et al., 2012).

Dále uvádím stručnou charakteristiku biotransformačních enzymů, jejichž aktivity jsem stanovovala v experimentální části této práce.

### **2.2.1 Cytochrom P450**

Cytochrom P450 (CYP, EC 1.14.14.1) a na něm závisící metabolické dráhy hrají zásadní fyziologickou roli u všech obratlovců. Aktivita tohoto důležitého systému může být změněna inhibicí nebo indukci enzymu množstvím léčiv a dalších sloučenin, které se vyskytují v potravě (Palasz et al., 2012). Cytochrom P450 zahrnuje nadrodinu enzymů vázajících hem. Hlavní vlastností všech známých isoenzymů CYP je schopnost vázat a aktivovat dva atomy kyslíku. Hemový atom kovu váže dva atomy kyslíku z molekuly substrátu, kterou je peroxid. Na druhou stranu může CYP vázat peroxid vodíku nebo peroxidy a využít jeden z kyslíkových atomů pro monooxygenaci. Schopnost aktivovat Fe-O-O je určována způsobem, kterým je hem vázán k apoproteinu (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001).

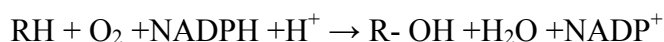
Enzymy ze skupiny CYP, které jsou zodpovědné za oxidaci xenobiotik, se nacházejí v játrech, ačkoliv některé můžeme nalézt i na jiných místech, např. v ledvinách a tenkém střevě, kde zdatelně přispívají k celkovému metabolismu léčiv v závislosti na cestě podání (Guengerich, 1997).

CYP nadrodina se skládá z velkého množství isoenzymů, které jsou rozděleny do genových rodin na základě sekvence aminokyselin. Rodiny jsou dále rozděleny do podrodin. Každá podrodina metabolizuje odlišné skupiny substrátů, ale různé podrodiny mají značně se překrývající substrátovou specifičnost (Beusekom et al., 2010).

Rozmístění donorů a akceptorů vázaných vodíkovou vazbou v molekule substrátu se zdá být důležité pro určení místa metabolismu. Kromě toho tvar molekuly a její lipofilní charakter hrají roli v substrátové selektivitě CYP. Některé sloučeniny mohou být přeměňovány ve stejném místě své molekuly různými isoformami CYP, protože se rozsah lipofily může u různých isoform CYP překrývat (Lewis et al., 2004).

Některé z isoenzymů CYP jsou také isomerasami, dehydratasami, reduktasami nebo NO-synthetasami a také mohou katalyzovat oxidační štěpení esterů (Carlo & Rendic, 1997).

Reakční mechanismus:



RH může representovat širokou skupinu xenobiotik, zahrnujících léčiva, karcinogeny, pesticidy, ropné produkty a látky znečišťující životní prostředí (např. polychlorované bifenyly) a kromě toho také endogenní sloučeniny, např. některé steroidy, eikosanoidy, mastné kyseliny a retinoidy. Substráty jsou obvykle lipofilní a po následné hydroxylaci vzniknou hydrofilnější sloučeniny (Murray, 2003).

Exprese CYP je regulována řadou faktorů, mezi které patří například hormony, růstové faktory, cytokiny, chemokiny, patofyziologické podmínky, schopnost jater se regenerovat a věk. Některé studie ukázaly na regulaci exprese CYP v buněčném a orgánovém kontextu. Růstový hormon produkovaný hypofýzou je pak zodpovědný za rozdíl v expresi mezi pohlavími, avšak růstové faktory, zahrnující epidermální růstový faktor (EGF) a růstový faktor pro hepatocyty (HGF) také hrají roli v regulaci exprese enzymů metabolizujících léčiva. (Yun et al., 2010).

Jsou značné rozdíly v ontogenezi jednotlivých isoenzymů cytochromu P450. Ukazatele vývoje enzymové aktivity nemusí vždy odpovídat vývoji exprese mRNA (de Zwart et al., 2008).

Ukázalo se, že mnohé isoformy CYP mohou být regulovány xenobiotiky na transkripční úrovni. Zvyšující se množství xenobiotika způsobí zvýšení rychlosti transkripce genu pro CYP, jehož produkt zodpovídá za metabolismus tohoto xenobiotika. Tento rychle reagující mechanismus tedy vede k efektivnějšímu odstranění xenobiotika (Plant, 2006).

Inhibice CYP léčivy má opačný efekt než indukce ve farmakokinetice. Léčivo může inhibovat svůj vlastní metabolismus nebo častěji může docházet k oxidaci jiných léčiv.

Jednou z možností jak charakterizovat lidské CYP je podle jejich substrátů. Hladiny CYP, které metabolizují endogenní substráty, se bez biologických potíží výrazně nemění. Avšak hladiny CYP, podílejících se na metabolismu xenobiotik (zahrnujících i léčiva), se mohou měnit dramaticky. Jedním z důvodů měnící se aktivity

CYP je genetický polymorfismus, primárně na úrovni jednoduchého nukleotidového polymorfismu (SNPs) (Guengerich & Rendic, 2010).

Převažující isoformy zodpovědné za metabolismus xenobiotik jsou CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4, které metabolizují 80 – 90 % všech xenobiotik (Bharatam & Ramesh, 2012).

### CYP1A

Enzymy rodiny CYP1A jsou zodpovědné za aktivaci některých známých prokarcinogenních chemikálií ze životního prostředí, toxinů a toxických xenobiotik. Tato rodina obsahuje enzymy CYP1A1 a CYP1A2, které jsou ze 70 % identické v aminokyselinové sekvenci a zdají se být nejkonzervativnější identifikovanou rodinou. Zatímco fyziologické funkce CYP1A jsou neznámé, ví se, že jejich hladina v játrech a dalších tkáních se po narození rapidně snižuje a jejich aktivita zůstává jen v rychle se dělicích tkáních. Některá léčiva, která jsou substráty CYP1A (kofein, propranolol a paracetamol), induktory (omeprazol a lansoprazol) nebo inhibitory (cimetidin) této rodiny, mohou také interagovat s enzymy náležícími do jiných CYP rodin (Carlo & Rendic, 1997).

Všechny substráty, především velmi dobrý substrát CYP1A2 7-methoxyresorufin, mají relativně planární molekulu díky jejich aromatickému kruhovému systému. Všechny substráty obsahují donorové nebo akceptorové atomy vázané vodíkovou vazbou a nacházejí se na dost specifické vzdálenosti od místa metabolismu, pokud jde o počet “lehkých“ atomů ležících mezi nimi (Lewis et al., 2004).

Indukce této isoformy závisí na afinitě specifických sloučenin k Ah-receptoru. Stupeň odpovědi není kontrolován jen vazebnou afinitou, ale širokým spektrem abiotických a biotických faktorů (např. teplotou, pohlavím a dalšími), které mohou způsobit rozdílnou odpověď jednotlivců vystavených chemikáliím indukujícím tuto isoformu (Zanger et al., 1997).

### CYP2B

CYP2 je nejrozmanitější rodinou, která není velmi exprimována v játrech dospělých jedinců, avšak byly nalezeny relativně vysoké hladiny mRNA v několika

extrahepatálních tkáních. Exprese těchto enzymů ve fetálních játrech je pak sporná. CYP2B metabolizuje několik důležitých léčiv a chemikálií životního prostředí. Je všeobecně nalezena v játrech dospělých jedinců se značnými polymorfismy (Saghir 2012).

Pro mnoho substrátů CYP2B6 existuje dobrá korelace mezi jejich lipofilitou a vazebnou afinitou (Lewis et al., 2004).

### CYP3A

CYP3A je nejdůležitější enzym pro metabolismus léčiv u lidí. A to nejen díky jeho množství v játrech (které může být zvýšeno indukcí na více než 60 %), ale hlavně se podílí na metabolismu většiny léčiv se známými metabolickými cestami (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). Léčiva (dokonce malé molekuly) mají tendenci se stát většími k získání větší selektivity a předpokládá se tedy, že CYP3A4 se svým velkým aktivním místem bude frakcí s větším přispěním do metabolismu (Guengerich & Rendic, 2010).

Mnoho inhibitorů CYP3A enzymů jsou obvykle také substráty těchto enzymů, je mezi nimi tedy kompetice. Další inhibitory vyžadují k dosažení inhibičního působení metabolickou aktivaci. Po opakovaném podání některých inhibitorů (např. makrolidových antibiotik a kortikosteroidů) se může aktivita CYP3A indukovat. CYP3A enzymy také aktivují některé prokarcinogenní látky a složky potravy tvorbou reaktivních metabolitů (Carlo&Rendic, 1997).

#### **2.2.2 Glutathion-S-transferasa**

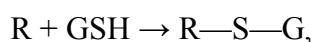
GST (EC 2.5.1.18) katalyzuje konjugaci GSH s elektrofilními sloučeninami, redukcí organických hydroperoxidů, podílí se na GSH-dependentní isomerizaci a váže proteiny k řadě lipofilních látek (Tee et al., 1992). GST jsou rodinou enzymů přítomných v rozpustné frakci mnoha tkání. Jsou to dimerní proteiny skládající se ze stejných nebo odlišných podjednotek. Substrátová specifita jednotlivých GST se příliš neliší a určité xenobiotikum tak může být konjugováno působením mnoha isoform (Carrillo et al., 1991). Jednotlivé isoenzymy se u dospělých potkanů liší orgánovou distribucí (Tee et al., 1992).

Každá jednotlivá podjednotka prochází rozdílnou expresí v průběhu vývoje. Exprese GSTM je v potkaních játrech nižší než exprese GSTA. V rámci rodiny alfa je

GSTA1 dominantnější u dospělých než u plodu, kde je hlavní isoformou GSTA2 (Saghir et al., 2012).

GST je klíčovým enzymem v procesu buněčné detoxikace. Katalyzuje nukleofilní adici glutathionu na toxické elektrofilní substráty a tím produkuje méně nebezpečné sloučeniny (Maurya & Rizvi, 2010). Glutathion ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyglycin) je tripeptid skládající se z glutamové kyseliny, cysteinu a glycinu (Murray, 2003). Regenerace GSH jako substrátu pro glutathionperoxidasu a glutathion-S-transferasu je katalyzována glutathionreduktasou (Ji et al., 1990).

Reakční mechanismus:



kde R je elektrofilní xenobiotikum.

Tento enzym je přítomen ve velkém množství v jaterním cytosolu, v menší míře pak v ostatních tkáních (Murray, 2003). Exprese GST v cytosolu je závislá na věku a pohlaví, u samců byla naměřena až třikrát vyšší aktivita tohoto enzymu s použitím různých substrátů. Jaterní cytosolická GST je indukována řadou xenobiotik a to jak přirozeně se vyskytujících tak syntetických. Patří mezi ně např. barbituráty, polycyklické aromatické uhlovodíky, arylmethany, antioxidanty (butylhydroxytoluen, butylhydroxyanisol), *trans*-stilbenoxid a přirozené složky potravy. Tyto induktory jsou selektivní pro podjednotku 1 a 3 (Banger et al., 1996).

GST hraje důležitou roli v detoxikaci metabolitů léčiv a karcinogenů, lipidů a DNA-hydroperoxidů. Podílí se také na vychytávání bilirubinu játry a intracelulárním transportu hemu a steroidních hormonů (Tee et al., 1992). GST tedy představuje důležitý obranný mechanismus proti určitým toxickým sloučeninám. Pokud hladina GSH v tkáních, (např. játrech) klesne, jsou tkáně náchylnější k poškození nejrůznějšími chemikáliemi, které by se za normálních okolností konjugovaly s GSH (Murray, 2003).

Glutathionový systém hraje také zásadní roli v buněčné obraně proti ROS. Účastní se v množství esenciálních buněčných reakcí zahrnujících enzymovou eliminaci  $H_2O_2$  a organických peroxidů za pomoci glutathionperoxidasy, udržování thiolových skupin proteinů v redukovaném stavu, transport aminokyselin přes membránu pomocí

$\gamma$ -glutamylvého cyklu a detoxikace cizorodých sloučenin pomocí GST (Kim et al., 2003).

### **2.3 Oxidační stres a antioxidační enzymy**

Oxidační stres je faktorem u mnoha nemocí, zahrnujících aterosklerózu, diabetes, rakovinu, neurodegenerativní a renální onemocnění a stejně tak stárnutí (Dostalek et al., 2008).

Stárnutí je nezastavitelný biologický proces vedoucí ke ztrátě funkcí a odolnosti ke stresu. Oxidační stres je nevyhnutelným následkem kyslíkového metabolismu u aerobních buněk a předpokládá se, že je jednou z hlavních příčin změn v průběhu stárnutí (Kim et al., 2003).

Zhoršování orgánových a buněčných funkcí s věkem je pravděpodobně spjato s tkáňovým poškozením indukovaným volnými radikály (VR). Je-li to pravda, pak intracelulární antioxidační enzymy mohou pracovat proti tomuto typu poškozování. Jestliže se antioxidační enzymová aktivita s rostoucím věkem snižuje, může to vést ke zrychlení procesu stárnutí (Kitani, 1994).

Oxidační stres vzniká, když produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) překročí kapacitu buněčné antioxidační ochrany, která odstraňuje tyto toxické sloučeniny. Organismus se pak dostává do stavu chronického oxidačního stresu. ROS jsou součástí normální fyziologie a mají řadu prospěšných funkcí. Jsou zahrnuty v buněčné signalizaci a ochraně proti environmentálnímu poškození jak biologickému tak chemickému (Dostalek et al., 2008; Ramesh et al., 2012). ROS také indukují oxidační stres v průběhu zánětu. Nitrosový stres může díky interakci mezi nitroso-sloučeninami a oxidanty vytvářet sloučeniny, které jsou toxičtější než samotné reaktanty způsobující především oxidační buněčné poškození (Vishwas et al., 2013).

Cytochrom P450 se zdá být hlavním zdrojem ROS, dalšími zdroji jsou pak NADPH-oxidasa, xanthinoxidasa a mitochondriální dýchací řetězec. Biochemie oxidačního stresu zahrnuje mnoho tkání (Dostalek et al., 2008).

Mitochondrie, které jsou dle studií jedním z hlavních zdrojů buněčných ROS, jsou také jedny z nejpoškozenějších organel v průběhu stárnutí. Toto poškození je důsledkem zvýšené kyslíkové produkce, pravděpodobně kvůli změnám aktivity

klíčových komponentů respiračního řetězce. Bylo demonstrováno, že oxidační poškození mitochondrie je příčinnou vzestupu rychlosti produkce peroxidu vodíku a zhoršení mitochondriální respirační aktivity (Bakala et al., 2012). Určitý podíl oxidačního poškození se odehrává i za normálních podmínek, avšak podíl tohoto poškození vzrůstá v průběhu procesu stárnutí, zatímco antioxidantní a reparační mechanismy klesají (Maurya & Rizvi, 2007). Jsou zde ale také názory, že aktivita antioxidantních enzymů nemusí s věkem nutně klesat (Kitani, 2004).

Na stárnutí se tedy můžeme dívat jako na proces irreverzibilních změn asociovaných s akumulací těchto oxidačních poškození v buňce. Podle radikálové teorie stárnutí, která postuluje, že rozpětí života je limitováno schopností organismu vypořádat se s poškozením způsobeným reakcemi volných radikálů, by se dalo předpokládat, že aktivita antioxidantních enzymů bude nižší ve tkáních starých zvířecích jedinců. Nápadný pokles v aktivitě antioxidantních enzymů s věkem byl zaznamenán u postmitotických buněk, především u stálých postmitotických buněk, např. buněk oční čočky. U normálně se dělících buněk byla aktivita antioxidantních enzymů pozorována vyšší nebo nižší v závislosti na tkáni nebo věku studovaného zvířete (Ji et al., 1990).

Korelace mezi antioxidantní kapacitou a oxidačním poškozením v průběhu stárnutí byla popsána v mnoha tkáních u různých živočišných druhů (Maurya & Rizvi, 2010). Poškození orgánových tkání oxidačním stresem je dokázáno elevací biomarkerů v séru stárnoucích potkanů. Byl např. pozorován značný pokles aktivity ALT, AST a koncentrace kreatininu (Ramesh et al., 2012).

Mnoho detoxikačních eliminačních mechanismů není při narození plně vyvinuto. Tyto mechanismy podstupují zrání, kdy se eliminační charakteristiky konstantně mění v průběhu postnatální periody (Alcorn & Elbarbry, 2009).

Je zde možnost, že jaterní detoxikační systém může být srovnatelný u mladých a starých jedinců, pokud se nacházejí ve stavu zdraví. Avšak když jsou vystaveni nepříznivým podmínkám, (např. malnutrici, infekci a nemocem), stává se detoxikační systém u starších méně efektivní než u mladých, což vede k vyšší incidenci možných závažných dopadů hepatotoxicity léčiv (Kitani, 1994).

Univalentní redukcí kyslíku vzniká řada cytotoxických kyslíkatých sloučenin, jako jsou superoxidový anion radikál ( $O_2^-$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a hydroxylový



radikál (OH<sup>•</sup>). Tyto vysoce reaktivní sloučeniny mohou být příčinou rozsáhlého buněčného poškození zahrnujícího peroxidaci lipidů, inaktivaci enzymů, změnu intracelulárního oxidačně-redukčního stavu, poškození DNA, zesílení apoptotických signálů a glykoxidaci. Závěry studií ukazují na příčinnou souvislost mezi hyperglykemií indukovanou produkcí ROS a intracelulární tvorbou koncových produktů pokročilé glykace (Bakala et al., 2012; Ozturk & Gumuslu, 2004; Ramesh et al., 2012).

Zvyšující se koncentrace poškozených intracelulárních proteinů je také připisována oxidačnímu stresu. Proteiny jsou rozpoznávány jako hlavní cíle oxidační modifikace. Akumulace oxidovaných proteinů je charakteristickým znakem stárnoucích buněk, které byly nalezeny v mnoha experimentálních modelech stárnutí. U mladých jedinců jsou přiměřeně oxidované rozpustné buněčné proteiny selektivně rozpoznávány a rychle degradovány v proteasomu. Akumulace proteinů v souvislosti s věkem může být následkem snížené aktivity proteasomu (Wauthier et al., 2004).

Savčí buňky jsou vybaveny neenzymovou a enzymovou antioxidační obranou k odstranění ROS. Neenzymová obrana zahrnuje široké množství sloučenin jako  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E),  $\beta$ -karoten a kyselinu askorbovou (vitamin C), enzymová ochrana je pak tvořena superoxiddismutasou (SOD), katalasou (CAT) a glutathionperoxidasou (GPx). Glutathion-*S*-transferasa (GST), konjugační enzym 2. fáze biotransformace, katalyzuje konjugaci glutathionu (GSH) s různými organickými lipoperoxidy za vzniku sloučenin rozpustnějších ve vodě (Ji et al., 1990).

V mitochondrii SOD rychle redukuje  $O_2^{\cdot-}$  na  $H_2O_2$ , tento je dále převeden v přítomnosti iontů přechodných kovů (železa nebo mědi) na škodlivější  $OH^{\cdot}$ .  $H_2O_2$  může být neutralizován enzymovými vycytávači. CAT rozkládá  $H_2O_2$  na vodu a molekulární kyslík, zatímco GPx ho redukuje na vodu za současné oxidace molekuly GSH (Bakala et al., 2012).

GSH je také substrátem pro konjugační reakce katalyzované GST. Kromě toho je samotný GSH ve své redukované formě silný antioxidant. Koncentrace GSH může být důležitým indikátorem procesu stárnutí v játrech, eventuálně v celém organismu, u specifických modelů zvířat. U potkanů kmene F-344 ale studie ukázaly, že koncentrace GSH v játrech u samců se s věkem nezměnila. Je také známo, že koncentrace GSH se vyznačuje denními rytmy (Kitani, 2004).

Antioxidační enzymy také hrají zásadní roli v ochraně samčích zárodečných buněk proti oxidačnímu poškození (Mueller et al., 1998). Mnoho škodlivých sloučenin, zahrnujících karcinogeny, pesticidy a léčiva, je v játrech atakováno a oxidováno cytochromem P450, který náleží do první fáze biotransformace xenobiotik. Oxidace některých sloučenin je následována adicí funkční skupiny, která může být atakována enzymy druhé fáze biotransformace, které katalyzují konjugaci vysoce polární skupiny k nově přidané funkční skupině. Nejdůležitějším enzymem této druhé fáze je pak GST (Banerjee et al., 2007). Rovnováha mezi CYP, GSH a GSH-vázajícími enzymy může ovlivňovat toxikologické výstupy (Alcorn & Elbarbry, 2009).

Pro tělo náročný fyzický výkon představující metabolický stres, probíhající při zvýšené produkci ROS, je zvýšen díky narůstající spotřebě kyslíku. Existují důkazy, že aktivita některých antioxidačních enzymů v kosterních svalech a erytrocytech roste v odpovědi na akutní námahu u mladých zvířat. Zda je pozorované zvýšení aktivity antioxidačních enzymů důsledkem aktivace enzymů nebo změnou v obratu proteinů, není jisté. Adaptace mnoha antioxidačních enzymů tréninkem byla v literatuře popsána (Ji et al., 1990).

Dále uvádím stručnou charakteristiku antioxidačních enzymů, jejichž aktivity jsem stanovovala v experimentální části této práce.

### **2.3.1 Superoxiddismutasa**

Superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) katalyzuje dismutaci superoxidového anion radikálu ( $O_2^{\cdot-}$ ) na peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) (Maurya & Rizvi, 2007). SOD je enzym, který obsahuje kov jako katalyzátor a maximalizuje jeho schopnost vyvolat dismutaci superoxidového radikálu a zároveň zamezuje nechtěným vedlejším reakcím. Superoxidový radikál oxiduje [4Fe-4S] prostetickou skupinu dehydratás konstantní rychlostí blízkou  $10^8 M^{-1}s^{-1}$ . Tato univalentní oxidace destabilizuje [4Fe-4S], který se následně rozpadne, uvolní Fe(II) a inaktivuje enzymy, které jsou na něm závislé. Uvolněné Fe(II) může redukovat  $H_2O_2$  na  $HO^-$  a  $HO^{\cdot}$  (hydroxylový radikál), což je velmi silný a substrátově nespecifický oxidant. Uvolněný kov může být redukován buněčnými reduktanty (např. GSH) a následně může katalyzovat redukci  $H_2O_2$ . Je pravděpodobnější, že Fe(II) se bude vázat na nukleové kyseliny, proteiny a membrány, způsobí uvolnění  $HO^{\cdot}$  a vyústí v preferenční poškození těchto tkání (Banerjee et al., 2007).

SOD kontroluje proces peroxidace lipidů volnými radikály (LPO). Tento proces hraje důležitou roli v narušení funkce buněčného systému. Ukázalo se, že aktivace LPO systému v játrech je pozorována nejen za patologických podmínek, ale i za normálních fyziologických podmínek a dokonce v raných stádiích postnatálního vývoje. Intensita LPO v buněčných organelách potkaních jater klesá s věkem a současně se zvyšuje NADPH-dependentní a SH-dependentní antioxidační obrana cytosolu. Předpokládá se, že LPO v buňkách na různých úrovních vývoje a stáří nevede k indukci patologických změn, pokud je pod efektivní kontrolou antioxidačních enzymů (Lankin et al., 1981).

### 2.3.2 Katalasa

Katalasa (CAT, EC 1.11.1.6) je enzym, který metabolizuje  $H_2O_2$  na  $H_2O$  a  $O_2$ . Oxidační stres je primární faktor regulující expresi tohoto enzymu, mezi další regulační faktory patří zánět, hormonální regulace a stárnutí (Maurya & Rizvi, 2007).

Katalasa má klíčovou roli v antioxidační obraně. Při jejím zavedení do mitochondrie poskytuje lepší ochranu než cytosolická exprese katalasy proti  $H_2O_2$ -vyvolaným lézím způsobujícím buněčnou smrt a oxidačnímu poškození. Katalasa se stává významnější v cytoprotekci proti oxidačnímu stresu, který v mnoha případech zahrnuje depleci glutathionu. Vykazuje jednu z nejvyšších rychlostí obratu ze všech známých biologických enzymů, což podporuje její fyziologickou roli v odstraňování vysokých hladin  $H_2O_2$ . Snížení její aktivity může poškodit celý obranný systém antioxidačních enzymů, protože  $H_2O_2$  se ukázal být silným inhibitorem aktivity superoxidodismutasy. Inaktivace katalasy tedy může vést k oxidačnímu poškození nejen přímo přes  $H_2O_2$  a jeho deriváty, ale také nepřímo díky inhibici SOD, vedoucí ke zvýšení hladiny superoxidových radikálů.

Katalasa se zdá být jediným antioxidačním enzymem značně glykovaným u starých potkanů. Glykovaná katalasa vykazuje ztrátu antigenicity, což vede k narušení povrchové ochrany tohoto enzymu, jejímu částečnému rozložení následovanému ztrátou její funkce (Bakala et al., 2012).

Monofunkční katalasy můžeme rozdělit do tří skupin, které spolu vzájemně nesouvisejí ve smyslu aminokyselinové sekvence. Dvě skupiny obsahují hemové železo, zatímco třetí má v aktivním místě dvojjaderný Mn(II). Mechanismus účinku hemové

katalasy zahrnuje oxidaci hemového železa peroxidem vodíku na Fe(IV) porfyrin kation radikál, který je následně redukován další molekulou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Banerjee et al., 2007).

### 2.3.3 Peroxidas

Peroxidas (Px, EC 1.11.1) jsou velmi rozšířenou skupinou enzymů (např. cytochrom-c-peroxidasa, glutathionperoxidasa, katalasa-peroxidasa), které katalyzují redukcí H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, organických hydroperoxidů (ROOH) a peroxynitritů. Tyto enzymy se podílejí nejen na detoxikaci peroxidů, ale také na proliferaci, diferenciaci a apoptóze.

Všechny cysteinové peroxidasy (např. peroxiredoxiny) katalyzují první krok v redukcí peroxidů, během nějž jsou peroxidy redukovány thiolovou skupinou cysteinu v aktivním centru enzymu za vzniku odpovídajícího alkoholu nebo vody v případě peroxidu vodíku. Thiolová skupina cysteinu je během toho oxidována za vzniku sulfenové kyseliny (R-SOH) (Banerjee et al., 2007). Thioredoxinový systém, zahrnující thioredoxinreduktasu a thioredoxiny, slouží jako donor elektronů řadě enzymů, např. ribonukleotidreduktase, methioninsulfoxidreduktase a peroxiredoxinům. Peroxiredoxiny se mohou chovat jako antioxidanty, protože rychle regulují množství peroxidu vodíku. Redoxní stav thioredoxinů ovlivňuje membránovou permeabilitu v mitochondrii, kontroluje signalizační cestu MAP-kinasy v cytosolu a reguluje vazbu transkripčních faktorů v jádru (Bindoli et al., 2008).

Mezi hlavní savčí hemové peroxidasy patří myeloperoxidasa, eosinofilperoxidasa a laktoperoxidasa. Mezi jejich fyziologicky významné organické substráty patří řada endogenních sloučenin (např. Tyr, askorbát, steroidní hormony). Podílí se také na bioaktivaci xenobiotik a léčiv, což může v důsledku vést k agranulocytóze, hepatotoxicitě a rakovině. Dostupnost peroxidu vodíku pro oxidaci zprostředkovanou peroxidasami je rozhodující faktor určující rozsah oxidace. Množství peroxidu vodíku závisí především na jeho obsahu uvnitř buněk a na aktivitě enzymů, které tento substrát hemových peroxidas odstraňují a tím s peroxidasami kompetují (Davies et al., 2008).

Protože H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a další oxidanty jsou produkovány nejen obvyklými aerobními procesy, ale také jako výsledek aktivace různých receptorů na buněčném povrchu (jsou tedy důležitými intracelulárními posly) a katalytická aktivita peroxidas slouží k jejich odstranění, předpokládá se tedy, že tyto enzymy vystupují jako regulátory signalizace

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Změněná exprese peroxidázy v buňce může tedy ovlivnit intracelulární hladinu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produkovaného po buněčné stimulaci epidermálním růstovým faktorem, destičkovým růstovým faktorem, nebo tumor nekrotizujícím faktorem- $\alpha$  (Banerjee et al., 2007).

### 3. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo sledování změn v aktivitě několika biotransformačních a antioxidačních enzymů a v expresi GST v játrech potkanů v souvislosti s věkem. Jednotlivými cíli byly:

1. Stanovení specifických aktivit CYP1A1, CYP1A2, CYP2B a CYP3A v mikrosomálních frakcích získaných z jater mladých (6 týdnů) a starých (21 měsíců) potkanů a porovnání získaných výsledků mezi těmito skupinami.
2. Stanovení specifické aktivity GST, SOD, CAT a Px v cytosolických frakcích získaných z jater mladých (6 týdnů) a starých (21 měsíců) potkanů a porovnání získaných výsledků mezi těmito skupinami.
3. Zjištění exprese proteinu GST v cytosolických frakcích získaných z jater mladých (6 týdnů) a starých (21 měsíců) potkanů pomocí imunoblottingu se specifickou protilátkou proti GST alfa a porovnání získaných výsledků mezi těmito skupinami.

## 4. MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Chemikálie

96 % ethanol	Dr. Kulich Pharma
35 % HCl	Penta
30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Penta
4% CuSO <sub>4</sub> . 6H <sub>2</sub> O (roztok B)	Sigma Aldrich
97 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Lachema
1-chloro-2,4-dinitrobenzen	Sigma Aldrich
2- merkptoethanol	Sigma Aldrich
Akrylamid (AA)	Sigma Aldrich
Benzyloxyresorufin 0,5 mM v DMSO (BROD)	Sigma Aldrich
Bis-akrylamid (bis-AA)	Sigma Aldrich
Bovinní sérový albumin	Bio Rad
Bromfenolová modř (BFM)	Sigma Aldrich
Dodecylsíran sodný (SDS)	BDH Chemicals
Ethoxyresorufin 0,5 mM v DMSO (EROD)	Sigma Aldrich
Glycerol	Dr. Kulich Pharma
Goat polyclonal to glutathion-S-transferasa alpha [ab 53940]	Abcam
Chemiluminiscenční substrát Duo Lux	Vector Lab.
Isobutanol	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Penta
Methanol	Penta
Methoxyresorufin 0,5 mM v DMSO (MROD)	Sigma Aldrich
MgCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
Molybdenan amonný ((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O)	Lachema
Mouse monoclonal to beta actin [ab 8226]	Abcam
Mouse IgG secondary antibody, H&L, [ab 6729]	Abcam
NaCl	Penta
NADPH	Merck

NaHCO <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , BCA v 0,1 M NaOH (roztok A)	Sigma Aldrich
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12 H <sub>2</sub> O	Penta
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	Penta
Negativní vývojka FOMADON LQN	FOMA BOHEMIA
O-fenylendiamin dihydrochlorid (OPD)	Sigma Aldrich
Pentoxoresorufin 0,5 mM v DMSO (PROD)	Sigma Aldrich
Persíran amonný (APS)	Sigma Aldrich
Rabbit polyclonal secondary antibody to goat IgG, H&L (AP), [ab 97097]	Abcam
Redestilovaná voda	Katedra biochemických věd FaF
Redukovaný glutathion	Sigma Aldrich
Resorufin 0,47 mM v DMSO	Sigma Aldrich
Roztok BSA 0,1 %	Sigma Aldrich
SOD Assay Kit – WST	Dojindo Molecular Technologies
Temed	Sigma Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Sigma Aldrich
Triton X-100	Fluka
Tween	Sigma Aldrich
Univerzální rychloustalovač FOMA FIX	FOMA BOHEMIA

#### **4.2 Pomůcky a přístroje**

96-jamková mikrotitrační destička  
Analytické váhy Sartorius  
Automatické pipety Eppendorf Research  
Bílé houbičky, filtrační papíry 8 × 10 cm BioRad  
Blotovací vanička  
Centrifugační kyvety na 50 ml  
Centrifuga Beckman  
Centrifuga Heraeus  
Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415 D  
Digitální váhy Sartorius



Erlenmeyerova baňka  
Falkonky 50 ml a 15 ml  
Filmy Cl-Xposure Film Thermo Scientific  
Fotomisky  
Fotopinžeta  
Gel Doc  
Homogenizátor 30 ml s pístem POTTER S  
Injekční stíkačka s jehlou  
Kazeta k chemiluminiscenční detekci Hypercassette Amersham Biosciences  
Kyveta s míchátkem  
Kývačka  
Ledítko, nerezové misky, klínky  
Míchačka MS2 Minishaker, IKA, míchadlo  
Míchačka Heidolph, MR Hei-Mix S  
Multikanálová pipeta Eppendorf Research  
Nalévací stojánek  
Nitrocelulózová membrána Bio Rad  
Nůžky, pinžeta, buničina, misky  
Odměrné baňky  
Parafínový film  
Petriho misky  
pH metr ino Lab pH level 2  
Počítačový program Flwinlab  
Počítačový program Magellan  
Skla, skla se spacerem  
Skleněné kádinky  
Sonikační homogenizátor Bandelin SONOPULS  
Sorvall Ultracentrifuge  
Spektrofluorimetr Perkin Elmer LS 50 B  
Spektrofotometr TECAN INFINITE M200  
Spony, hřeben, stojánek na elektroforézu  
Stojánky s eppendorfkami  
Termomixer comfort Eppendorf  
Třepačka

Ultrazvuková lázeň VWR Ultrasonic cleaner

UV-VIS spektrofotometr HELIOS  $\beta$

UV-VIS transparentní kyvety

Vanička, nanášecí blok, ledová lázeň

Vyhřívaná vodní lázeň HAAKE DC 10

Zamrazovací stojánky

Zdroj napětí Bio Rad Power pack

### **4.3 Příprava subcelulárních frakcí**

Potkání samci kmene Wistar, věk 6 týdnů a 21 měsíců (6 jedinců v každé skupině).

Tab. 1: Hmotnost jednotlivých potkanů a jejich jater

Číslo potkana	Mladí potkani (*16.6.2011)		Staří potkani (*1.2.2009, †1.11.2010)	
	Hmotnost (g)	Hmotnost jater (g)	Hmotnost (g)	Hmotnost jater (g)
1	260	10,48	620	23,37
2	260	10,23	710	23,62
3	220	11,92	800	18,83
4	220	11,20	610	13,74
5	220	10,14	780	23,88
6	220	11,21	680	19,24

### **Metodika**

0,1 M Na-fosfátový pufr pH 7,4 – připravila jsem si 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (navážku 35,8 g jsem rozpustila v 1000 ml redestilované vody) a 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (navážku 3,9 g jsem rozpustila v 250 ml redestilované vody). Poté jsem oba roztoky smíchala dohromady tak, aby výsledné pH bylo 7,4 (kontrola na pH metru). K části tohoto pufru jsem přidala 85% glycerol tak, aby výsledná koncentrace glycerolu v pufru byla 20 %.

Potkani byli zabiti dekapitací v celkové anestezii a byla jim vyjmuta játra, která byla do doby zpracování uchovávána ve Freezru při  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Centrifugy spolu s rotory jsem dala vychladit. Játra jsem rozvážila do malých mističek (umístěných na ledítku) po

5,1 g. Játra jsem v chladicím boxu rozstříhala na menší kousky a přenesla do 30 ml homogenizátoru, naplněného do 1/3 ledem, zbytek vodou. K játrům jsem přidala 15 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru pH 7,4, zhomogenizovala (5 × pohybem pístu nahoru a dolů), přelila do centrifugační kyvety, píst a homogenizátor jsem vypláchla 15 ml pufru a ten přilila do centrifugační kyvety. První točení probíhalo v centrifuze Heraeus s použitím rotoru #3335 po dobu 20 minut, při teplotě 4 °C rychlostí 5.000 g. Peletu (usazená na dně kyvety), kterou tvořily potrhané buněčné membrány, vazivo, cévy a jádra jsem po slití supernatantu zlikvidovala. Supernatant jsem přelila do čistých kyvet, které jsem dala předtím vychladit a stočila jsem je ve stejném rotoru po dobu 60 minut, při teplotě 4 °C rychlostí 20.000 g. Peletu z druhého točení, kterou tvořily mitochondrie, jsem zlikvidovala. Supernatant z druhého točení jsem slila do vychazených centrifugačních kyvet pro ultracentrifugu Beckman a Sorvall, kaly jsem vylila do odpadu. Kyvety jsem plnila maximálně do tří čtvrtin, vždy dvě proti sobě jsem včetně víčka vyvážila. Kyvety jsme vložila do rotoru, přišroubovala k centrifuze a nechala točit po dobu 65 minut, při 4 °C, rychlostí 105.000 g.

**Cytosol** (supernatant) jsem získala po třetím točení a za stálého míchání jsem ho rozpipetovala v chladicím boxu do eppendorfek po 1 ml.

Peletu ze třetího točení jsem pomocí skleněné tyčinky resuspendovala v 30 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru pH 7,4, kyvety jsem vyvážila a dala znovu stočit do centrifugy Beckman na 65 minut, při teplotě 4 °C, rychlostí 105.000 g. Po skončení jsem supernatant vylila a k peletě (**mikrosomy**) jsem přidala 5 ml pufru s 20 % glycerolu. Pomocí sonikačního homogenizátoru nebo ultrazvukové lázně jsem peletu zhomogenizovala a v chladicím boxu za stálého míchání rozpipetovala po 330 µl do eppendorfek. Cytosol i mikrosomy jsem dala zmrazit do freezru na -80 °C.

#### **4.4 Stanovení aktivity jednotlivých isoform cytochromu P450**

Princip metody: Metoda je založená na přidání relativně specifického substrátu pro určitou isoformu CYP. Substrát je metabolizován na fluoreskující produkt resorufin, následně je měřen přírůstek fluorescence na spektrofluorimetru.

##### Metodika

Připravila jsem si 1 M HCl (8,83 ml 35% HCl jsem doplnila do 100 ml redestilovanou vodou). Následně jsem rozpustila 6,06 g TRISu ve 300 ml redestilované



A	Intenzita začátku přidavku resorufinu
B	Intenzita konce přidavku resorufinu
n	Látkové množství standartního přidavku resorufinu v 1 ml (47 pmol)
D	Zředění mikrosomů v 1 ml
60	Přepočet na minuty

#### **4.5 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy**

Princip metody: V přítomnosti GST se tvoří z 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) a glutathionu (GSH) konjugát *S*-2,4-dinitrofenylglutathion, jehož přírůstek za minutu se stanovuje spektrofotometricky při 340 nm.

#### **Metodika**

Vzorky cytosolu jsem rozmrazila a naředila 0,1 M Na-fosfátovým pufrům pH 7,4 v rozmezí 5 – 10 ×. Navážila jsem 30,4 mg CDNB a rozpustila za pomoci ultrazvukové lázně v 1,5 ml 96 % ethanolu ve 2 ml eppendorfci. Navážila jsem 46,1 mg GSH a rozpustila za pomoci třepačky v 1,5 ml redestilované vody. Připravila jsem 0,1 M Na-fosfátový pufr pH 6,5 rozpuštěním 3,58 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O ve 100 ml redestilované vody a 1,58 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O ve 100 ml redestilované vody a jejich následným smísením v poměru asi 1:3 za kontroly pH na pH-metru.

Nastavila jsem si spektrofotometr na měření při 340 nm, počet cyklů byl 4, každý cyklus trval 60 s, prvních pět kyvet byly vzorky a další dvě kyvety slepé vzorky. V kádince jsem si připravila reakční směs pro všech 7 kyvet najednou. Do této směsi jsem dávala 8 × 10 μl CDNB, 8 × 10 μl GSH, množství fosfátového pufru pak v závislosti na pipetovaném objemu:

Potkan mladý (1–6) 8 × 979 μl pufru pH 6,5 (cytosol předem 10× naředěn fosfátovým pufrům pH 7,4) → pipetovaný objem vzorku byl 1 μl

Potkan starý (1–6) 8 × 978 μl pufru pH 6,5 (cytosol předem 30× naředěn fosfátovým pufrům pH 7,4) → pipetovaný objem vzorku byl 2 μl

Do kyvet jsem napipetovala příslušné množství reakční směsi (998  $\mu\text{l}$  nebo 999  $\mu\text{l}$ ), poté jsem přidala do kyvet č. 1 – 5 buď 1  $\mu\text{l}$  nebo 2  $\mu\text{l}$  vzorku, do kyvet č. 6 – 7 odpovídající množství pufru pH 6,5 (slepé vzorky). Kyvety jsem za pomoci parafinového filmu několikrát překlopila a vložila do spektrofotometru. V každém měření bylo použito 5 paralelních vzorků jednoho cytosolu, od kterých se následně odečítala absorbance slepých vzorků. Poměr konjugovaného substrátu jsem vypočítala z odečtené absorbance po 60 sekundách s použitím extinkčního koeficientu  $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  při 340 nm. Jednotka enzymové aktivity U je definována jako množství enzymu katalyzující přeměnu 1  $\mu\text{mol}$  S-2,4-dinitrofenylglutathionu za 1 minutu (s použitím 1 mM GSH a 1 mM CDNB).

Výpočet:

$$A = A_{\text{vz}} - A_{\text{sl}}$$

$$c = A / \varepsilon \times l$$

$$U = c \times V \times zř$$

A	Absorbance
$A_{\text{vz}}$	Absorbance vzorku
$A_{\text{sl}}$	Absorbance slepého vzorku
c	Látková koncentrace ( $\mu\text{mol/l}$ )
$\varepsilon$	Extinkční koeficient ( $9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
l	Objem reakční směsi (1 ml)
U	Aktivita ( $\mu\text{mol/min}$ )
V	Objem reakční směsi na litr (0,001)
zř	Zředění

#### 4.6 Stanovení aktivity superoxiddismutasy

Princip metody: Z vysoce voděrozpustné tetrazolinové soli WST-1 vzniká redukcí superoxidovým aniontem ve vodě rozpustný formazan. Rychlost redukce WST-1 je přímo úměrná aktivitě xanthinoxidasy. Redukce je inhibována SOD.

##### Metodika

Kit obsahuje tyto roztoky:

- WST roztok
- Pufrovací roztok
- Enzymový roztok
- Pufr na ředění

Rozmražené vzorky cytosolů jsem naředila 50× 0,1 M Na-fosfátovým pufrém pH 7,4. Pracovní roztok WST jsem připravila zředěním 1 ml WST roztoku s 19 ml pufrovacího roztoku. Enzymový pracovní roztok jsem připravila smícháním 15 µl enzymového roztoku (předem zcentrifugovaného po dobu 5 sekund) s 2,5 ml pufru na ředění.

Tab. 2: Postup na 96-jamkové destičce

	<b>Vzorek</b> [µl]	<b>Blank 1</b> [µl]	<b>Blank 2</b> [µl]	<b>Blank 3</b> [µl]
<b>Roztok vzorku</b>	20		20	
<b>Redestilovaná voda</b>		20		20
<b>WST pracovní roztok</b>	200	200	200	200
<b>Pufr na ředění</b>			20	20
<b>Enzymový pracovní roztok</b>	20	20		

Vše kromě vzorků jsem pipetovala multikanálovou pipetou. Destičku jsme inkubovali v Thermomixeru při 37 °C po dobu 20 minut. Absorbanci jsem změřila na přístroji Tecan při vlnové délce 450 nm.

##### Výpočet

$$c = [(A_{b11} - A_{b13}) - (A_{vz} - A_{b12})] / \epsilon \times l$$

$$n = c \times V$$

$$a = n / v \times zř$$

c	Koncentrace formazanu (M)
A <sub>bl1</sub>	Absorbance blanku 1
A <sub>bl3</sub>	Absorbance blanku 3
A <sub>vz</sub>	Absorbance vzorku
A <sub>bl2</sub>	Absorbance blanku 2
ε	Extinkční koeficient (37000 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
l	Výška reakční směsi v jamce (0,9 cm)
n	Látkové množství (mol)
V	Objem reakční směsi v jamce (ml)
a	Aktivita (mol/ml/min)
v	Objem vzorku v jamce (20 μl)
zř	Zředění vzorků

#### **4.7 Stanovení aktivity katalasy**

Princip metody: Molybdenan amonný vytváří s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> žlutý komplex, jehož absorbance se měří při vlnové délce 405 nm. Katalasa přeměňuje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na H<sub>2</sub>O a tím snižuje množství peroxidu vodíku dostupného pro tvorbu komplexu, dochází tedy k poklesu absorbance.

#### **Metodika**

Navážila jsem si 10,47 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O a rozpustila v 500 ml redestilované vody, poté jsem si navážila 4,08 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a rozpustila v 500 ml redestilované vody v odměrné baňce. Oba roztoky jsem postupně smísila do dosažení hodnoty pH 7,4 za kontroly na pH metru. Do 20 ml takto připraveného sodno-draselného fosfátového pufru jsem napipetovala 152,4 μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Navážila jsem 0,8 g molybdenanu amonného



((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O) a rozpustila ve 20 ml redestilované vody. Vzorčky jsem po rozmražení zředila připraveným sodno-draselným fosfátovým pufrům pH 7,4 (cytosol 150× a mikrosomy 50×).

Tab. 3: Postup na mikrotitrační destičce (vše kromě frakcí jsem pipetovala multikanálovou pipetou)

	Blank 1	Vzorek	Blank 2	Blank 3
1.	100 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µl pufru
2.	100 µl molyb.	20 µl frakce	20 µl pufru	20 µl pufru
3.	1 minutová inkubace při 37 °C, současně třepání			
4.		100 µl molyb.	100 µl molyb.	100 µl molyb.
5.	1 minutu nechat stát			
6.	20 µl frakce			
7.	změření absorbance při 450 nm			

Frakce do blanku 1 je třeba pipetovat co nejrychleji. Bublínky unikajícího kyslíku jsem se snažila sklepat nebo propíchat drátkem. Každý vzorek jsem pipetovala paralelně do tří jamek, stejně tak blank 1.

#### Výpočet aktivity katalasy

$$[U/ml] = (A_{bl1} - A_{vz}) / (A_{bl2} - A_{bl3}) \times 390 \times zř$$

U Aktivita (µmol/min)

A<sub>vz</sub> Absorbance vzorku

A<sub>bl1</sub> Absorbance blanku 1

A<sub>bl2</sub> Absorbance blanku 2

A<sub>bl3</sub> Absorbance blanku 3

zř Zředění frakce (150× nebo 50×)



c	Látková koncentrace (mol/l)
$\epsilon$	Extinkční koeficient ( $1100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
l	Výška reakční směsi v jamce (0,5 cm)
n	Látkové množství (mol)
V	Objem reakční směsi v jamce (125 $\mu\text{l}$ )
a	Aktivita (kat)
t	Čas (1800 sekund)
zř	Zředění ( $10\times$ )

#### **4.9 Elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)**

Princip metody: V akrylamidovém gelu dochází k separaci nabitých molekul proteinů podle jejich velikosti. Proteiny jsou nuceny elektrickým proudem pohybovat se po matrix gelu, následně dochází k jejich oddělení.

##### Metodika

##### Příprava zásobních roztoků

4 M HCl – do 150 ml redestilované vody jsem přilila 88 ml 35 % HCl. Poté jsem ji doplnila vodou do celkového objemu 250 ml.

Zásobní roztok AA + bis AA – pracujeme v rukavicích. Navážila jsem 30 g akrylamidu a 0,8 g bis-akrylamidu, které jsem rozpustila v malém množství redestilované vody na míchačce. Po rozpuštění jsem doplnila objem v odměrné baňce do 100 ml.

1,5 M TRIS-HCl pufr, pH 8,8 – navážila jsem 18,5 g TRISU a rozpustila v 75 ml redestilované vody. Pomocí pH metru jsem upravila pH na 8,8 (přidáním cca 5 – 6 ml 4 M HCl). V odměrné baňce jsme pak doplnila objem do 100 ml.

0,5 M TRIS-HCl pufr, pH 6,8 – navážila jsem 6 g TRISU a rozpustila v 75 ml redestilované vody. Pomocí pH metru jsem upravila pH na 6,8 (přidáním cca 7 – 8 ml 4 M HCl). V odměrné baňce jsem pak doplnila objem do 100 ml.

10 % SDS – navážila jsem 10 g SDS a rozpustila v 80 ml redestilované vody. Po rozpuštění jsem doplnila objem v odměrné baňce do 100 ml.

0,5 % Bromfenolová modř – navážila jsem 50 mg BFM a přidala 10 ml redestilované vody.

Koncentrovaný elektrodový pufr – navážila jsem 72 g glycinu, 15 g TRIS, 5 g SDS a vše jsem rozpustila v 900 ml redestilované vody. Pomocí pH metru jsem upravila pH na 8,3 (přidáním 4 M HCl). V odměrné baňce jsem doplnila objem do 1000 ml.

Zásobní vzorkový pufr – smíchala jsem 1,3 ml redestilované vody; 1,0 ml 0,5 M TRIS-HCl pufru pH 6,8; 2,0 ml glycerolu; 3,0 ml 10 % SDS; 0,6 ml 0,5 % BFB

Isobutanol nasycený vodou – smíchala jsem čistý isobutanol s redestilovanou vodou. V horní vrstvě je isobutanol nasycený vodou.

#### Příprava pracovních roztoků

10 % APS – 20 mg persíranu amonného jsem těsně před použitím rozpustila ve 200  $\mu$ l redestilované vody.

#### Separáční gel 12,5 % (spodní) – na dva gely

Redestilovaná voda	3,2 ml
1,5 M TRIS-HCl pufr pH 8,8	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml
Roztok AA+bis AA	4,2 ml
→ iniciace polymerace	
Roztok APS	58 $\mu$ l
TEMED	4 $\mu$ l

#### Zaostřovací gel 4 % (horní) – na dva gely

Redestilovaná voda	3,126 ml
0,5 M TRIS-HCl pufr pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS	0,05 ml
Roztok AA+bis AA	0,5 ml
→ iniciace polymerace	
Roztok APS	100 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l

Elektrodový pufr – 70 ml zásobního elektrodového pufru jsem smíchala s 280 ml redestilované vody.

Vzorkový pufr – k 190  $\mu$ l zásobního vzorkového pufru jsem přidala 10  $\mu$ l 2-merkapt ethanolu.

Pracovala jsem v rukavicích.

Připravila jsem si nalévací stojánek, krycí skla, skla se spacerem, spony a hřeben. Skla a hřeben jsem umyla jarem, poté vodou, opláchla redestilovanou vodou a nakonec lihomethanolem. Po oschnutí jsem skla přiložila na sebe a spojila sponami. Spojená jsem je postavila na gumovou podložku v nalévacím stojánku, přitlačila a přichytila vrchním kolíkem. V malé kádince jsme si namíchala roztok na spodní gel. Po lehkém promíchání jsem rychle pipetou nalila z boku gel mezi skla cca 0,5 cm pod spodní okraj zeleného držáku. Ihned jsem opatrně převrstvila isobutanolem nasyceným vodou, tak aby byla zakrytá celá délka gelu. Poté jsem nechala gel 45 minut polymerovat. Po 45 minutách jsem slila isobutanol, gel propláchla redestilovanou vodou a opatrně vysušila filtračním papírem, tak abych se ho nedotkla.

V malé kádince jsem si namíchala roztok na vrchní gel. Po lehkém promíchání jsem rychle pipetou nalila gel opět z boku mezi skla až po horní okraj. Pod úhlem 45° jsem zasunula hřeben až po drážky, tak aby se vytlačily bublinky.

Gel jsem nechala polymerovat 2 – 24 hodin, pokud jsem je nechávala přes noc v lednici, tak jsem skla s gelem zabalila do potravinářské fólie, abych zabránila vyschnutí gelu.

#### Vlastní elektroforéza:

Z gelu jsem vyndala hřeben a jamky jsem propláchla destilovanou vodou. Připravila jsem si stojánek na elektroforézu, zelené těsnění na vnitřní straně stojánku jsem potřela tukem. Skla s gelem jsem přitlačila z každé strany na těsnění, vnitřní část zasunula do vnější části stojánku na elektroforézu a přitáhla sponami (skla se spacerem se tak nachází na vnější straně). Stojánek jsem vložila do vaničky. Vzorky proteinu jsem 5  $\times$  naředila 0,1 M Na-fosfátovým pufrem pH 7,4. Odebrala jsem příslušné množství a přidala stejný objem vzorkového pufru tak, aby ve všech jamkách bylo stejné množství bílkoviny. Poté jsem je povařila 5 minut při 99 °C (v předem vyhřátém Termomixeru) a

po krátkém zchlazení v ledu jsem je pipetovala do jamek gelu. Krajní jamky jsem vynechala, do následujících jsem nanesla z každé strany gelu 5  $\mu$ l molekulového standardu a za nimi následovaly vzorky. Vyndala jsem nanášecí blok.

Do horního elektrodového prostoru jsem nalila elektrodový pufr tak, aby byl ponořen celý gel a zkontrolovala jsem, zda nepodtéká. Do spodního elektrodového prostoru jsem nalila také elektrodový pufr tak, aby hladina sahala nad spodní okraj gelu. Vaničku jsem ponořila do ledové lázně, přiklopila víčkem a připojila ke zdroji napětí. Nastavila jsem konstantní napětí 100 V, na začátku rozdělovacího gelu (cca po 10 minutách) jsem zvýšila napětí na 200 V. Zdroj jsem vypnula, když čelo doběhlo na spodní okraj gelu. Stojánek jsem vyndala z vaničky, horní elektrodový pufr poté slila. Skla s gelem jsem vyndala.

#### **4.10 Imunoblotting (Western blotting)**

Princip metody: Dochází k přenosu biologických vzorků z gelu na membránu, kde se následně detekují pomocí označení specifickými protilátkami. Specifická interakce mezi protilátkou a antigenem umožní identifikovat cílový protein ve směsi proteinů.

##### Metodika

Příprava blotovacího pufru – navázila jsem 6,06 g TRIS, 28,8 g glycinu a rozpustila v 500 ml redestilované vody. Přidala jsem 400 ml methanolu a v odměrné baňce doplnila do objemu 2000 ml.

Pracovala jsem v rukavicích.

Den předem jsem si připravila ledítko na blotting. Po skončení elektroforézy jsem skla s gelem ponořila do blotovacího pufru v nerezové misce. Pomocí zelených klínků jsem rozevřela skla od sebe a odřízla zaostřovací gel. U separačního gelu (zůstal na spodním skle) jsem odřízla pravý horní roh, abych označila první nanášený vzorek. Separační gel jsem oddělila od spodního skla a nechala několik minut plavat v blotovacím pufru. Nitrocelulóзовou membránu jsem nastříhala na příslušnou velikost podle gelu, aktivovala jsem ji 5 minut v methanolu a poté ji ponořila do blotovacího pufru.

Sestavila jsem blotovací sendvič:

Začala jsem na spodní černé části blotovacího zařízení a postupovala směrem nahoru. Všechny části jsem před sestavením namočila do blotovacího pufru. Nejprve jsem dala bílou houbičku, silný filtrační papír, gel, nitrocelulózovou membránu, silný filtrační papír a nakonec bílou houbičku. Válením skleněnou tyčinkou jsem vytlačila vzduchové bublinky.

Uzavřela jsem blotovací zařízení a sendvič vložila do blotovací vaničky (černá k černé). Do vaničky jsem vložila ledítko s ledem a vaničku jsem naplnila blotovacím pufrem tak, aby byl ponořen celý sendvič. Blotovací vaničku jsem umístila do ledové lázně, na zdroji nastavila konstantní napětí a nechala blotovat 120 minut.

#### Příprava zásobních roztoků:

0,1 M TRIS pufr, pH 8,0 – navážila jsem 12,11 g TRISU a rozpustila v 800 ml redestilované vody. Pomocí 4 M HCl jsem upravila pH na 8,0 (za kontroly na pH metru). V odměrné baňce jsem pak doplnila redestilovanou vodou na 1000 ml.

TBST – navážila jsem 8,77 g NaCl a rozpustila v 300 ml redestilované vody. Přidala jsem 3 ml Tweenu 20 a 100 ml 0,1 M TRIS pufru pH 8,0. V odměrné baňce jsem doplnila redestilovanou vodou na 1000 ml.

TBS – navážila jsem 2,19 g NaCl a rozpustila ve 100 ml redestilované vody. Přidala jsem 25 ml 0,1 M TRIS pufru pH 8,0. V odměrné baňce jsem doplnila redestilovanou vodou na 250 ml.

AP pufr (alkalická fosfatasa) – navážila jsem 6,06 g TRIS, 508 mg  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  a rozpustila ve 300 ml redestilované vody. Pomocí 4 M HCl jsem upravila pH na 9,5 (za kontroly na pH metru). V odměrné baňce jsem doplnila redestilovanou vodou na 500 ml.

Po skončení blotingu jsem otevřela sendvič, pomocí pinzety jsem vyndala membránu, vložila ji do Petriho misky a opláchla ji ve 25 ml TBST (na kývačce). Po jedné minutě jsem membránu přenesla do jiné misky s 5 % mlékem v TBST (2,5 g BSA + 50 ml TBST) a nechala v ní 1 – 24 hodin (v ledničce).

Poté jsem membránu přenesla do falkonky a následovalo promývání membrány (vždy v cca 5 ml příslušného pufru pokojové teploty) a inkubace s protilátkami. Falkonku s membránou jsem umístila na kývačku, rychlost kyvu 5.

- Oplach membrány 2 × 5 minut v TBST
- Inkubace membrány s primární protilátkou (Goat polyclonal to glutathione-S-transferase alpha) – 5 µl zásobní protilátky a 75 mg BSA jsem přidala do 15 ml TBST (ředění 1:3000) po dobu 45 minut
- Oplach membrány 6 × 5 minut v TBST
- Inkubace membrány se sekundární protilátkou (Rabbit polyclonal secondary antibody to goat IgG, H&L (AP)) – 30 µl zásobní protilátky jsem přidala do 15 ml TBST (ředění 1:500) po dobu 45 minut
- Oplach membrány 6 × 5 minut v TBST
- Oplach membrány 2 × 5 minut v TBS
- Oplach membrány 2 × 5 minut v AP-pufu
- Následovala chemiluminiscenční detekce (viz 4.11)

#### Stripování (odstranění protilátek z membrány)

Po chemiluminiscenční detekci jsem membrány stripovala s pomocí stripovacího pufu.

Příprava pufu – navážila jsem si 7,5 g glycinu, 500 mg SDS, napipetovala 5 ml Tweenu 20, rozpustila v malém množství redestilované vody a s pomocí 4 M HCl upravila pH na 2,2. Doplnila jsem pak redestilovanou vodou do 500 ml. Membrány jsem přenesla do Petriho misky a na kývačce nechala 5 minut promývat ve stripovacím pufu.

Po stripování jsem membrány promyla v TBST a přenesla do 5 % mléka, kde jsem je nechala přes noc zablokovat. Dále jsem opakovala postup s promýváním membrány a inkubací s protilátkami.

- Inkubace membrány s primární protilátkou (Mouse monoclonal to beta actin) – 15 µl zásobní protilátky a 75 mg BSA jsem přidala do 15 ml TBST (ředění 1:1000)
- Inkubace membrány se sekundární protilátkou (Mouse IgG secondary antibody, H&L) – 15 µl zásobní protilátky jsem přidala do 15 ml TBST (ředění 1:1000)

Následovala chemiluminiscenční detekce (viz 4.11).



#### **4.11 Chemiluminiscence**

Princip metody: Chemiluminiscenční detekce využívá enzym ke katalýze reakce, která následně vede k produkci viditelného světla.

##### Metodika

Naředila jsem si vývojku destilovanou vodou v poměru 1:14 (34 ml vývojky a 466 ml vody) a ustalovač destilovanou vodou v poměru 1:4 (200 ml ustalovače a 800 ml vody). Membránu jsem přenesla do temné komory, kde jsem ji položila na skleněnou misku potaženou fólií a na její povrch jsem napipetovala cca 2 ml chemiluminiscenčního substrátu a nechala inkubovat po dobu 5 minut. Membránu jsme vyndali ze substrátu, nechali ji okapat a pinzetou vložila do potravinové fólie. Otřela jsem přebytečnou vlhkost a vložila do kazety. Filmy jsem si předem nastříhala na potřebnou velikost. Na membránu ve fólii jsem položila film, kazetu jsem uzavřela a nechala film exponovat 3 minuty. Ihned po expozici jsem film přenesla do vývojky a za neustálého kývání pinzetou nechala vyvíjet. Poté jsem jej opláchla v destilované vodě, ponořila do ustalovače a nechala za občasného pohybu chvíli plavat. Nakonec jsem film ponořila opět do destilované vody a nechala oschnout. Filmy jsem vyfotila pomocí přístroje GelDoc a následně jsem densitometricky kvantifikovala jednotlivé proteinové bandy s pomocí software QuantityOne.

#### **4.12 Stanovení bílkoviny pomocí metody BCA**

Princip metody: V alkalickém prostředí reagují proteiny s  $\text{Cu}^{2+}$ , které touto reakcí přecházejí na  $\text{Cu}^{1+}$ .  $\text{Cu}^{1+}$  redukuje bicinchoninovou kyselinu (BCA) za vzniku modrého zbarvení. Intensita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny. Toto stanovení závisí především na obsahu zbytků cysteinu, tryptofanu a tyrosinu.

##### Metodika

Vzorky jsem nejprve naředila redestilovanou vodou (cytosol i mikrosomy 30×).

Tab. 4: Příprava kalibrační křivky

	Koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	Roztok BSA 0,1% ( $\mu\text{l}$ )	Redestilovaná voda ( $\mu\text{l}$ )
1	0	0	50
2	200	10	40
3	400	20	30
4	600	30	20
5	800	40	10
6	1000	50	0

Připravila jsem si pracovní roztok C, smícháním 25 ml pracovního roztoku A a 0,5 ml pracovního roztoku B.

Nejprve jsem napipetovala na destičku roztoky BSA z kalibrační křivky (vždy 10  $\mu\text{l}$  příslušné koncentrace), poté naředěné vzorky (také 10  $\mu\text{l}$ ). Pomocí multikanálové pipety jsem přidala 200  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku C. Nechala jsem inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C a současně zapnula míchání. Po inkubaci jsem změřila absorbanci při 562 nm.

Naměřené aktivity jednotlivých enzymů jsem pak vztáhla na množství bílkoviny obsažené ve vzorku a tím získala specifickou aktivitu.

#### **4.13 Statistická analýza dat**

Všechny výpočty jsem prováděla v programu Microsoft Excel a GraphPad Prism 5.04. Všechny výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD). Pro zjištění, zda jsou rozdíly v aktivitě skupiny mladých a skupiny starých potkanů a také mezi jednotlivci v dané skupině statisticky významné ( $P < 0.01$ ), jsem použila Studentův *t*-test.

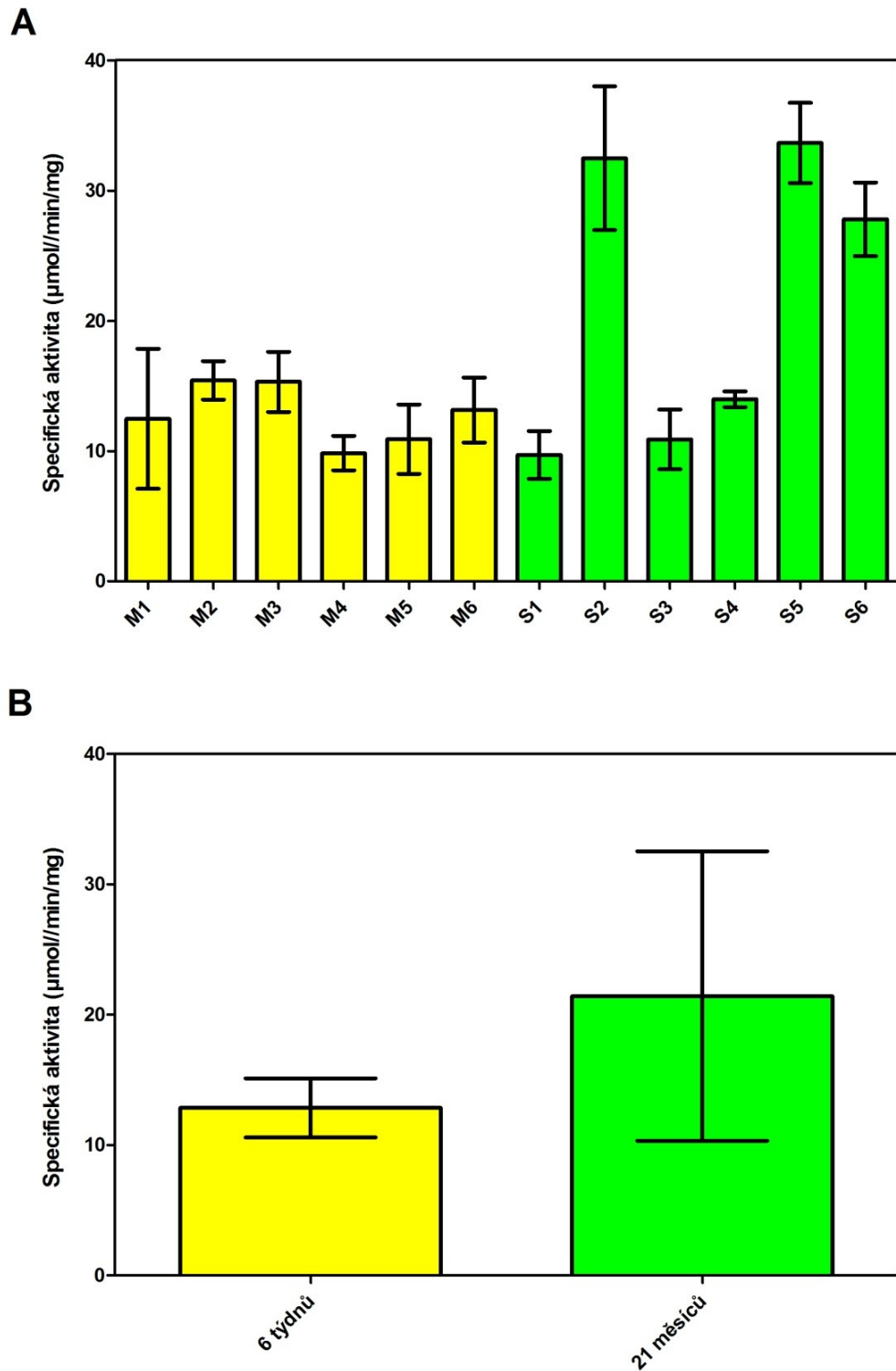
## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Stanovení aktivity jednotlivých isoform cytochromu P450

Aktivitu CYP jsem stanovovala v mikrosomálních frakcích získaných z jater starých a mladých potkanů za použití specifických substrátů pro jednotlivé isoformy (tj. ethoxyresorufin pro CYP1A1, methoxyresorufin pro CYP1A2, penthoxyresorufin pro CYP2B a benzyloxyresorufin pro CYP3A). Přírůstek fluorescence produktu (resorufinu) jsem sledovala na spektrofluorimetru Perkin Elmer LS 50B při vlnových délkách 530 nm (excitační) a 585 nm (emisní). Ze získaných dat jsem následně vypočítala specifickou aktivitu enzymu [ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ].

#### 5.1.1 CYP1A1

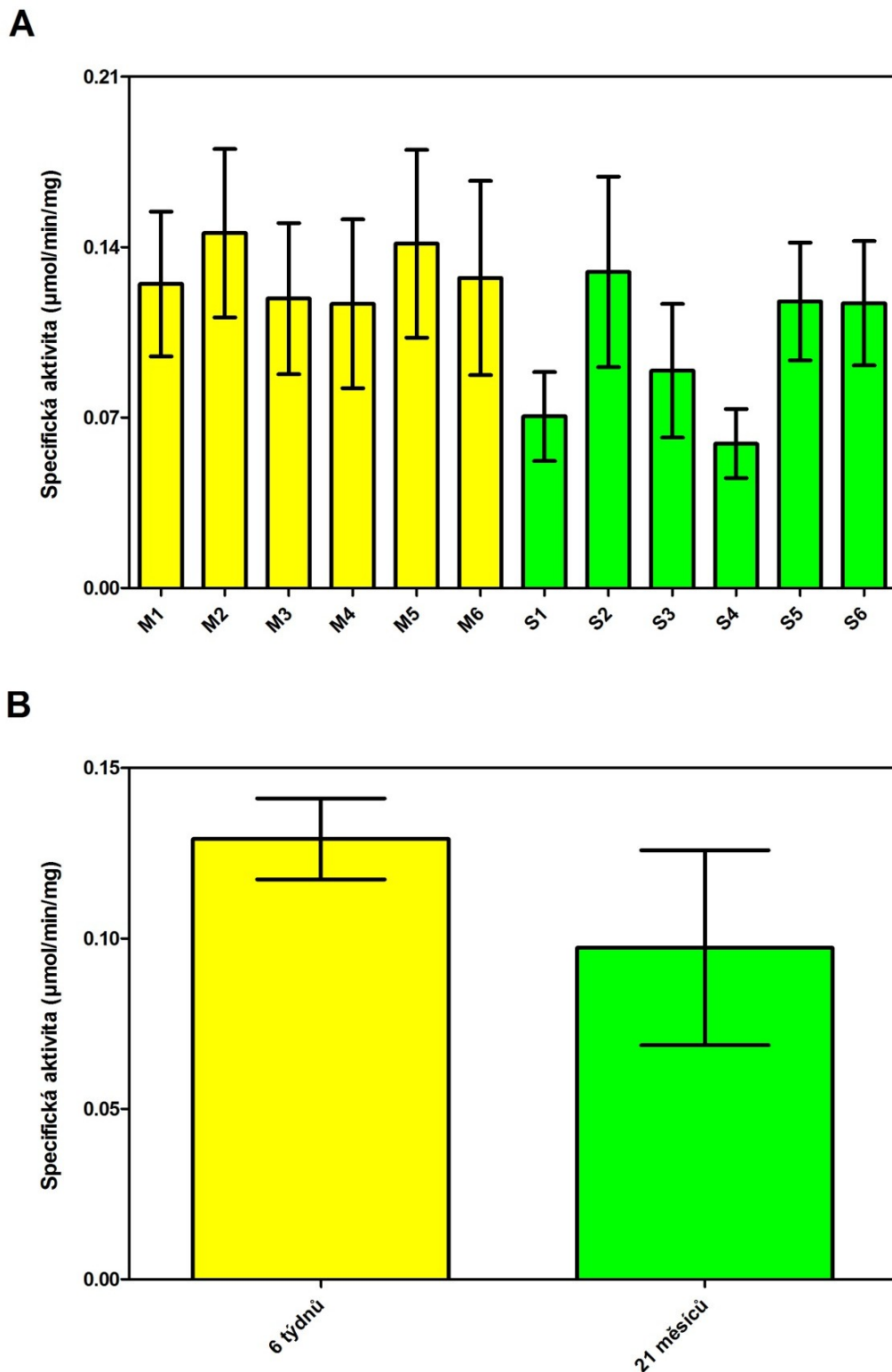
Mezi jednotlivci ve skupině mladých potkanů nebyly příliš výrazné rozdíly v aktivitě CYP1A1, zatímco ve skupině starých potkanů byla aktivita u tří jedinců (S2, S5 a S6) signifikantně vyšší ( $P < 0,01$ ). Velká interindividuální variabilita ve skupině starých potkanů se následně odrazila na celkovém průměru aktivity CYP1A1 v této skupině. Specifická aktivita CYP1A1 byla ve skupině starých potkanů téměř dvojnásobně vyšší než u mladých samců, ale vzhledem k velkým směrodatným odchylkám není tento rozdíl statisticky významný. Interindividuální rozdíly ve specifické aktivitě CYP1A1 jsou znázorněny v Obr. 3A a srovnání aktivit CYP1A1 mezi skupinou mladých a starých potkanů je v Obr. 3B.



Obr. 3. Specifická aktivita CYP1A1 v játrech mladých (6 týdnů) a starých (21 měsíců) potkanů. (A) Interindividuální rozdíly ve specifické aktivitě CYP1A1 u mladých (M1-6) a starých (S1-S6) potkanů. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze dvou nezávislých experimentů, kde  $n = 3$ . (B) Změny v aktivitě CYP1A1 během stárnutí. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze šesti zvířat.

### 5.1.2 CYP 1A2

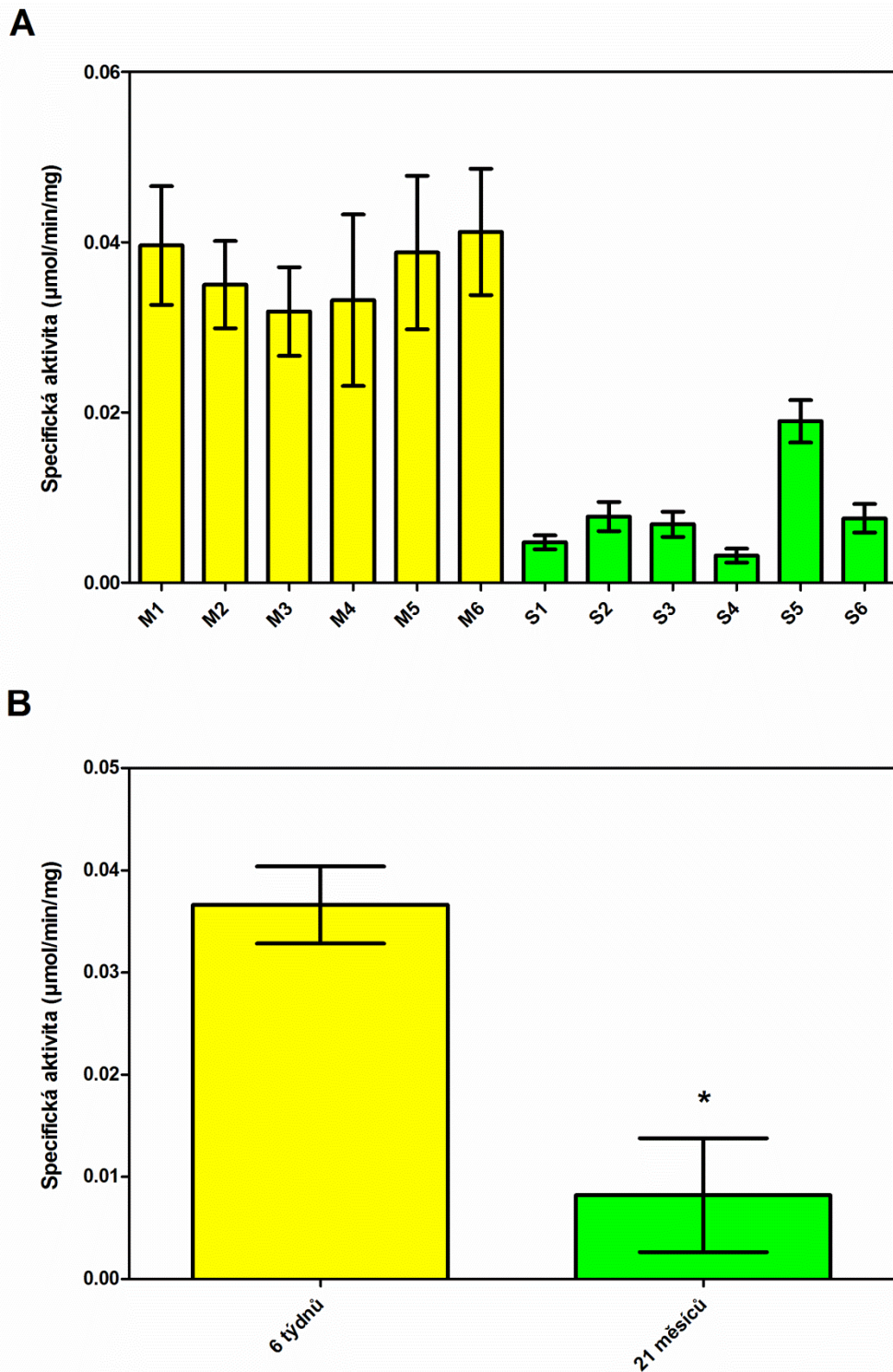
Mezi jednotlivci ve skupině mladých potkanů nebyly příliš výrazné rozdíly v aktivitě CYP1A2, zatímco ve skupině starých potkanů byli tři jedinci s aktivitou na úrovni mladých (S2, S5 a S6) a další tři s nižší aktivitou. Nicméně jen v případě S2 respektive S4 byla specifická aktivita CYP1A2 snížena statisticky významně ( $P < 0,01$ ) ve srovnání s potkany S1 respektive S2, S5 a S6 (Obr. 4A). Specifická aktivita CYP1A2 byla ve skupině mladých potkanů asi o čtvrtinu vyšší než u potkanů starých, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný (Obr. 4B).



Obr. 4. Specifická aktivita CYP1A2 v játrech mladých (6 týdnů) a starých (21 měsíců) potkanů. (A) Interindividuální rozdíly ve specifické aktivitě CYP1A2 u mladých (M1-6) a starých (S1-S6) potkanů. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů, kde  $n = 3$ . (B) Změny v aktivitě CYP1A2 během stárnutí. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze šesti zvířat.

### 5.1.3 CYP2B

Mezi jednotlivci ve skupině mladých potkanů nebyly nalezeny významné rozdíly v aktivitě CYP2B, stejně tak ve skupině starých potkanů. Výjimku představoval jedinec S5, jehož specifická aktivita CYP2B byla významně vyšší ( $P < 0,01$ ) než u ostatních jedinců této skupiny (Obr. 5A). Specifická aktivita CYP2B byla ve skupině mladých potkanů téměř 4,5krát vyšší než ve skupině potkanů starých (Obr. 5B).

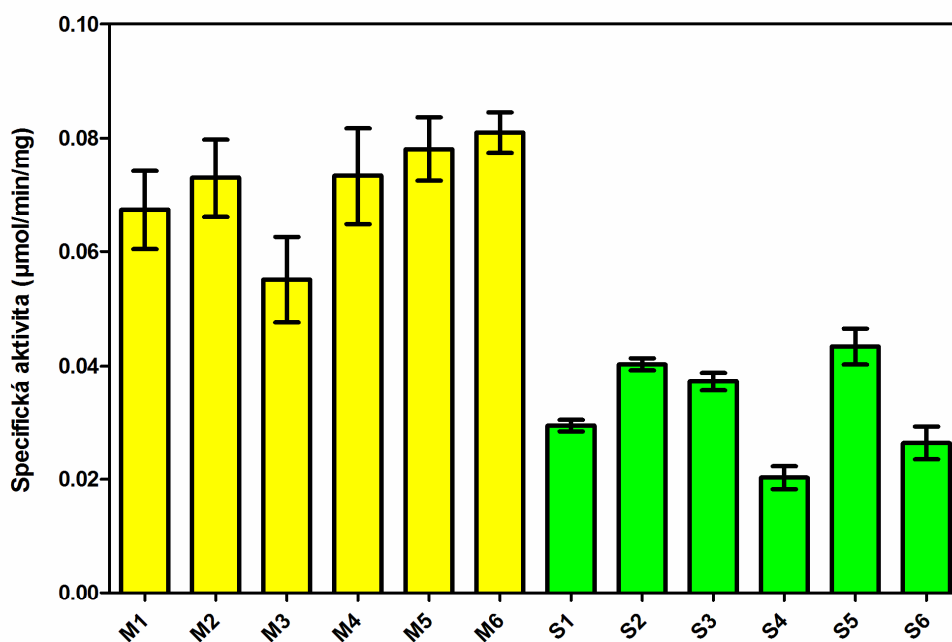
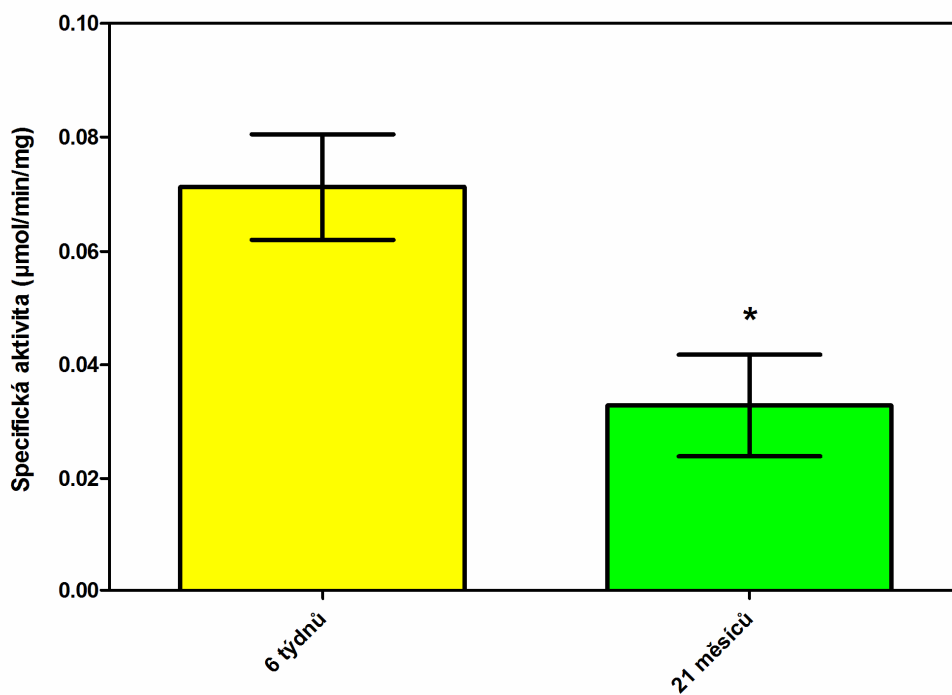


Obr. 5. Specifická aktivita CYP2B v játrech skupině mladých (6 týdnů) a starých (21 měsíců) potkanů. (A) Interindividuální rozdíly ve specifické aktivitě CYP2B u mladých (M1-6) a starých (S1-S6) potkanů. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů, kde  $n = 3$ . (B) Změny v aktivitě CYP2B během stárnutí. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze šesti zvířat. Skupiny označené \* se signifikantně liší ( $P < 0,01$ , Studentův  $t$ -test).



#### **5.1.4 CYP3A**

Mezi jednotlivci ve skupině mladých potkanů byla aktivita M3 výrazně nižší než aktivita CYP3A u ostatních jedinců. Ve skupině starých potkanů jsem pozorovala výraznější interindividuální variabilitu (Obr. 6A). Specifická aktivita CYP3A se s věkem signifikantně snižovala. Ve skupině mladých potkanů byla dvojnásobně vyšší než ve skupině potkanů starých (Obr. 6B).

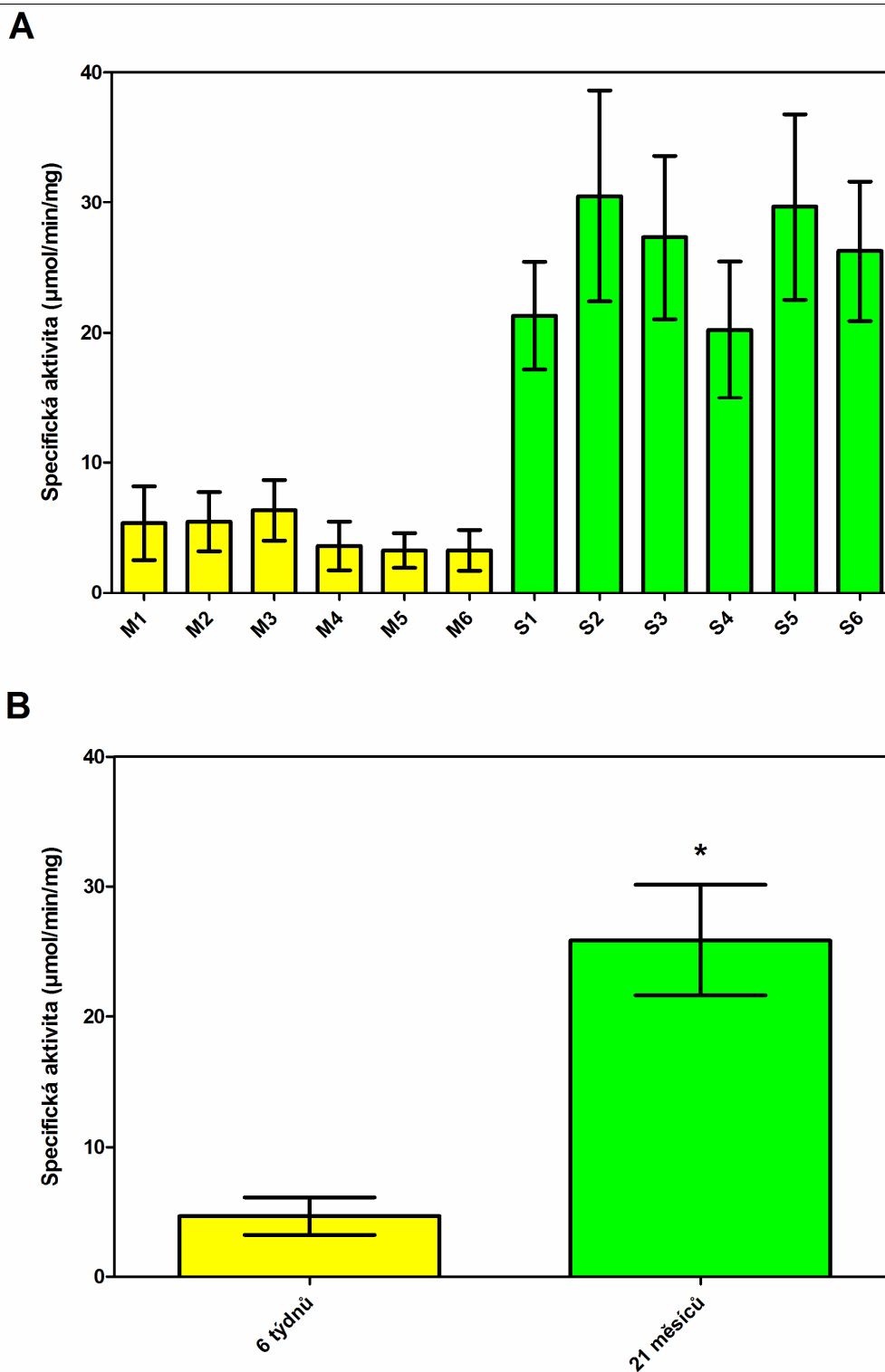
**A****B**

Obr. 6. Specifická aktivita CYP3A v játrech mladých (6 týdnů) a starých (21 měsíců) potkanů. (A) Interindividuální rozdíly ve specifické aktivitě CYP3A u mladých (M1-6) a starých (S1-S6) potkanů. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů, kde  $n = 3$ . (B) Změny v aktivitě CYP2B během stárnutí. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze šesti zvířat. Skupiny označené \* se významně liší ( $P < 0,01$ , Studentův  $t$ -test).

## 5.2 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy

Aktivitu GST jsem stanovovala v cytosolických frakcích získaných z jater potkanů za použití univerzálního substrátu CDNB. Absorbanci vznikajícího produktu *S*-(2,4-dinitrofenyl)glutathionu jsem měřila na spektrofotometru HELIOS β. Toto měření probíhalo při vlnové délce 340 nm. Ze získaných dat jsem následně vypočítala specifickou aktivitu [(μmol/min)/mg].

Mezi jednotlivci ve skupině mladých potkanů nebyly výrazné rozdíly v aktivitě GST a jejich absolutní hodnoty se pohybovaly mezi  $3.3 \pm 1.3$  μmol/min/mg a  $6.3 \pm 2.3$  μmol/min/mg. Ve skupině starých potkanů byly větší interindividuální rozdíly v absolutních hodnotách aktivity GST ( $20.2 \pm 5.2$  μmol/min/mg až  $30.5 \pm 8.1$  μmol/min/mg) než ve skupině mladých potkanů (Obr. 7A). Nicméně tyto rozdíly v aktivitě GST mezi jednotlivci nebyly statisticky významné. Specifická aktivita GST byla ve skupině starých potkanů pětikrát vyšší než ve skupině mladých potkanů (Obr. 7B).

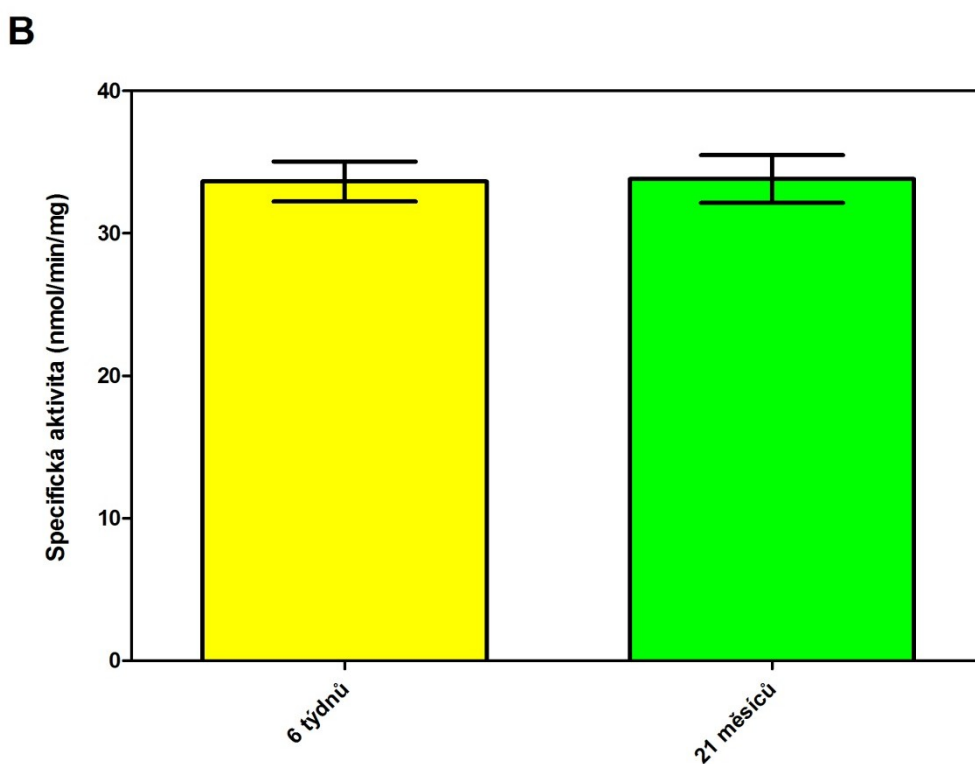
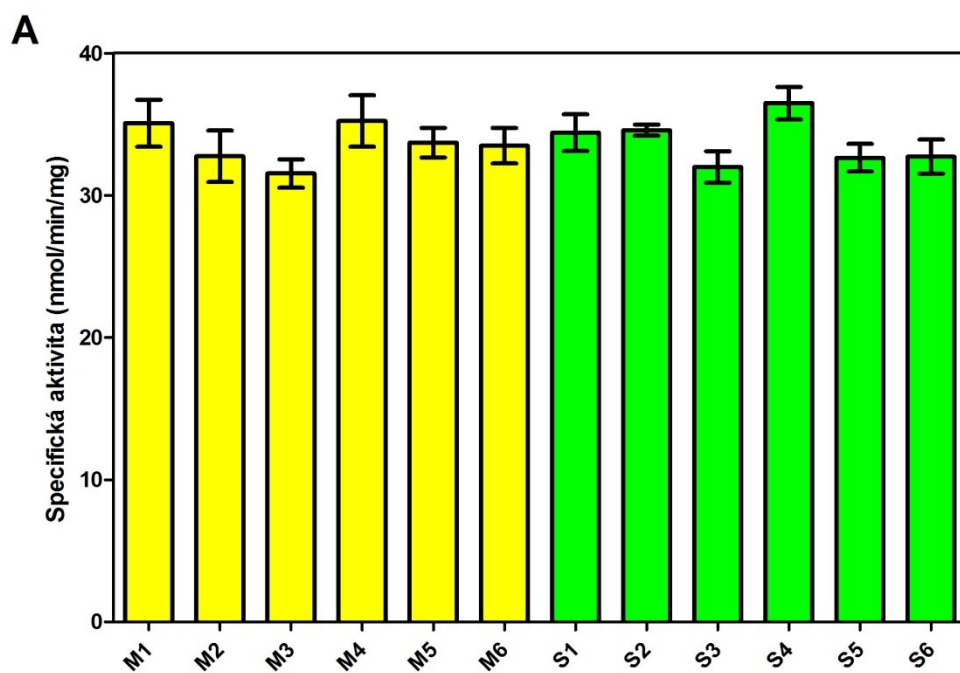


Obr. 7. Specifická aktivita GST v játrech mladých (6 týdnů) a starých (21 měsíců) potkanů. (A) Interindividuální rozdíly ve specifické aktivitě GST u mladých (M1-6) a starých (S1-S6) potkanů. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů, kde  $n = 3$ . (B) Změny v aktivitě GST během stárnutí. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze šesti zvířat. Skupiny označené \* se významně liší ( $P < 0,01$ , Studentův  $t$ -test).

### 5.3 Stanovení aktivity superoxiddismutasy

Aktivitu SOD jsem stanovovala nepřímou metodou za použití vysoce rozpustné tetrazoliové soli WST-1 ve vzorcích cytosolu získaných z jater potkanů. Absorbanci vznikajícího formazanu jsem měřila na multimodální čtečce TECAN INFINITE M200 při vlnové délce 450 nm. Ze získaných dat jsem následně vypočítala specifickou aktivitu [(nmol/min)/mg].

Rozdíly v aktivitě mezi jedinci v obou skupinách byly minimální. U mladých potkanů byla statisticky významně snížena aktivita M3 proti M1 a M4, zatímco u starých potkanů byla aktivita S4 signifikantně vyšší než S3, S5 a S6 (Obr. 8A). Specifická aktivita byla ve skupině mladých potkanů prakticky stejná jako ve skupině potkanů starých (Obr. 8B).

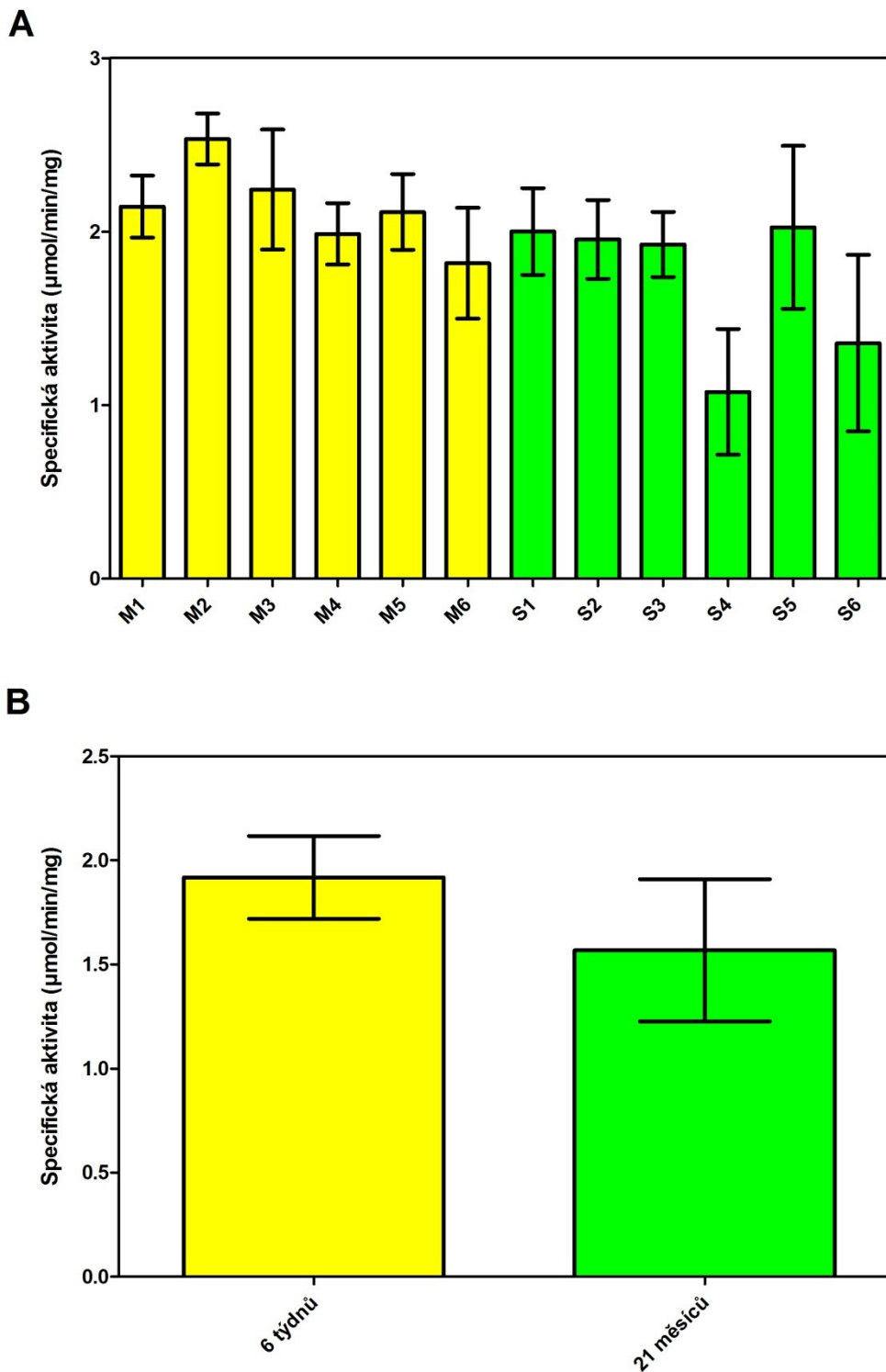


Obr. 8. Specifická aktivita SOD v játrech mladých (6 týdnů) a starých (21 měsíců) potkanů. (A) Interindividuální rozdíly ve specifické aktivitě SOD u mladých (M1-6) a starých (S1-S6) potkanů. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů, kde  $n = 3$ . (B) Změny v aktivitě SOD během stárnutí. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze šesti zvířat.

## 5.4 Stanovení aktivity katalasy

Aktivitu katalasy jsem stanovovala ve vzorcích cytosolu získaných z jater potkanů za použití 65 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jako substrátu. Absorbanci vytvořeného komplexu molybdenanu amonného s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jsem měřila na multimodální čtečce TECAN INFINITE M200 při vlnové délce 450 nm. Ze získaných dat jsem následně vypočetla specifickou aktivitu CAT [(μmol/min)/mg].

V cytosolu skupiny mladých jedinců byla aktivita CAT u jedince M2 signifikantně vyšší než u jedince M6, u ostatních jedinců byla aktivita enzymu srovnatelná. V cytosolu skupiny starých potkanů byla u dvou jedinců (S4 a S6) naměřena až o třetinu nižší aktivita oproti ostatním (tj. S1, S2, S3 a S5). Specifická aktivita byla ve skupině mladých potkanů přibližně o jednu pětinu vyšší než ve skupině potkanů starých, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný.



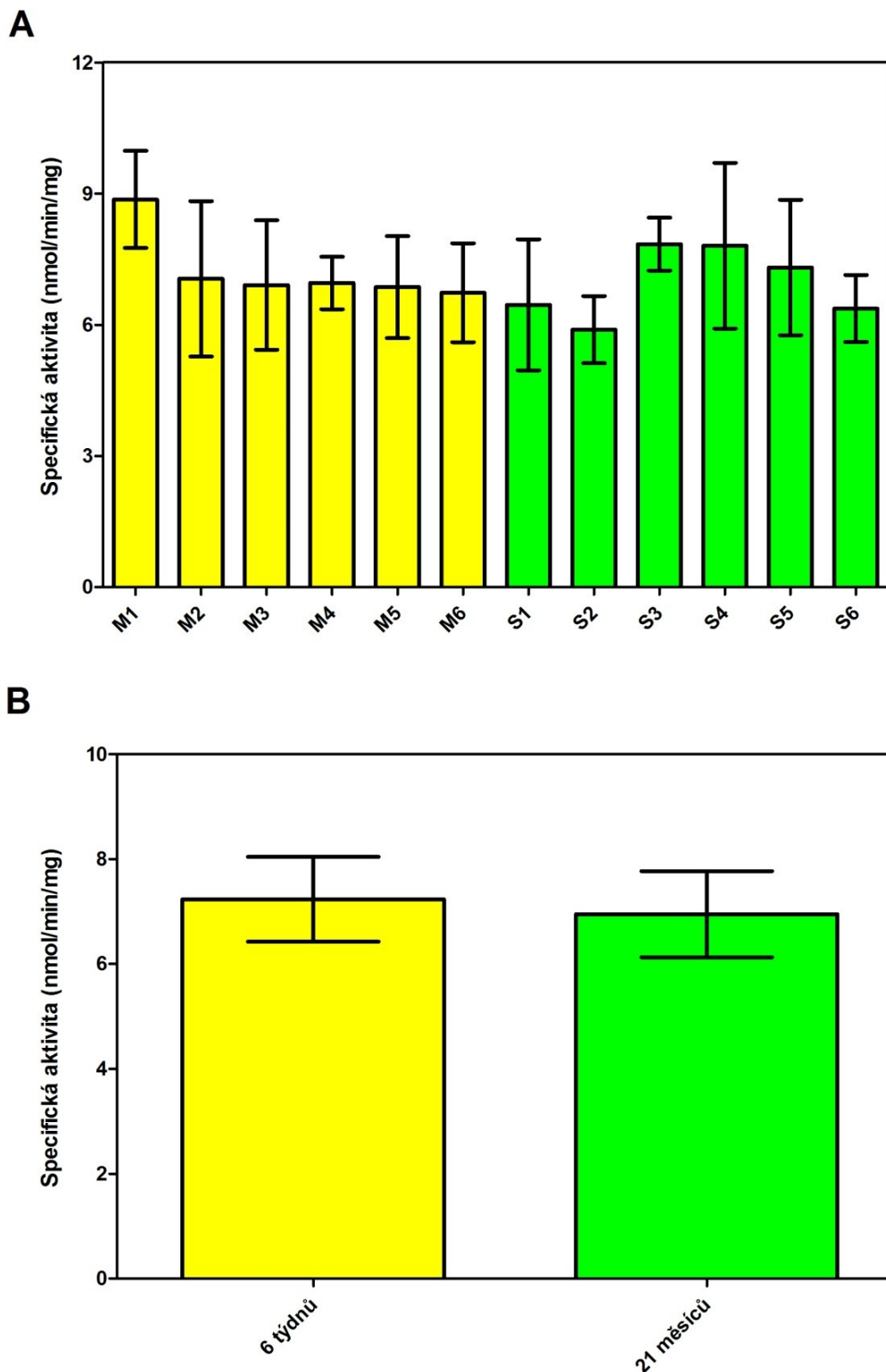
Obr. 9. Specifická aktivita CAT v játrech mladých (6 týdnů) a starých (21 měsíců) potkanů. (A) Interindividuální rozdíly ve specifické aktivitě CAT u mladých (M1-6) a starých (S1-S6) potkanů. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů, kde  $n = 3$ . (B) Změny v aktivitě CAT během stárnutí. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze šesti zvířat.



## 5.5 Stanovení aktivity peroxidasy

Aktivitu peroxidasy jsem stanovovala ve vzorcích cytosolu potkanů za použití 10 mM *O*-fenylendiaminu v 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jako substrátu. Absorbanci vzniklého produktu 2,2'-diaminoazobenzenu jsem měřila na multimodální čtečce TECAN INFINITE M200 při vlnové délce 490 nm. Ze získaných dat jsem následně vypočítala specifickou aktivitu [(nmol/min)/mg].

Ve skupině mladých potkanů byla u jedince M1 aktivita asi o pětinu vyšší než u zbývajících jedinců. Signifikantně se však aktivita Px tohoto jedince lišila jen od aktivit nalezených u M5 a M6. Ve skupině starých potkanů se aktivity mezi jedinci nelišily (Obr. 11A). Specifická aktivita Px byla ve skupině mladých potkanů nepatrně vyšší než ve skupině starých potkanů. Tento rozdíl byl však zanedbatelný (Obr. 11B).

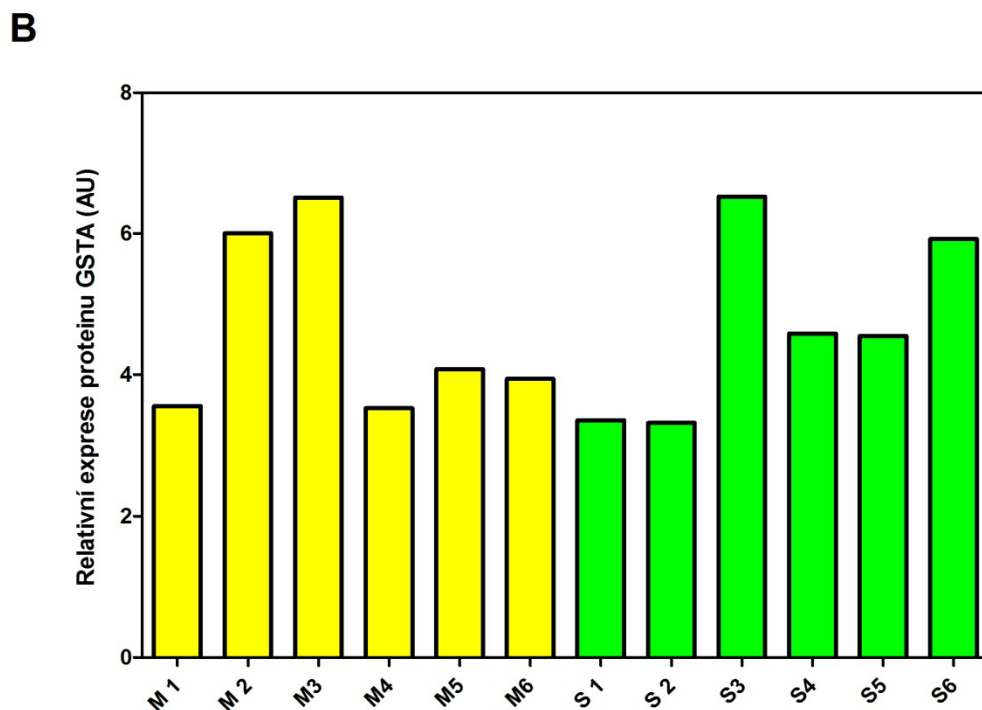
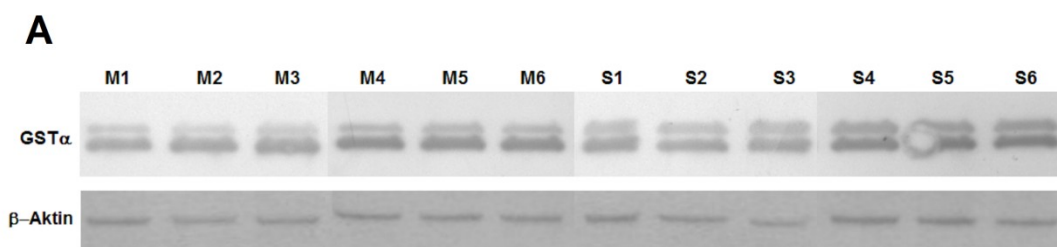


Obr. 11. Specifická aktivita Px v játrech mladých (6 týdnů) a starých (21 měsíců) potkanů. (A) Interindividuální rozdíly ve specifické aktivitě Px u mladých (M1-6) a starých (S1-S6) potkanů. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů, kde  $n = 3$ . (B) Změny v aktivitě Px během stárnutí. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze šesti zvířat.

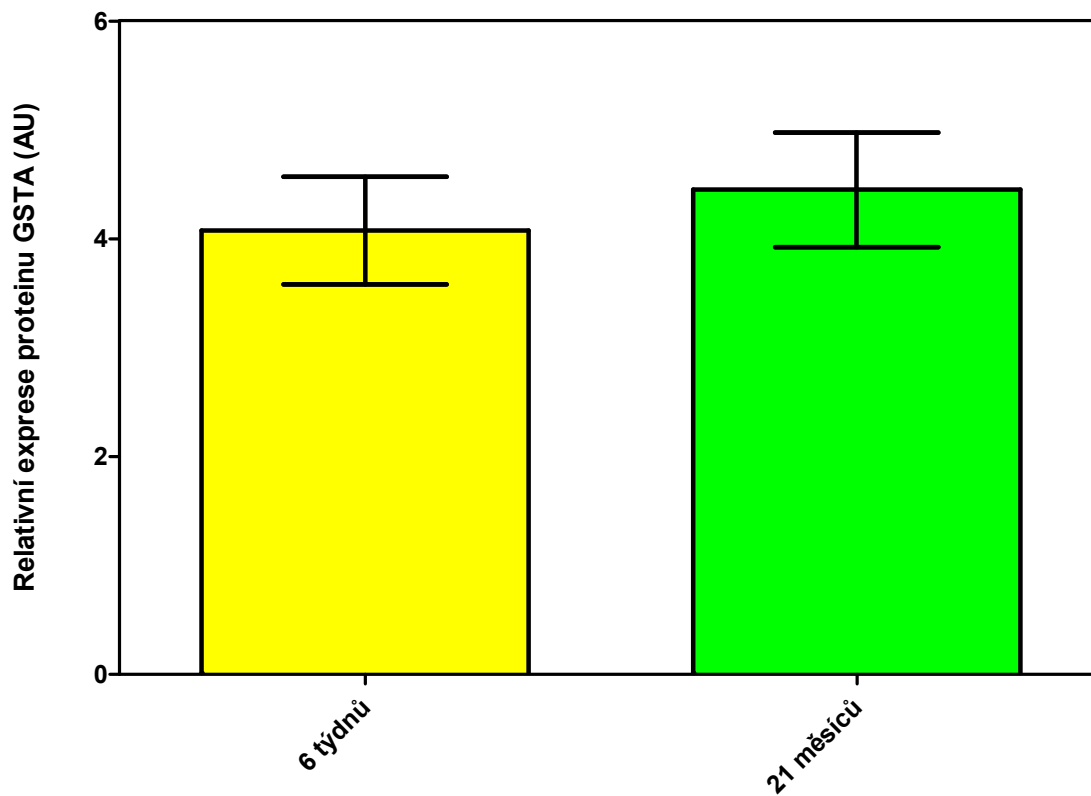
## 5.6 SDS-PAGE a Western blotting vzorků

SDS-PAGE s následným Western blottingem jsem použila pro stanovení exprese proteinu GST $\alpha$ . Postupovala jsem dle popsané metodiky (viz. kapitoly 4.9–4.11). Podmínky separace a inkubace s protilátkami jsou uvedeny pod příslušnými obrázky. Bloty po chemiluminiscenční detekci byly snímány na přístroji GelDoc XR a denzita jednotlivých proužků byla vyhodnocena pomocí software QuantityOne.

Ve vzorcích cytosolu jednotlivých potkanů byla ověřena exprese GST $\alpha$ . Při použití protilátky proti GST $\alpha$  došlo ve vzorcích k označení dvou bandů s molekulovou hmotností kolem 26 kDa, které zřejmě odpovídají dvěma různým podjednotkám tohoto enzymu (Obr. 12A). Po stripování jsem použila protilátku proti  $\beta$ -aktinu, abych ověřila množství bílkoviny v každém nanášeném vzorku.  $\beta$ -aktinu odpovídal band s molekulovou hmotností 42 kDa. V Obr. 12B uvádím expresi proteinu GST $\alpha$  normalizovanou na množství  $\beta$ -aktinu. Mezi jedinci v obou skupinách jsem pozorovala rozdíly v expresi proteinu GST $\alpha$ . Např. jedinci M2, M3, S3 a S6 měli výrazně více GST $\alpha$  než ostatní potkani. Po zprůměrování hodnot v obou skupinách jsem našla jen nesignifikantní zvýšení exprese tohoto enzymu ve skupině starých potkanů (Obr. 13).



Obr. 12 Interindividuální rozdíly v expresi proteinu GSTα (A). Změny v expresi GSTα normalizované na množství β-aktinu (B). Vzorky cytosolu byly podrobené SDS-PAGE s následným western blottingem (podmínky separace: zaostřovací gel 4%, separační gel 12,5%, 4 μg proteinu/jamka). Bloty byly následně vystaveny působení kozí polyklonální protilátky proti GSTα. Proteiny byly označeny po reakci s odpovídající sekundární protilátkou chemiluminiscenční detekcí za použití substrátu pro alkalickou fosfatasu. Membrána byla poté stripována a následně vystavena působení myší monoklonální protilátky proti β-aktinu. Proteiny byly označeny po reakci s odpovídající sekundární protilátkou chemiluminiscenční detekcí za použití substrátu pro alkalickou fosfatasu.



Obr. 13 Exprese proteinu GST $\alpha$  ve skupině mladých a starých potkanů normalizovaná na množství  $\beta$ -aktinu. Každý bod představuje průměr  $\pm$  SD ze šesti hodnot.

## 6. Diskuse

V této práci jsem se zabývala vlivem stárnutí na aktivitu a expresi vybraných biotransformačních a antioxidačních enzymů. Aktivity enzymů jsem sledovala v subcelulárních frakcích získaných z jater samců potkana. Pro porovnání jsem vytvořila dvě skupiny zvířat, které jsem označila jako mladé (6 týdnů) a staré (21 měsíců). V každé skupině bylo šest jedinců.

**Stárnutí** je přirozený proces, v jehož průběhu dochází k mnoha změnám v organismu. Z hlediska metabolismu jsou esenciální změny u orgánů, kde se odehrává převážná část metabolických reakcí. Jedním z těchto orgánů je i jaterní tkáň. Dochází jednak ke změnám v morfologii (ať už se jedná o změny v hmotnosti, struktuře či kumulaci různých proteinů) a také ve fyziologii těchto orgánů, které se následně odrazí na metabolismu jak eobiotik, tak xenobiotik.

Jedním z hlavních faktorů podílejících se na těchto změnách, je **oxidační stres**. V průběhu stárnutí dochází k progresivnímu poklesu hlavních buněčných funkcí spojených s akumulací pozměněných makromolekul. Narůstá oxidační poškození makromolekul, především proteinů, způsobené ROS. Takto modifikované proteiny včetně enzymů jsou obvykle dysfunkční, ztrácí katalytickou aktivitu a/nebo strukturní integritu (Bakala et al., 2012). ROS jsou eliminovány pomocí antioxidačních enzymů, na stanovení jejichž aktivity jsem se v této práci také zaměřila. V mnoha studiích bylo prokázáno, že rovnováha mezi oxidačním stresem a koncentrací dostupných antioxidantů má klíčový vliv na délku života u organismů (Yang et al., 2013).

Aktivita jednotlivých enzymů byly stárnutím ovlivněny odlišně. U některých enzymů došlo až k několikanásobnému nárůstu aktivity u starých zvířat (např. GST), u dalších aktivita s věkem naopak klesala (některé isoformy CYP) nebo byly rozdíly mezi mladými a starými zvířaty nepatrné (např. SOD).

**Cytochrom P450** představuje nadrodinu hemových enzymů, vyskytujících se od bakterií po člověka (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). Jaterní mikrosomální enzymový systém CYP se široce podílí na oxidačním metabolismu endogenních i exogenních sloučenin, např. prostaglandinů, steroidních hormonů, léčiv a kancerogenů (Horbach et al, 1992). Aktivita CYP je závislá na dostupnosti redukčních ekvivalentů NADPH, které jsou na CYP přenášeny pomocí NADPH-CYP-reduktasy, nacházející se

stejně jako CYP v hladkém ER. CYP je také hlavním místem interakce léčiv díky své široké substrátové specifitě, která je předpokladem kompetice substrátů o aktivní místa enzymu (Sevior et al., 2012).

V této práci jsem stanovovala aktivitu čtyř isoforem jednoho z nejdůležitějších představitelů biotransformačních enzymů, CYP. U isoforem **CYP2B** a **3A** jsem naměřila signifikantně vyšší (a to až pětkrát v případě CYP2B) aktivitu u mladých než u starých potkanů. U **CYP1A1** aktivita s věkem naopak rostla, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný. Získané výsledky jsou ve shodě s dalšími studii (např. Warrington et al., 2004; Yun et al., 2010). Vliv stárnutí na metabolismus xenobiotik je stále kontroverzní, protože mnoho autorů zaznamenalo pokles aktivity jaterních CYP (Yun et al., 2010; Imaoka et al., 1991), ale existují i studie, v nichž nebyla aktivita věkem ovlivněna (Wauthier et al., 2004). Tyto rozdíly mohou být způsobeny experimentálními podmínkami v jednotlivých laboratořích, použitými metodami stanovení aktivity a také rozdílným věkem studovaných zvířat (Wauthier et al., 2004).

Také studie zaměřené na ontogenezi jednotlivých isoenzymů CYP ukazují na značné rozdíly v aktivitě mezi nimi (de Zwart et al., 2008). Pokles aktivity CYP3A4 zaznamenali také Warrington et al. (2004) u potkanů starých 24-25 měsíců v porovnání s potkany starými 2-3 měsíce. Navíc ukázali na možné ovlivnění této isoformy hladinou testosteronu, jako jedním z modulátorů. Snížení aktivity u isoforem CYP1A2 a 2B pozorovali Yun et al. (2010), kteří pracovali s potkany starými 3 týdny a 26 měsíců. Pokles aktivity byl potvrzen i sníženou expresí mRNA u 26 měsíčních potkanů. Protože potkani žili v laboratorních podmínkách, kde je minimalizována možnost indukce či inhibice CYP xenobiotiky, dochází k poklesu aktivity pravděpodobně díky morfologickým změnám v jaterní tkáni (např. ztráta hladkého ER, zvýšení koncentrace cholesterolu doprovázené snížením fluidity membrán, snížení hmotnosti jater a další) (Schmucker, 2001; Kitani, 1994; van Bezooijen, 1984).

Další studie, zabývající se aktivitou a expresí CYP v průběhu stárnutí, byly prováděny v jiných modelech (např. u myši nebo člověka). U myši byla také potvrzena exprese jedné z hlavních isoforem CYP, a to 1A2, zatímco isoforma CYP1A1 nalezena nebyla. Exprese CYP1A2 se postupně zvyšovala mezi 1. a 20. dnem, poté zůstávala relativně konstantní (Saghir et al., 2012). U člověka existuje značná interindividuální variabilita v aktivitě jednotlivých isoforem CYP. Statistické analýzy aktivity CYP3A4

u člověka ukazují na nejméně 60% variabilitu, která je pod genetickou kontrolou (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). Vauzelle-Kervroedan et al. (1996) pozorovali ve své studii u dětí snížení aktivity CYP3A se zvyšujícím se věkem. Schmucker (2001) naopak zaznamenal, že koncentrace několika isoform z rodin CYP3A a CYP2C zůstává nezměněná v závislosti na pohlaví a věku. Následně bylo zjištěno, že i přes nezměněnou aktivitu CYP3A dochází s věkem ke snížení rychlosti clearance mnoha léčiv metabolizovaných právě touto isoformou.

**Glutathion-S-transferasa** je jedním z nejvýznamnějších konjugačních enzymů druhé fáze biotransformace. Kromě jater se tento enzym nachází i v mnoha extrahepatálních tkáních. Tato rodina isoenzymů katalyzuje konjugaci glutathionu s různými elektrofilními látkami a chrání tak buněčné složky před oxidačním a elektrofilním poškozením (Mueller et al., 1998). Glutathion, tripeptid obsahující thiolovou skupinu, zastává klíčovou úlohu v detoxikaci a usnadňuje eliminaci mnoha různých sloučenin adicí (Saghir et al., 2012). GST se spolu s glutathionreduktasou také podílí na ochraně organismu před volnými radikály (Ramesh et al., 2012). Lze tedy říci, že GST je nejen významným biotransformačním enzymem, ale také enzymem detoxikačním a antioxidačním.

Při stanovování aktivity GST jsem naměřila pětinasobné zvýšení aktivity u starých potkanů, které bylo provázeno i mírným zvýšením exprese proteinu GST $\alpha$  v játrech. Nárůst aktivity tohoto enzymu byl zaznamenán v mnoha dalších studiích. Kim et al. (2003) pozorovali zvýšení aktivity u 9-měsíčních potkanů v porovnání s 5-týdenními, podobných výsledků dosáhli Oztürk & Gümüşlü (2004) u potkanů 12-měsíčních v porovnání se 4-týdenními. Zvyšování aktivity GST s věkem může být spojeno s nárůstem koncentrace organických hydroperoxidů, jako produktů oxidačního poškození biomolekul (Oztürk & Gümüşlü, 2004). V průběhu stárnutí dochází k narůstajícímu poškození organismu oxidačním stresem, a tudíž zvýšená aktivita GST, která zprostředkovává detoxikaci sloučenin konjugací s GSH, může být odpovědí na tento stres. V průběhu života se také mění exprese jednotlivých isoform GST a jen některé z nich je možné ovlivnit enzymovou indukci. Studie ukázaly na rozdílnou expresi tří hlavních isoform GST ( $\alpha$ ,  $\mu$  a  $\pi$ ) v průběhu ontogeneze (Tee et al, 1992). Exprese je ovlivněna nejen věkem, ale i pohlavím, proto se u starých samců potkana může jednat také o feminizaci v průběhu stárnutí (Carrillo et al., 2009).



Pozorované zvýšení exprese proteinu GST u starých potkanů v této práci není tak výrazné jako odpovídající zvýšení aktivity enzymu, ale to může být způsobeno právě rozdílnou expresí isoform GST, které se následně podílejí na celkové aktivitě (zde jsem stanovovala expresi isoformy  $\alpha$ ). Protože většina studií byla prováděna v odlišném věku a s použitím různých substrátů, nelze výsledky zcela přesně porovnat, ale obecně se dá říci, že aktivita GST je v pozdním stáří vyšší než u potkanů velmi mladých.

Ve studii provedené u člověka pozoroval Hines (2008) progresivní zvýšení exprese GSTM v játrech v závislosti na věku (prenatální období až dospělost), zatímco exprese GSTA zůstala věkem nezměněna. Nejvyšší hladina exprese GSTP1 byla detekována v játrech plodu okolo 10.-22. týdne gestace, následoval pokles ve druhém a třetím trimestru. GSTP1 protein byl přítomen v malém množství u novorozenců, ale nebyl nalezen u dospělých (Saghir et al., 2012). Maurya & Rizvi (2010) pozorovali signifikantní zvýšení aktivity plazmatické GST jako funkci věku u zdravých osob obou pohlaví ve věku 18-85 let. Po korelaci s plasmatickou antioxidační kapacitou, která se ve zmíněné studii snižovala, došli k závěru, že zvýšení aktivity GST může být kompenzačním mechanismem reagujícím na zvýšení oxidačního stresu.

Expresí Gsta mRNA v játrech myši se zvyšovala postupně od narození do 15.-45. dne života. Expresí Gsta je velmi nízká u samiček do 15. dne života. U Gstm byla exprese zaznamenána v pozdějším období gestace a zvyšovala se do 22. dne života, poté se exprese některých jejích podjednotek snižovala (např. Gstm2, Gstm3 a Gstm4), exprese dalších zůstala nezměněna (Saghir et al., 2012).

**Antioxidační systém** se u aerobních organismů podle všeho vyvinul k ochraně buněk před oxidačním poškozením způsobeným oxidanty produkovanými v průběhu kyslíkového metabolismu (Bakala et al., 2012).

Jedním z hlavních antioxidačních enzymů je **superoxiddismutasa**. Tento enzym katalyzuje dismutaci  $O_2^{\cdot-}$  na molekulární kyslík a peroxid vodíku, který je obratem metabolizován na netoxickou vodu a kyslík za pomoci enzymů katalasy a peroxidasy (Kim et al., 2003). Ačkoliv  $H_2O_2$  není radikálem, může být rovněž přeměněn Fentonovou reakcí na hydroxylový radikál, který je velmi reaktivní (Maurya & Rizvi, 2007). SOD také disponuje protizánětlivou aktivitou (Oztürk & Gümüşlü, 2004).

V aktivitě SOD jsem nepozorovala prakticky žádný rozdíl mezi skupinou starých a mladých potkanů. Ve studii, kterou provedli Ramesh et al. (2012), bylo pozorováno signifikantní snížení aktivity SOD u ročních potkaních samců kmene Sprague-Dawley v porovnání s dvouměsíčními. Je tedy možné, že aktivita SOD se v dospělosti snižuje (příčinou může být ROS-indukovaná degradace enzymu nebo jeho redukováná syntéza) a ve stáří se opět dostává na původní hladinu právě díky nárůstu oxidačního stresu, množství ROS a snahou organismu o jejich odstranění. Naopak Lankin et al. (1981) pozorovali zvyšování aktivity s věkem (od narození do stáří dvou let). Zvýšení aktivity bylo demonstrováno i ve studii, kterou provedli Kim et al. (2003), kteří srovnávali 5-týdenní a 9-měsíční potkany a rozdíl v aktivitě jaterní SOD mezi nimi byl dvojnásobný (v mozku byla aktivita SOD vyšší pouze o jednu třetinu). Uvádí také, že aktivity antioxidantních enzymů pravděpodobně klesají u velmi starých zvířat.

U jiného zvířecího modelu, zlatého křečka, aktivita SOD s věkem klesala (6-týdenní v porovnání s 2,5-letými) (Vishwas et al., 2013). U člověka se aktivita SOD s věkem signifikantně zvyšovala (Maurya & Rizvi, 2007).

Dalším z antioxidantních enzymů je **katalasa**, která je rovněž součástí důležitého obranného systému odstraňujícího škodlivé ROS *in vivo*. Je klíčovým enzymem podílejícím se na vylučování  $H_2O_2$  (Bakala et al., 2012). Ve svém aktivním místě obsahuje hem, má jeden z největších obrátů a podílí se také na reprodukčních reakcích (Yang et al., 2013). Hladina katalasy v organismu je úzce spjata s buněčnou odpovědí na různý oxidační stres (Kim et al., 2003). Katalasa ne zcela známými mechanismy spojuje cytoplasmu a peroxisomy (Murakami et al., 2013).

U katalasy byl patrný pokles aktivity ve stáří, který nebyl statisticky významný. Aktivita klesla oproti skupině mladých potkanů sice jen o jednu pětinu, přesto by tento rozdíl mohl být důležitý, právě vzhledem k významu katalasy v systému antioxidantní obrany. Snížení její aktivity může vyústit v nárůst hladiny peroxidu vodíku a tím k inhibici SOD. Tento pokles může být způsoben zvyšujícím se oxidačním poškozením a také glykací enzymu, která vede v konečném důsledku k narušení funkce katalasy (Bakala et al., 2012).

Nepatrný pokles aktivity CAT zaznamenali i Bakala et al. (2012) v mitochondriích získaných z jater potkana. *In vitro* byl také prokázán vysoký pokles aktivity katalasy po modifikaci fruktózou. Paradoxně ovšem glykace methylglyoxalem

aktivitu enzymu mírně zvyšovala (Bakala et al., 2012). Ramesh et al. (2012) pozorovali signifikantní pokles aktivity CAT v játrech, ledvinách, srdci i plicích potkanů starých dvanáct měsíců v porovnání s dvouměsíčními a poukázali na jednu z dalších možných příčin - redukovanou hladinu NADPH. NADPH je potřebný pro regeneraci katalasy z inaktivní formy. Negativní korelaci enzymu s procesem stárnutí pozorovali i Vishwas et al. (2013) ve studii s křečky. Naopak Kim et al. (2003) nezaznamenali žádný rozdíl mezi aktivitou katalasy u potkanů starých 5 týdnů a 9 měsíců v játrech, ale v mozku ano. Změny v aktivitě CAT ve třech věkových skupinách potkanů prokázali Oztürk & Gümüşlü (2004), kteří pozorovali signifikantní pokles ( $p < 0,01$ ) u 6-měsíčních potkanů oproti měsíčním a ročním. U ročních potkanů pak byla aktivita CAT nejvyšší.

Mezi antioxidační enzymy patří i **system peroxidas**. Redoxní reakce hrají důležitou roli na různých úrovních buněčných funkcí, zahrnujících odpověď na stres a buněčný růst. Thioredoxinreduktasa a thioltransferasa jsou důležitou součástí obrany před oxidačním stresem, regulují buněčnou proliferaci a expresi genů prostřednictvím aktivace transkripčních faktorů. Peroxidasy také katalyzují dehydrogenaci množství organických sloučenin, např. fenolů, aromatických aminů, hydrochinonů a dalších (Kim et al., 2003).

Stejně jako u SOD se i aktivita peroxidasy mezi skupinou mladých a starých potkanů minimálně lišila, kdy jsem u starých potkanů pozorovala 5% pokles aktivity. Superoxidový radikál se zdá být klíčovým modulátorem aktivity myeloperoxidasy (Davies et al., 2008). Za dismutaci  $O_2^{\cdot-}$  je zodpovědný enzym SOD, u něhož jsem nezaznamenala změnu v aktivitě v průběhu stárnutí, a lze tedy předpokládat, že se nezměnila hladina  $O_2^{\cdot-}$  a tím regulace myeloperoxidasy.

Kim et al. (2003) pozorovali nepatrné zvýšení aktivity thioltransferasy v mozku 9-měsíčních potkanů v porovnání s 5-týdenními, ačkoliv v játrech se aktivita tohoto enzymu nezměnila. U thioredoxinreduktasy se aktivita v játrech o jednu třetinu zvýšila, v mozku zůstala stejná. Tyto enzymy se tedy mohou podílet na aspektu stárnutí rozdílně.

Oztürk & Gümüşlü (2004) sledovali aktivitu Se-GSH-peroxidasy u měsíčních, 6-měsíčních a ročních potkanů. Nejvyšší aktivitu vykazoval enzym u měsíčních potkanů, sedminásobný pokles pak nastal u 6-měsíčních a u ročních se aktivita opět zvýšila a to pětinašobně.

## 7. ZÁVĚR

1. Stanovila jsem specifické aktivity 4 isoform CYP v mikrosomálních frakcích získaných z jater potkanů starých 6 týdnů a 21 měsíců a porovnávala rozdíly mezi oběma skupinami. Přestože byla specifická aktivita CYP1A1 ve skupině starých potkanů téměř dvojnásobně vyšší než u mladých potkanů, nebyl tento rozdíl statisticky významný. To bylo zřejmě způsobeno velkou interindividuální variabilitou patrnou ve skupině starých potkanů. Naopak u isoform CYP1A2, CYP2B a CYP3A specifická aktivita s věkem klesala. Tento pokles byl statisticky významný jen u isoform CYP2B a CYP3A, kde došlo ve skupině starých potkanů k téměř pětinašobnému respektive dvojnásobnému snížení aktivity. Větší rozdíly v aktivitě mezi jednotlivci dané skupiny jsem zaznamenala jen u CYP3A u starých potkanů.
2. Stanovila jsem specifické aktivity GST, SOD, CAT a Px v cytosolických frakcích získaných z jater potkanů starých 6 týdnů a 21 měsíců a porovnávala rozdíly mezi oběma skupinami. Specifická aktivita GST byla ve skupině starých potkanů pětkrát vyšší než ve skupině mladých potkanů, tento rozdíl byl statisticky významný. Rozdíly v absolutních hodnotách specifické aktivity GST mezi jednotlivci obou skupin se s věkem zvětšovaly. Specifické aktivity SOD, CAT a Px se s věkem významně neměnily, a také rozdíly v aktivitě mezi jednotlivci v obou skupinách byly minimální.
3. Ověřila jsem expresi proteinu GST v cytosolických frakcích získaných z jater potkanů starých 6 týdnů a 21 měsíců pomocí imunoblottingu se specifickou protilátkou proti GST $\alpha$ . Ve vzorcích došlo k označení dvou bandů s molekulovou hmotností kolem 26 kDa, které zřejmě odpovídají dvěma různým podjednotkám tohoto enzymu. Byly patrné rozdíly mezi jednotlivci v obou skupinách. Po zprůměrování hodnot denzity a jejich normalizaci na množství housekeeping proteinu  $\beta$ -aktinu v obou skupinách jsem našla jen nesignifikantní zvýšení exprese tohoto enzymu ve skupině starých potkanů, které ovšem nemůže vysvětlit výrazný nárůst specifické aktivity tohoto enzymu.

## 8. SEZNAM ZKRATEK

AA	Akrylamid
ALT	Alaninaminotransferasa
AP	Alkalická fosfatasa
APS	Peroxodisíran amonný
AST	Aspartátaminotransferasa
BFM	Bromfenolová modř
bis AA	Bis-akrylamid
BROD	Benzyloxyresorufin
BSA	Bovinní sérový albumin
CAT	Katalasa
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzen
CYP	Cytochrom P450
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermální růstový faktor
ER	Endoplazmatické retikulum
EROD	Ethoxyresorufin
FMO	Flavinové monooxygenasy
GHS	Glutathion
GPx	Glutathionperoxidasa
GST	Glutathion- <i>S</i> -transferasa
HGF	Růstový faktor pro hepatocyty
LPO	Lipoperoxidace

MAP kinasa	Mitogeny aktivovaná proteinkinasa
MROD	Methoxyresorufin
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotid fosfát (redukovaná forma)
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid fosfát (oxidovaná forma)
OPD	<i>O</i> -fenylendiamin dihydrochlorid
PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza
PROD	Pentoxyresorufin
Px	Peroxidasy
ROS	Reaktivní formy kyslíku ( <i>reactive oxygen species</i> )
SDS	Dodecyl síran sodný
SOD	Superoxiddismutasa
SNPs	Jednoduchý nukleotidový polymorfismus
TBS	TRIS pufr
TBST	Směs TRIS pufru a Tweenu 20
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	Uridin difosfát
VR	Volné radikály

## 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

**Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2001):** Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics, *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (5-6): 737-747

**Asaoka Y., Sakai H., Sasaki J., Goryo M., Yanai T., Masegi T., Okaa K. (2010):** Changes in the gene expression and enzyme activity of hepatic cytochrome P450 in juvenile Sprague-Dawley rats, *J. Vet. Med. Sci.* 72(4): 471-479

**Bakala H., Hamelin M., Mary J., Borot-Laloi C., Friguet B. (2012):** Catalase, a target of glycation damage in rat liver mitochondria with aging, *Biochim. Biophys. Acta* 1822 (10): 1527-1534

**Banerjee R., Becker, D., Dickman, M., Gladyshev, V., Ragsdale, S. (2008):** Redox biochemistry, Wiley-interscience, Hoboken, New Jersey, str. 109, 55, 51, 63, 317 stran

**Banger K. K., Lock E. A., Reed C. J. (1996):** Regulation of rat olfactory glutathion-S-transferase expression, *Biochem. Pharmacol.* 52 (5): 801-808

**Beusekom C. D., Schipper L., Fink-Gremmels J. (2010):** Cytochrome P450-mediated hepatic metabolism of new fluorescent substrates in cats and dogs, *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 33 (6): 519-527

**Bezooijen van C. F. A. (1984):** Influence of age-related changes in rodent liver morphology and physiology on drug metabolism – a review, *Mech. Ageing Dev.* 25 (1-2): 1-22

**Bindoli A., Fukuto J. M., Forman H. J. (2008):** Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling, *Antioxid. Redox Signal.* 10 (9): 1549-1564

**Carrillo M. C., Nokubo M., Kitani K., Satoh K., Sato K. (1991):** Age-related alteration of enzymes activities and subunits of hepatic glutathion-S-transferases in male and female Fischer-344 rats, *Biochim. Biophys. Acta* 1077 (3): 325-331

**Czekaj P., Bryzek A., Czekaj T. M., Koryciak-Komarska H., Wiaderkiewicz A., Plewka D., Sieroń A. L. (2010):** Cytochrome P450 mRNA expressions along with *in vitro* differentiation of hepatocyte precursor cells from fetal, young and old rats, Folia Histochem. Cytobiol. 48 (1): 46-57

**Červinková Z. (2010):** Funkce jater, In: Ehrmann J, Hůlek P a kol. (2010) Hepatologie. Grada Publishing, 616 stran

**Davies M. J., Hawkins C. L., Pattison D. I., Rees D. M. (2008):** Mammalian heme peroxidases: From molecular mechanisms to health implications, Antioxid. Redox Signal. 10 (7): 1199-1234

**Dostalek M., Hardy K. D., Milne G. L., Morrow J. D., Chen Ch., Gonzalez F. J., Gu J., Ding X., Johnson D. A., Johnson J. A., Martin M. V., Guengerich F. P (2008):** Development of oxidative stress by cytochrome P450 induction in rodents is selective for barbiturates and related to loss of pyridine nucleotide-dependent protective systems, J. Biol. Chem. 283 (25): 17147-17157

**Elbarbry F., Alcorn J. (2009):** Ontogeny of glutathione and glutathione-related antioxidant enzymes in rat liver, Res. Vet. Sci. 87 (2): 242-244

**Góth L. (2003):** A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range, Clin. Chim. Acta 196 (2-3): 143-152

**Guengerich F. P. (1997):** Role of cytochrom P450 enzymes in drug-drug interactions, Adv. Pharmacol. 43: 7-35

**Guengerich F. P., Rendic S. (2010):** Update Information on Drug Metabolism Systems -2009, Part I, Curr. Drug Metab. 11 (1): 1-3

**Habig W. H., Pabs M. J., Jakoby W. B. (1974):** Glutathion-S-transferasa: The first enzymatic step in mercapturic acid formation, J. Biol. Chem. 249 (22): 7130-7139



*Hepatocyt v elektronové mikroskopii* [online] Poslední revize 23. 1. 2013 [cit. 2013-02-12] Dostupné z:

<http://ultrastruktura.upol.cz/v%C3%BDuka/AtlasEM/tr/slides/tr010.html>

**Hines R. N. (2008):** The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events, *Pharmacol. Ther.* 118 (2): 250–267

**Horbach G. J. M. J., van Asten J. G., Rietjens I. M. C. M., Kremers P., van Bezooijen C. F. A (1992):** The effect of age on inducibility of various types of rat liver cytochrom P-450, *Xenobiotica* 22 (5): 515-522

**Imaoka S., Fujita S., Funae Y. (1991):** Age-dependent expression of cytochrome P-450s in rat liver, *Biochim. Biophys. Acta* 1097 (3): 187-192

**Kim H. G., Hong S. M., Kim S. J., Park, H. J., Jung H. I., Lee Y. Y., Moon J. S., Lim H. W., Park1 E. H., Lim Ch. J. (2003):** Age-related changes in the activity of antioxidant and redox enzymes in rats, *Mol. Cells* 16 (3): 278-284

**Ji L. L., Dillon D., Wu E. (1990):** Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver, *Am. J. Physiol.* 258 (27): 919-923

**Kitani K. (1994):** Aging an the liver: functional aspects, *Arch. Gerontol. Geriatr.* 19 (2): 145-158

**Laemmli U. K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (5259): 680-685

**Lankin V. Z., Tikhaze A. K., Lemeshko V. V., Shermatov K., Kaliman L. A., Vikhert A. M. (1981):** Age changes in superoxid dismutase and glutathion peroxidase activity in cytosol and mitochondria in rat liver, *Bull. Eksp. Biol. Med.* 92 (9): 310-1

**Lewis D. F. V., Lake B. G., Dickins M. (2004):** Substrates of human cytochromes P450 from families CYP1 an CYP2: analysis of enzymes selectivity and metabolism, *Drug Metab. Drug Interact.* 20 (3): 111-142

**Maurya P. K., Rizvi S. I. (2010):** Age-dependent changes in glutathione-S-transferase: Correlation with total plasma antioxidant potential and red cell intracellular glutathione, *Ind. J. Clin. Biochem.* 25 (4): 398-400

**Mueller A., Hermo L., Robaire B. (1998):** The effects of aging on the expression of glutathione-S-transferase in the testis and epididymis of the brown Norway rat, *J. Androl.* 19 (4): 450-465

**Murakami K., Ichinohe Y., Koike M., Sasaoka N., Iemura S., Natsume T., Kakizuka A. (2013):** VCP is an integral component of a novel feedback mechanism that controls intracellular localization of catalase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, *PloS One* 8 (2): 1-7

**Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. (2003):** Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition, The McGraw-Hill Companies, USA, str. 626-630, 703 stran

**Nelson D. R. (1999):** Cytochrome P450 and the individuality of species, *Arch. Biochem. Biophys.* 369 (1): 1-10

**Overview of Western Blotting – Thermo Scientific** [online] Poslední revize 2013. [cit. 2013-02-20] Dostupné z: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=8259A7B6-7DA6-41CF-9D55-AA6C14F31193#electrophoreticseparationofproteins>

**Oztürk O., Gümüşlü S. (2004):** Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase, copper, zinc-superoxide dismutase and catalase activities, glutathione and its metabolizing enzymes, and lipid peroxidation in rat erythrocytes with age, *Exp. Gerontol.* 39 (2): 211-216

**Palasz A., Wiaderkiewicz A., Wiaderkiewicz R., Czekał P., Czajkowska B., Lebda-Wyborny T., Piwowarczyk A., Bryzek A. (2012):** Age-related changes in the mRNA levels of CYP1A1, CYP2B1/2, and CYP3A1 isoforms in rat small intestine, *Genes Nutr.* 7 (2): 197-207

**Plant N. (2006):** Use of reporter genes to measure xenobiotic-mediated activation of CYP gene transcription, *Methods in molecular biology* 320, Cytochrome P450 protocols: second edition: 343-354

**Ramesh M., Bharatam P. V. (2012):** CYP isoform specificity toward drug metabolism: analysis using common feature hypothesis, *J. Mol. Model* 18 (2): 709-720

**Ramesh T., Yoo. K. S., Kim S. W., Hwang S. Y., Sohn S. H., Kim I. W., Kim S. K. (2012):** Cordycepin (3'-deoxyadenosine) attenuates age-related oxidative stress and ameliorates antioxidant capacity in rats, *Exp. Gerontol.* 47 (12): 979-987

**Rizvi S. I., Maurya P. K. (2007):** Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans, *Mol. Biotechnol.* 37 (1): 58-61

**Saghir S. A., Khan S. A., McCoy A. T. (2012):** Ontogeny of mammalian metabolizing enzymes in humans and animals used in toxicological studies, *Crit. Rev. Toxicol.* 42 (5): 323-357

**Seviour D. K., Pelkonen O., Ahokas J. T. (2012):** Hepatocytes: The powerhouse of biotransformation, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44 (2): 257-261

**Schmucker D. L. (2001):** Liver function and phase I drug metabolism in the elderly: A paradox, *Drugs Aging* 2001, 18 (11): 837-851

**Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985):** Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1): 76-85

**Tee L. B. G., Gilmore K. S., Meyer D. J., Ketterer B., Vandenberghe Y., Yeoh G. C. T. (1992):** Expression of glutathion-S-transferase during rat liver development, *Biochem. J.* 282 (1): 209-218

**Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979):** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (9): 4350-4354

**Vauzelle-Kervroedan F., Rey E., Pariente-Khayat A., Bienvenu T., Badoual J., Olive G., Pons G. (1996):** Non invasive in vivo study of the maturation of CYP3A in neonates and infants, Eur. J. Clin. Pharmacol. 51 (1): 69-72

**Vishwas D. K., Mukherjee A., Haldar Ch., Dash D., Nayak M. K. (2013):** Improvement of oxidative stress and immunity by melatonin: An age dependent study in golden hamster, Exp. Gerontol. 48 (2):168-182

**Warrington J. S., Greenblatt D. J., Moltke von L. L. (2004):** Age-related differences in CYP3A expression and activity in the rat liver, intestine, and kidney, J. Pharmacol. Exp. Ther. 309 (2): 720-729

**Wauthier V., Verbeeck R. K., Calderon P. B. (2004):** Age-related changes in the protein and mRNA levels of CYP2E1 and CYP3A isoforms as well as in their hepatic activities in Wistar rats. What role for oxidative stress?, Arch. Toxicol. 78 (3): 131-138

**Yang J., Dong S., Jiang Q., Kuang T., Huang W., Yang J. (2013):** Changes in expression of manganese superoxide dismutase, copper and zinc superoxide dismutase and catalase in *Brachionus calyciflorus* during the aging process, PloS One 8 (2): 1-7

**Yun K. U., Oh S. J., Oh J. M., Kang K. W., Myung Ch. S., Song G. Y., Kim B. H., Kim S. K. (2010):** Age-related changes in hepatic expression and activity of cytochrome P450 in male rats, Arch. Toxicol. 84 (12): 939-946

**Zanger M., Gräff S., Braunbeck T., Alberti G., Köhler H. R. (1997):** Detection and induction of Cytochrome P450 (CYP 1A)-like proteins in *Julus scandinavicus* (Diplopoda) and *Oniscus asellus* (Isopoda): A First analysis, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58 (1): 511-517

**Zwart de L., Scholtenb M., Monbaliua J. G., Annaerte P. P., Van Houdta J. M., Van den Wyngaertd I., De Schaepdrijvera L. M., Bailey G. P., Coogane T. P., Coussementa W. C., Mannensa G. S. (2008):** The ontogeny of drug metabolizing enzymes and transporters in the rat, *Reprod. Toxicol.* 26 (3-4): 220–230