

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

Studijní program farmacie

Modulace aktivit redukčních enzymů
polycyklickými aromatickými uhlovodíky
(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce: Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Hradec Králové, 2006

Marie Urbánková

Velice děkuji Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za ochotu, trpělivost, věnovaný čas a cenné rady při řešení této diplomové práce.

Za pomoc a zasvěcení do metodiky práce patří poděkování také všem zaměstnancům Katedry biochemických věd, zvláště Doc. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. a Mgr. Romaně Novotné.

Děkuji Mgr. Pavlu Krčmářovi za kvantifikaci genové exprese, která byla provedena ve Výzkumném ústavu veterinárních léčiv (VÚVeL) Brno, oddělení chemie a toxikologie, na náklady tohoto ústavu.

Za rady a pomoc s konečnou úpravou této práce děkuji Ing. Josefu Jakoušovi, Ing. Radimu Skálovi a Ing. Jiřímu Stříteckému.

Obsah:

1.	ÚVOD	5
2.	TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1	Polycyklické aromatické uhlovodíky	6
2.1.1	Struktura	6
2.1.2	Příklady	7
2.1.3	Fyzikálně-chemické vlastnosti	7
2.1.4	Působení PAHů na živé organismy	7
2.1.5	Vlastnosti PAHů použitých v této práci	8
2.2	Působení enzymů na PAHy	10
2.2.1	Transport PAHů do místa biotransformace	10
2.2.2	Receptory zprostředkované účinky PAHů	10
2.2.3	Základní cesty metabolické aktivace	11
2.2.4	Důsledky vzniku ROS	19
2.2.5	Shrnutí účinků	21
2.3	Redukční enzymy	22
2.3.1	Aldo-keto reductasy	22
2.4	Působení PAHů na enzymy	25
2.4.1	Ovlivnění genové exprese	25
2.4.2	Specifické DNA sekvence - RE (response elements)	25
2.4.3	Indukce zprostředkovaná ARE/EpRE a XRE	26
2.5	Metabolismus substrátů použitých v této práci	28
2.5.1	4-Pyridinkarboxaldehyd	28
2.5.2	1-Acenaftenol	28
3.	Cíl práce	30
4.	Experimentální část	31
4.1	Materiál	31
4.1.1	Biologický materiál	31
4.1.2	Chemikálie	31
4.1.3	Připravované roztoky	32
4.1.4	Pomůcky a přístroje	33
4.2	Pracovní postup	34
4.2.1	Izolace hepatocytů	34

4.2.2	Test cytotoxicity – MTT	37
4.2.3	Příprava subcelulárních frakcí	38
4.2.4	Stanovení koncentrace bílkoviny metodou redukce BCA	39
4.2.5	Spektrofotometrické stanovení aktivit reduktas.....	40
4.2.6	Inkubace cytosolu z hepatocytů s oracinem.....	42
4.2.7	HPLC analýza produktů biotransformace oracinu.....	44
4.2.8	Izolace celkové RNA z izolovaných hepatocytů	44
4.2.9	Kvantifikace genové exprese	45
5.	Výsledky	48
5.1	Test cytotoxicity.....	48
5.2	Obsah bílkoviny	50
5.3	Aktivity redukčních enzymů.....	55
5.4	Kvantifikace produktů biotransformace oracinu	65
5.5	Kvantifikace genové exprese	67
6.	Diskuse.....	69
7.	Závěr	73
8.	Seznam zkratk	74
9.	Literatura.....	76

1. ÚVOD

Redukční enzymy spolu s dalšími biotransformačními enzymy hrají důležitou úlohu při vypořádávání se organismu s cizorodou látkou. Jako cizorodá látka (xenobiotikum) je označována každá látka, která není tělu vlastní. Jedná se především o různá léčiva, potravinové doplňky, zemědělské a průmyslové kontaminanty, mezi něž patří i polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHy). Při enzymatické přeměně cizorodých látek může docházet k jejich deaktivaci nebo v některých případech naopak k bioaktivaci, která je buď žádoucí (např. u proléčiv), nebo nežádoucí jako je tomu v případě polycyklických aromatických uhlovodíků. Takřka všechny organismy jsou vystaveny působení PAHů jako všudypřítomných kontaminantů životního prostředí. Vznikají při jakémkoli nedokonalém spalování jak při průmyslové výrobě, tak i například při přípravě pokrmů a v neposlední řadě při kouření.

Parentní látky jsou metabolizovány na daleko škodlivější produkty, které jsou vlastní příčinou toxicity PAHů. Při biotransformaci PAHů vznikají i další, většinou velmi reaktivní elementy, které mohou ovlivnit homeostázu buňky i celého organismu tím, že mění například redoxní stav nebo vyčerpávají kofaktory enzymatických reakcí.

Působení enzymů a PAHů není jednostranné, ale vzájemné. Tedy nejen že enzymy ovlivňují PAHy, ale enzymy jsou PAHy ovlivňovány. Toto působení je buď ve smyslu inhibice enzymů působením produktů vzniklých danou metabolickou cestou, nebo PAHy působí indukčně na enzymy z nadrodiny cytochromu P450 i nadrodiny aldo-keto reductas.

Indukci enzymů je možné pozorovat na zvýšení jejich katalytické aktivity, i na zvýšení celkového množství mRNA. Ukazatele výše zmíněných hodnot byly sledovány i v rámci této práce, která je zaměřena na ovlivnění redukčních enzymů z nadrodiny aldo-keto reductas polycyklickými aromatickými uhlovodíky.

2. TEORETICKÁ ČÁST

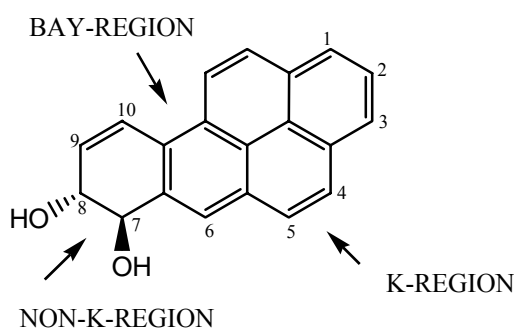
2.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – PAH) jsou všudypřítomné kontaminanty životního prostředí, které vznikají při nedokonalém spalování organických materiálů jako dřeva nebo fosilních paliv, zejména při výrobě energie, spalování odpadů, při krakování ropy, metalurgických procesech, při výrobě hliníku, koksu, asfaltu, cementu, uvolňují se při provozu rafinerií, krematorií, při požárech a v neposlední řadě při kouření. Ve všech případech, kdy pozorujeme vznik sazí a tmavého kouře, vznikají velká množství PAHů¹.

2.1.1 Struktura

PAHy tvoří rozsáhlou heterogenní skupinu, jejich molekuly jsou tvořeny ze tří a více benzenových kruhů, nejtoxičtější látky z této skupiny mají od čtyř do sedmi kruhů². Nejméně dva benzenové kruhy jsou spojeny s dvěma sousedícími kruhy, s nimiž sdílejí dva sousedící uhlíkové atomy. Kromě PAHů, které jsou tvořeny pouze uhlíky a vodíky, jsou známé i takové, které obsahují i heteroatomy jako dusík a síru.

Chování těchto látek v organismu je také ovlivněno celkovým tvarem molekuly (hlavně planaritou), strukturální rysy (viz obr. 1) a případnou substitucí jader, všeobecně řečeno, karcinogenita se zvyšuje s metylací, ale rozhodující je její poloha [1].



Obr. 1: Strukturální rysy polycyklických aromatických uhlovodíků [2]

¹ <http://bezjedu.arnika.org/chemicka-latka.shtml?x=610570>

² http://www.toronto.ca/health/pdf/cr_appendix_b_pah.pdf

2.1.2 Příklady

Tato práce je zaměřená na účinky benzo[*a*]pyrenu a benzo[*b*]fluorantenu. Dalšími polycyklickými aromatickými uhlovodíky jsou například acenaften, acenaftylen, antracen, benzo[*a*]antracen, dibenz[*a,h*]antracen, chrysen, fenantren, fluoren, fluoranten, benzo[*k*]fluoranten, benzo[*j*]fluoranten, benzo[*g,h,i*]perylene, pyren, indeno[*1,2,3-c,d*]pyren a řada dalších látek.

2.1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Fyzikální a chemické vlastnosti PAHů závisí na velikosti (počtu uhlíkových atomů) a tvaru (typu spojení kruhů) jednotlivé molekuly. Všechny zcela nenasycené PAHy jsou pevné látky, při laboratorní teplotě a mají relativně vysoký bod tání a varu.

Lipofilní PAHy mohou být rychle rozpuštěny v organických rozpouštědlech nebo organických kyselinách. Ve vodném prostředí a atmosféře jsou adsorbovány na jemných kapalných nebo pevných částicích, nebo jsou rozpuštěny v jakékoli olejovité látce, která může kontaminovat vodu, sedimenty a půdu. PAHy o nižší molekulové hmotnosti (obsahují 3 kruhy) mohou být také rozpuštěny ve vodě, nebo se vyskytovat v atmosféře jako volné¹.

2.1.4 Působení PAHů na živé organismy

Lidé jsou působení PAHů vystaveni primárně příjmem potravy a inhalací. Obsah PAHů v potravinách může výrazně zvýšit způsob jejich tepelné úpravy. Vysoké koncentrace PAHů v mase byly naměřeny po jeho úpravě grilováním, uzením a pečením (při teplotě nad 200 °C). Potravinou přijímáme denně 50 - 290 ng a ze vzduchu asi 20 ng, pokud člověk vykouří denně 20 cigaret, zvýší si příjem o dalších 210 ng. Pobyt v zakouřené místnosti může příjem benzo[*a*]pyrenu také výrazně zvýšit (asi o 10 ng za každou hodinu strávenou v zakouřené místnosti)². Za normálních okolností je kontakt s PAHy pokožkou relativně nedůležitý. Podobně jako ostatní v tučných rozpustné sloučeniny, jsou i PAHy všeobecně dobře absorbovány, mohou rychle vstupovat do

¹ http://www.toronto.ca/health/pdf/cr_appendix_b_pah.pdf

² <http://bezjedu.arnika.org/chemicka-latka.shtml?x=610570>

buněk a stát se nedostupnými pro exkreci. Biotransformační procesy mají tendenci zvyšovat rozpustnost PAHů ve vodě, což usnadňuje exkreci parentních látek ve formě polárnějších metabolitů. Většina z absorbované dávky je vylučována v transformované formě (pouze velmi malé množství se vyloučí jako látka parentní) žlučí a stolicí, v mnohem menším rozsahu močí.

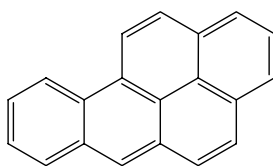
Biotransformace a s ní spojené procesy značnou měrou ovlivňují chování PAHů v organismu se všemi souvisejícími vlivy, jak bude uvedeno dále.

PAHy indukují množství toxických účinků. Způsobují podráždění kůže, očí a mukózy dýchacího systému. Nepříznivě působí jak na samičí tak samčí reprodukční systém a na vývoj plodu, způsobují malformace, narození mrtvého plodu, resorpci, imunosupresi, vznik rozštěpů a jsou tumorigenní. Genotoxické účinky některých PAHů byly opakovaně demonstrovány jak v *in vivo* testech na hlodavcích, tak *in vitro* testech za použití savčích (včetně lidských) buněčných linií, stejně tak i u prokaryont¹.

2.1.5 Vlastnosti PAHů použitých v této práci

Benzo[a]pyren

Pro označení této látky se používají i synonymní názvy, například benzo[*d,e,f*]chrysen; benzopyren; 1,2-benzopyren; 3,4-benzopyren; 3,4-benzopyren; 3,4-benzylpyren; 3,4-benz[*a*]pyren; 6,7-benzopyren; B[*a*]P; BP; 3,4-BP.



Obr. 2: Benzo[*a*]pyren

Sumární vzorec benzo[*a*]pyrenu je C₂₀H₁₂, molekulová hmotnost 252,3 g/mol. Tato pevná látka s bodem tání 176 °C vytváří žlutý prášek nebo krystaly tvaru šupinek či jehliček, je stabilní, inkompatibilní se silnými oxidačními činidly.

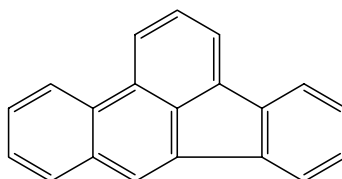
Benzo[*a*]pyren je jed, působí jako karcinogen, mutagen, tumorigen, neoplastigen a teratogen. Způsobuje rakovinu močového měchýře, kůže a plic, může poškodit vývoj

¹ http://www.toronto.ca/health/pdf/cr_appendix_b_pah.pdf

plodu, může působit poškození reprodukce, vylučuje se mateřským mlékem. Dráždí oči, respirační systém a kůži, může měnit její barvu a vlastnosti. Sluneční světlo zvyšuje poškození způsobené touto látkou¹. Je velmi toxický vůči životnímu prostředí.

Benzo[*b*]fluoranten

Tato látka je označována také synonymními názvy benzofluoranten; benzo[*e*]fluoranten; 3,4-benz[*e*]acenaftantrylen; benz[*e*]acenaftantrylen; 2,3-benzofluoranten; 3,4-benzofluoranten; B(*b*)F; B*b*F; B[*b*]F.



Obr. 3: Benzo[*b*]fluoranten

Sumární vzorec benzo[*b*]fluorantenu je C₂₀H₁₂, molekulová hmotnost 252,3 g/mol. Tato pevná krystalická látka s bodem tání 163-165 °C vytváří naředlý až hnědožlutý prášek, je stabilní, inkompatibilní se silnými oxidačními činidly.

Benzo[*b*]fluoranten je toxická látka, předpokládaný lidský karcinogen, může působit jako iritant². Je velmi škodlivý pro vodní organismy, může působit dlouhodobé poškození životního prostředí³.

¹ <http://risk.lsd.ornl.gov/tox/profiles/bap.shtml>

² <http://www.physchem.ox.ac.uk/MSDS/BE/benzo%5bb%5dfluoranthene.html>

³ <http://risk.lsd.ornl.gov/tox/profiles/benzob.shtml>

2.2 Působení enzymů na PAHy

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHy) jsou všudypřítomné látky znečišťující životní prostředí a mohou zapříčiňovat rakovinu člověka. Jsou považovány za prokarcinogeny, protože vyžadují enzymatickou aktivaci na elektrofilní částice. Přestože biotransformací PAHů vznikají jejich hydrofilnější deriváty, které mohou být snadněji vyloučeny z organismu, jsou právě tyto látky vzniklé biotransformací vlastní příčinou škodlivých účinků PAHů. PAHy jsou biotransformovány ve všech tkáních. Biotransformační procesy zahrnují několik možných cest s různým stupněm enzymové aktivity. Aktivity a afinity enzymů v dané tkáni určují, která metabolická cesta bude převažovat¹.

2.2.1 *Transport PAHů do místa biotransformace*

PAHy jsou lipofilní sloučeniny, které se v organismu absorbují pasivní difúzí přes mukózní vrstvu v plicích a stratum corneum pokožky. Gastrointestinální absorpce je urychlena tuky, PAHy se váží na lipoproteiny a lymfou přes ductus thoracicus se dostávají do krve. Lipofilita PAHů jim umožňuje rychle penetrovat buněčnou membránu¹.

2.2.2 *Receptory zprostředkované účinky PAHů*

PAHy vykazují mnoho nepříznivých biologických účinků, včetně imunosuprese, teratogenity, rozvoje rakoviny a hormonálních účinků (polycyklickou strukturou jsou podobné steroidním hormonům). Všechny tyto zdánlivě nepříbuzné účinky jsou zprostředkovány trvalou dlouhodobou aktivací cytoplasmatického receptoru zvaného AhR (Aryl-hydrocarbon Receptor) a následným narušením buněčné homeostázy. AhR vykazuje přísnou specifitu pro planární aromatické látky, neplanární musí být nejdříve metabolizovány na sloučeniny planární [1]. Funkční AhR je nutný pro fyziologické

¹ <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf>

funkce organismu, například správnou činnost imunitního systému. Ovlivněním tohoto receptoru tak PAHy mohou způsobovat imunosupresi, toxicky působit na reprodukční systém a podporovat karcinogenezi.

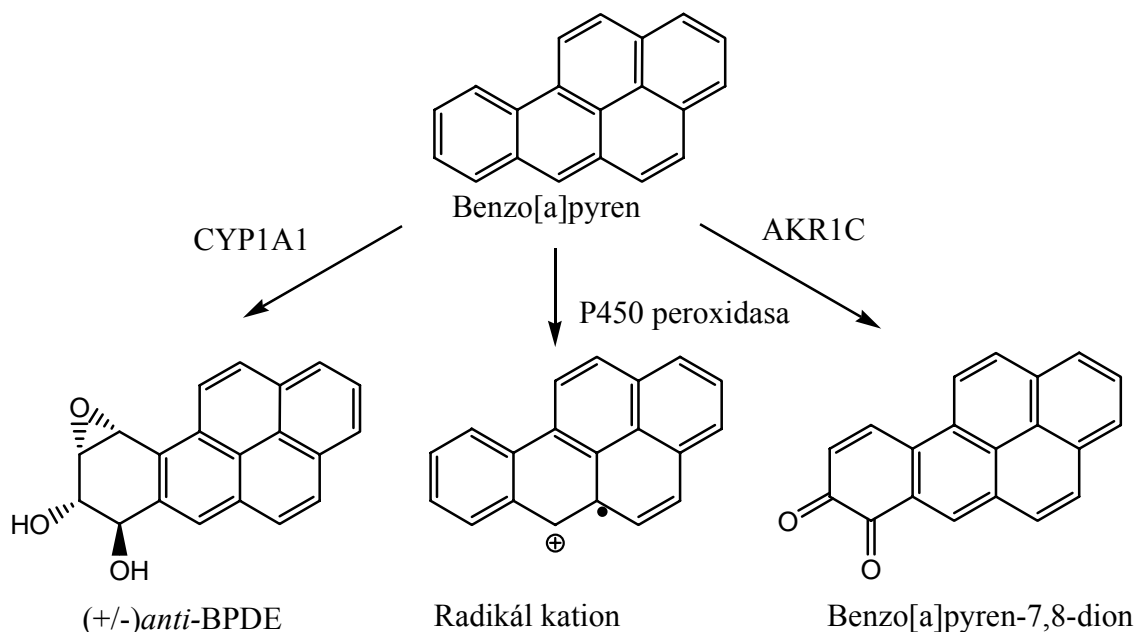
Mimo receptoru AhR může účinky PAHů zprostředkovávat i další receptor, jedná se o 4S PAH vázící protein. 4S protein specificky váže určité PAHy s vysokou afinitou a přesouvá se do jádra. Tento protein byl identifikován jako glycin-N-metyltransferasa, jejíž homodimer vystupuje jako receptor.

Sterická podobnost PAHů a steroidních molekul vede k předpokladu, že by mohly být schopné vázat se na tytéž receptory jako steroidní hormony. Jak *in vivo* tak *in vitro* studiích bylo dokázáno, že PAHy mají jak estrogenní tak antiestrogenní aktivitu. Za účinek jsou zodpovědné spíše fenolické metabolity než parentní sloučeniny. Účinnost 3-hydroxy-benzo[*a*]pyrenu a 9-hydroxy-benzo[*a*]pyrenu byla ekvivalentní estradiolu¹.

2.2.3 Základní cesty metabolické aktivace

Byly navrženy tři základní cesty metabolické aktivace (obr. 4). Mezi ně patří utváření dioleoxidů katalyzované různými cytochromy P450, z nichž hlavní roli hraje CYP1A1, utváření radikál kationů katalyzované P450 peroxidasami a utváření reaktivních a redoxně aktivních *o*-chinonů katalyzované působením dihydrodioldehydrogenas (DD), které jsou členy aldo-ketoreduktasové genové nadrodiny [3].

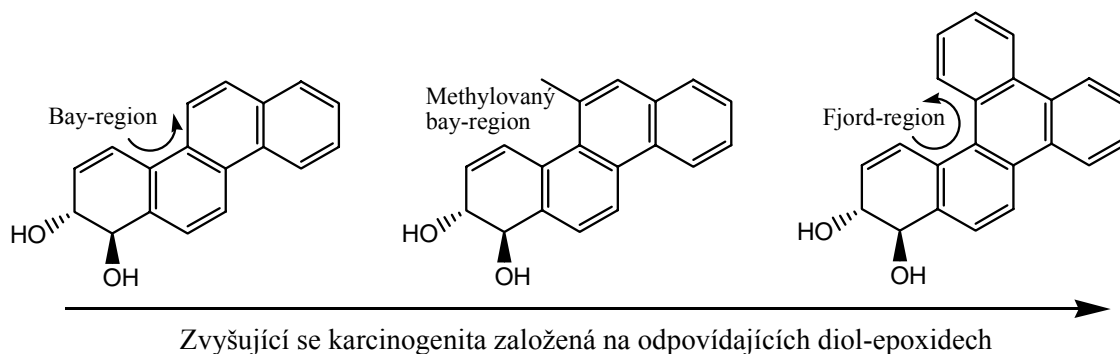
¹ http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out154_en.pdf



Obr. 4: Biotransformační aktivace benzo[a]pyrenu jako reprezentivní a nejvíce studované látky ze skupiny polycyklických aromatických uhlovodíků

Aktivace na diolepoxydy

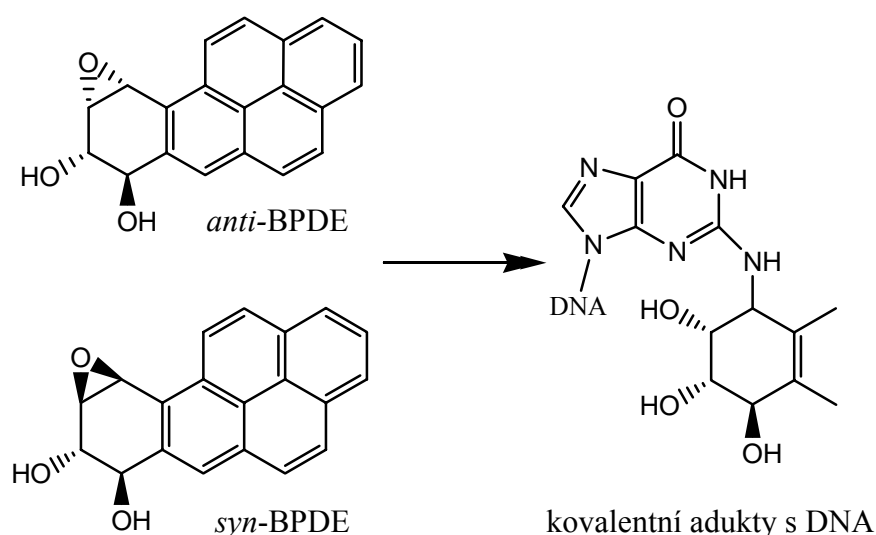
Na terminálním benzenovém kruhu dochází k počáteční epoxidaci působením CYP, který tvoří arenoxid. Ten je následně hydrolyzován epoxid hydrolasou na *trans*-dihydrodiol (proximální karcinogen). Takto metabolicky vzniká jen jeden stereoizomer *trans*-dihydrodiolu. Sekundární epoxidací působenou CYP1A1 vznikají *anti*-diol epoxidy (konečné karcinogeny). Karcinogenita závisí na strukturních rysech molekuly (obr.5).



Obr. 5: Vztah struktury a aktivity, který určuje karcinogenitu PAHů a jejich odpovídajících diol-epoxidů [4].

Důsledky:

Diolepoxydy tvoří N²-deoxyguanosinové adukty s DNA (viz obr. 6), jsou mutagenní, tumorigenní, aktivují *c-H-ras-1* protoonkogen kódující cytoplasmatický GTP-vázající protein, který je součástí signálních drah. Mutací se protoonkogen mění v onkogen *Ras*, který vede k produkci hyperaktivního proteinu Ras. Tento mutantní protein Ras stimuluje buňky k dělení bez závislosti na růstových faktorech. Výsledná neřízená proliferace buněk přispívá ke vzniku rakoviny. Mutace v genech *Ras* se vyskytují až u 30 % případů rakoviny u lidí [5]. N²-deoxyguanosinové adukty s DNA dále způsobují bodové mutace, především transverzi G na T, což má za výsledek inaktivaci genu *p53* [3]. Mutace genu *p53* vede ke ztrátě jeho antionkogenní aktivity. Mutovaný gen *p53* nemůže zabránit dělení buněk s poškozenou DNA nebo takové buňky přivést k apoptóze¹.



Obr. 6: Tvorba N²-deoxyguanosinových aduktů s DNA [2]

Aktivace na radikál kationty

Vznik radikál kationtů je katalyzován působením P450 peroxidasy v mikrosomech. Radikál kationty vznikají jednoelektronovou oxidací nejvíce elektrofilního uhlíku, v případě B[a]P je to uhlík C6.

¹ <http://www.zdrava-rodina.cz/med/med0202/med0213.html>

Důsledky:

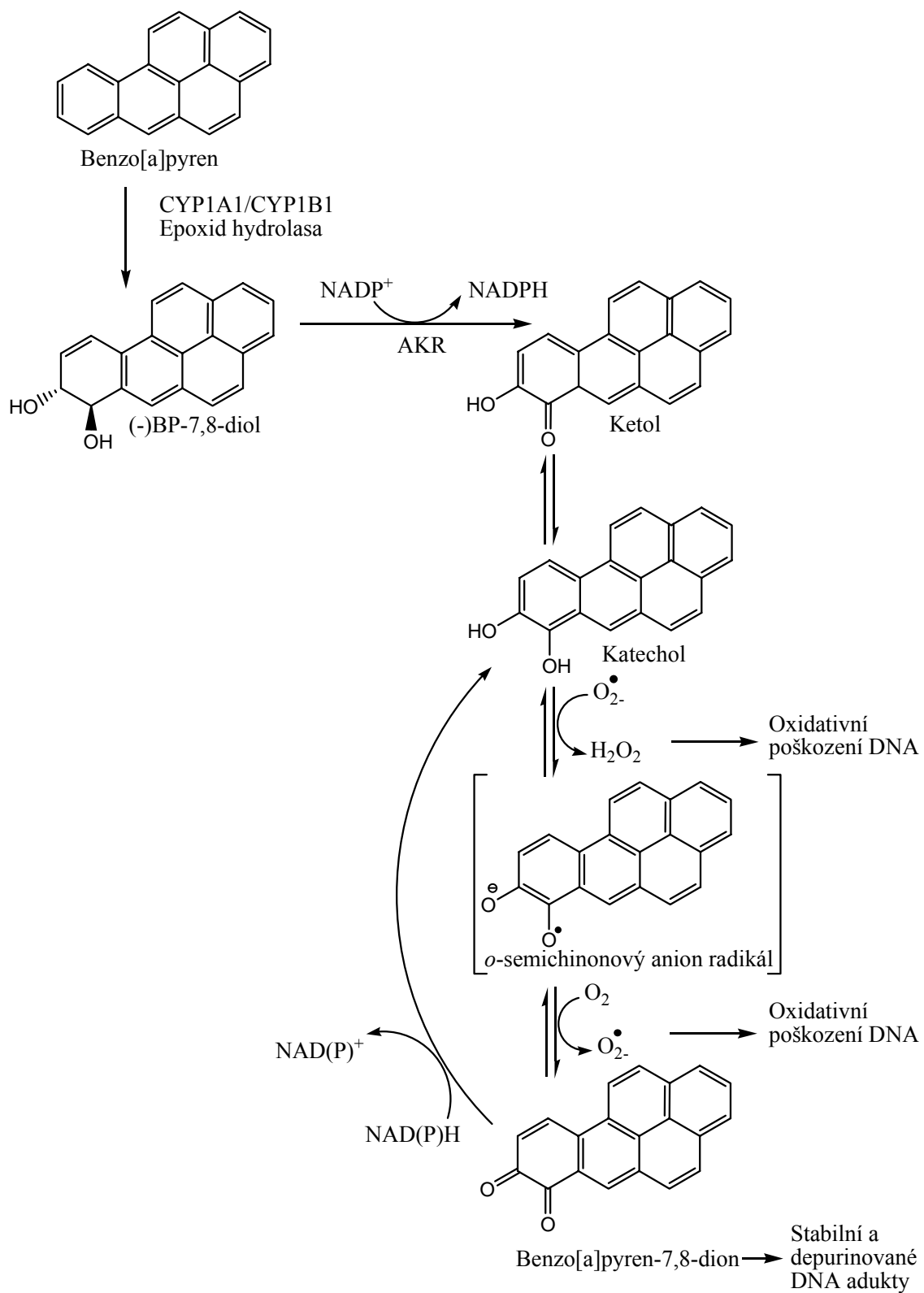
Radikál kationty tvoří především depurinované adukty s N7 a C8 pozicemi guaninu (G) a N7 pozicí adeninu (A). Pokud jednou vzniknou apurinová místa, je A vždy umístěn naproti tomuto místu. V průběhu replikace je T párován s A, čímž se otvírá přímá cesta k transverzi G na T, pozorované v *ras* a *p53* [3].

Aktivace na *o*-chinony

Této metabolické cesty se účastní redukční enzymy, na které je zaměřena tato práce, proto tomuto způsobu metabolické aktivace PAH bude věnována největší pozornost.

Substrátem pro dihydrodiol dehydrogenasy (DD) z nadrodiny AKR jsou *trans*-dihydrodioly (vzniklé způsobem popsaným v kapitole Aktivace na diol epoxidy).

Působením DD na tyto dioly (viz obr. 7) dochází k jejich NADP⁺dependentní oxidaci a vzniká ketol, který se spontánně přeskupuje na katechol. Katechol je nestabilní a ve vzduchu podstupuje autooxidaci. První jednoelektronovou oxidací vzniká *o*-semichinonový anion radikál (SQ) a peroxid vodíku. Druhá jednoelektronová oxidace produkuje plně oxidovaný *o*-chinon a superoxidový anion radikál (O₂^{•-}) [2].



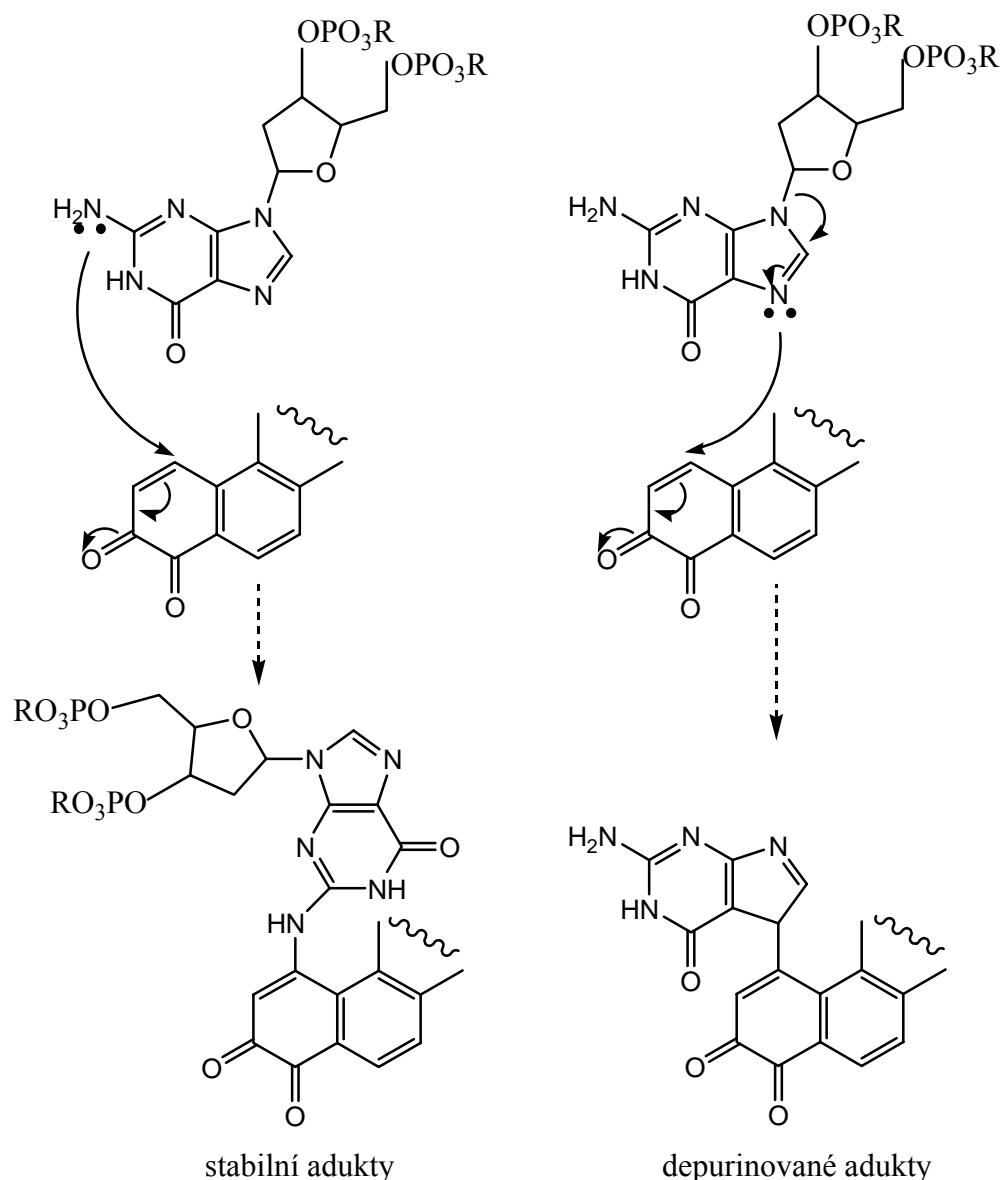
Obr. 7: Aktivace benzo[a]pyrenu na benzo[a]pyren-7,8-dion

Důsledky:

o-Chinony polycyklických aromatických uhlovodíků byly druhým převažujícím biotransformačním produktem odpovídajících *trans*-dihydrodiolů v neindukovaných potkaních játrech, jejichž subcelulární frakce byly obohaceny kofaktory, které optimalizují aktivitu různých enzymů soutěžících o tyto proximální karcingeny. Nejhojněji se vyskytujícím biotransformačním produktem byly tetraoly (prekurzory *anti*-diol epoxidů). Mimo to vznikají ještě minoritní množství sulfátových a glukuronidových konjugátů [2].

Výsledné *o*-chinony jsou vysoce reaktivní, cytotoxické a genotoxické. Neenzymaticky velice rychle reagují s buněčnými i nebuněčnými thioley. Všechny thiolové adukty vznikají 1,4-Michaelovou adicí. Meziproduktem je hydrochinonový konjugát, který autooxiduje. Během vzniku těchto ve vodě rozpustných konjugátů, což je předpokládaný detoxikační mechanismus, mohou stále vznikat reaktivní radikály (především superoxidový anion a radikál semichinonového konjugátu) [2].

o-Chinony jsou Michaelovy akceptory, které mohou tvořit jak stabilní tak depurinované DNA adukty (obr. 8), preferenčně 2-deoxyguanosinové adukty 1,4-Michaelovou adicí [3].

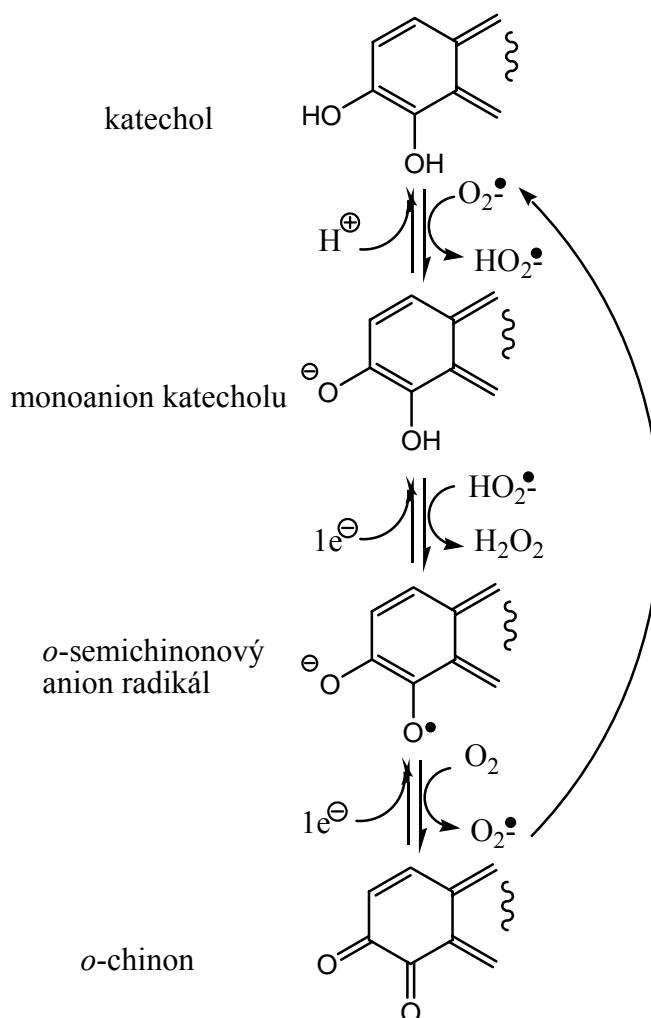


Obr. 8: Tvorba 2-deoxyguanosinových aduktů [3]

Tyto adukty, stejně jako ty odvozené od radikál kationtů, dávají vzniknout transverzi G na T pozorované v *ras* a *p53* [6]. *o*-Chinony mohou podstoupit buď dvouelektronovou neenzymatickou redukcí, čímž obnovují katechol, nebo jednoelektronovou enzymatickou redukcí a tvoří *o*-semichinonový anion radikál (SQ) [3]. Tím vzniká bludný redoxní cyklus, ve kterém je znásobována tvorba tzv. reactive oxygen species (ROS). ROS (reaktivní formy kyslíku) jsou volné radikály (molekuly nebo ionty obsahující nepárový elektron) nebo i látky, které nemají povahu volných radikálů (např. peroxid vodíku)¹. Volné radikály mohou vzniknout z neradikálových

¹ http://chemie.czechweb.cz/diplomky/bc/Tomas_Zeleny-BCP.pdf

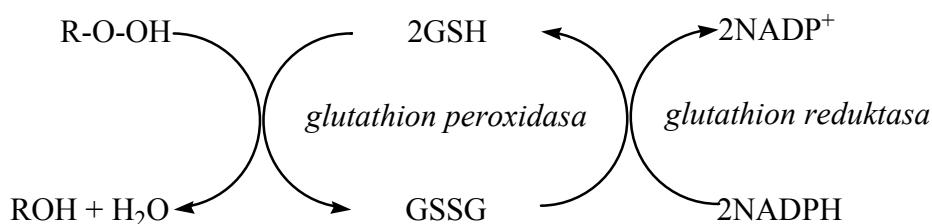
molekul při elektron-transportních reakcích, kdy dochází ke ztrátě nebo příjmu jednoho elektronu¹.



Obr. 9: Autooxidace katecholu [3]

Teoreticky stačí jediná molekula *trans*-dihydrodiolu polycyklického aromatického uhlovodíku konvertovaná touto biotransformační cestou (obr. 9), aby výsledný katechol procházel redoxním cyklem generujícím ROS, dokud se nevyčerpají buněčné redukční ekvivalenty[3],[7]. Peroxid vodíku je detoxikován působením systému GSH peroxidasa/reduktasa. Jak se vyčerpává GSH, zvyšuje se hladina GSSG. Ve snaze regenerovat GSH je spotřebováván NADPH (obr. 10). Nárůst buněčného GSSG a změny v redoxním stavu buňky (zvýšení poměru $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$) nakonec vedou k buněčné smrti [2].

¹ <http://www.recetox.muni.cz/sources/akvatox/Hudcovska.pdf>



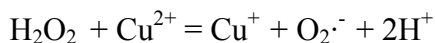
Obr. 10: Změny redoxního stavu zprostředkované působením PAH *o*-chinonů [3]

2.2.4 Důsledky vzniku ROS

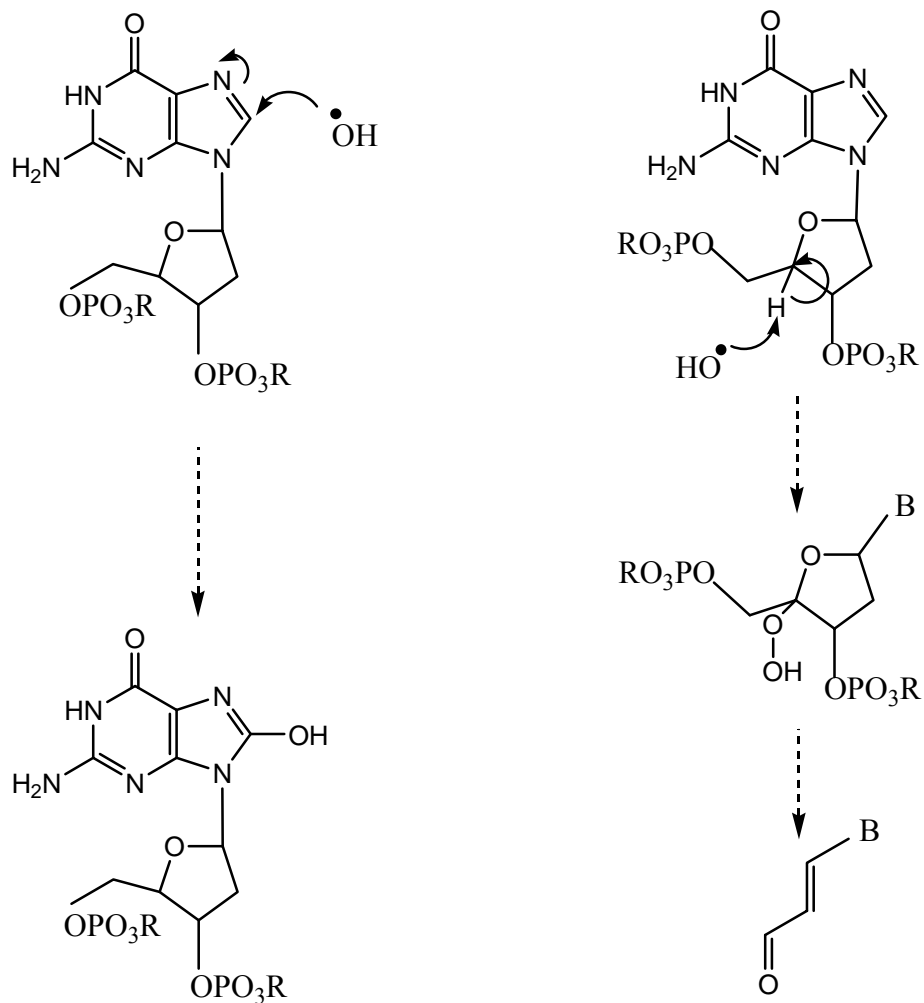
ROS působí karcinogenesi indukovanou zářením. Mohou způsobovat oxidativní poškození bazí, např. 8-hydroxy-deoxyguaninu. To vede k transverzi G na T a tím dává vzniknout další cestě k mutaci genů *ras* a *p53* [3].

ROS vede ke zvýšení lipidové peroxidace ω -6 polynenasycených mastných kyselin, kde jedním z hlavních produktů je HNE (4-hydroxy-2-nonenal), který atakuje nitrobuněčné cíle, čímž může působit cytotoxicky a genotoxicky. HNE-imunoreaktivní adukty byly detekovány v aterosklerotických placích, degenerovaných neuronech v substantia nigra ovlivněné Parkinsonovou nemocí a v neurofibrilárních spletech sdružených s Alzheimerovou nemocí [8]. Redukci HNE a dalších α,β -nenasycených aldehydů účinně katalyzují izoenzymy AKR1C, jejichž mRNA transkripce je působením HNE přímo indukována [8]. AKR1C tak chrání organismus před škodlivými účinky ROS, na druhé straně však působí při přeměně trans-dihydrodiolů polycyklických aromatických uhlovodíků na odpovídající *o*-chinony, čímž další ROS vznikají [4].

Pro štěpení DNA působením PAHů je také kritický redoxní cyklus mědi Cu(II)/Cu(I). V redoxním cyklu *o*-chinonů vzniklý H_2O_2 je oxidován měďnatými kationty na superoxidový anion radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Vzniklý mědný kation redukuje peroxid vodíku za vzniku hydroxylového radikálu ($\text{OH}\cdot$) [3].



Hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$) může způsobovat štěpení vláken DNA a nepřípustné rekombinace. Odebírá vodíkový atom z pozice C4 na 2-deoxyribose, což vyvolává sled dějů, jejichž výsledkem je rozštěpení fosfodiesterové vazby a uvolnění propenalbaze (obr. 11) [3].



hydroxylace v poloze 8' vedoucí k
chybnému párování bází a transverzi G na T

propenalbaze

Obr. 11: Modifikace DNA jako důsledek tvorby ROS, vzniklých působením redoxně aktivních *o*-chinonů [3]

Aby *o*-chinony PAHů mohly působit jako nukleasy je nezbytná přítomnost NADPH, Cu(II), Cu(I), H₂O₂ a hydroxylového radikálu (OH•), který je primárně odpovědný za fragmentaci DNA [6].

2.2.5 Shrnutí účinků

Ke karcinogenezi indukované působením PAHů přispívají jejich biotransformační produkty *anti*-diolepoxydy, radikál kationty a *o*-chinony [3]. Za nejtoxičtější se považují právě *anti*-diolepoxydy vzniklé z *trans*-dihydrodiolů působením CYP1A1. Ze známých metabolitů benzo[*a*]pyrenu je *anti*-BPDE nejvíce mutagenní a tumorigenní. Podobně je tomu u diolepoxydů vzniklých při biotransformační aktivaci ostatních bay-region PAHů včetně chrysenu, 5-metyl-chrysenu, 7,12-dimetylbenz[*a*]antracenu, 7-metyl-benz[*a*]ntracenu a nesubstituovaného benz[*a*]antracenu [2].

S enzymem CYP1A1 kompetují o výchozí substrát (*trans*-dihydrodioly PAHů) členové nadrodiny AKR, především z rodin AKR1C a AKR1A, kteří dávají vzniknout *o*-chinonům PAHů. Tak mohou tyto enzymy snižovat mutagenitu *anti*-diolepoxydů, přesto že tyto látky nejsou jejich substrátem [2].

o-Chinony PAHů podstupují Michaelovy adiční reakce s buněčnými nukleofily (L-cystein a GSH) a buněčnými makromolekulami (baze v DNA). Při vzniku vlastních chinonů i utváření těchto konjugátů, jsou generovány ROS. Ačkoli *o*-chinony jsou významně méně mutagenní než PAH *anti*-diolepoxydy, jsou silné chemické nukleasy. Tedy odklonění *trans*-dihydrodiolů na biotransformační cestu dihydrodiol dehydrogenas snižuje hladiny produkovaných mutagenních diolepoxydů, ale vytváří chinony, které zesilují stěpení vláken DNA [3].

2.3 Redukční enzymy

Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou konvertovány na hydrofilnější látky spolupůsobením cytochromu P450, epoxid hydrolasy (EH) a redukčních enzymů z nadrodiny aldo-keto reduktas (AKR). Tyto enzymy jsou ve tkáních exprimovány společně [1], což nasvědčuje tomu, že všechny tyto enzymy jsou důležité pro biotransformaci PAHů. Tato práce je zaměřená především na redukční enzymy z nadrodiny aldo-keto reduktas (AKR).

2.3.1 Aldo-keto reduktasy

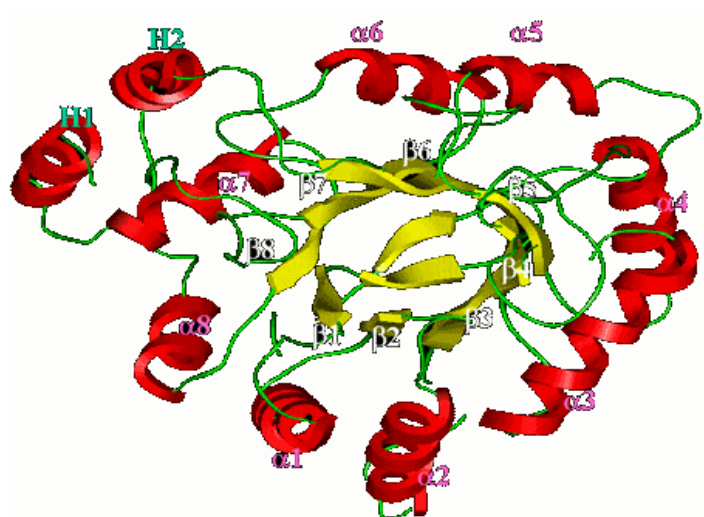
Na biotransformaci PAHů se podílí tato nadrodina redukčních enzymů největší měrou ze všech redukčních enzymů. Nadrodinu aldo-keto reduktas (AKR) tvoří 122 proteinů rozdělených podle procentuální aminokyselinové identity do 14 rodin, AKR1 – AKR14 (členové jedné AKR rodiny by měli mít < 40 % aminokyselinové totožnosti s ostatními rodinami). Rodiny jsou dále členěny na podrodiny (v dané rodině jsou podrodiny definovány > 60% totožností aminokyselinové sekvence)¹.

Největší rodinou je AKR1, podle substrátové specifity je rozdělena na aldehyd reduktasy (podrodina AKR1A), aldoso reduktasy (AKR1B), dihydrodiol/hydroxysteroid dehydrogenasy (AKR1C) a steroid reduktasy (AKR1D).

Struktura aldo-keto reduktas se vyznačuje charakteristickým uspořádáním α -helixů a β -skládaných listů do tzv. $(\alpha/\beta)_8$ -soudků (obr. 12).

AKR jsou většinou monomerní proteiny o velikosti 34kDa [3], čemuž odpovídá délka asi 320 aminokyselin. Výjimku tvoří rodiny AKR2, AKR6 a AKR7, jejichž členové mohou tvořit multimery. Dále je pro AKR typická NAD(P)H závislost, konservativní katalytická tetráda a variabilní klíčková struktura určující substrátovou specifitu [9].

¹ <http://www.med.upenn.edu/akr>



Obr. 12: (α/β)₈-soudek ve struktuře aldo-keto reduktas¹

Savčí aldo-keto reduktasy patří převážně k rodině AKR1, další savčí aldo-keto reduktasou je aflatoxin B1 reduktasa, která byla izolována z jater potkana. Protože tento enzym sdílí pouze 25% podobnost s rodinou AKR1, byl zařazen do samostatné rodiny AKR7. Zbytek savčích aldo-keto reduktas se řadí k β -podjednotkám, přidruženým ke K^+ kanálům, a tvoří rodinu AKR6 [10].

Z nadrodiny AKR se na biotransformaci PAHů podílejí především enzymy z rodin AKR1C (dihydrodiol dehydrogenasy) a AKR1A (aldehyd reduktasy), které dávají vzniknout *o*-chinonům polycyklických aromatických uhlovodíků, jak bylo uvedeno výše.

Dihydrodiol dehydrogenasy – AKR1C

Dihydrodiol dehydrogenasy (DD) se evolučně nevyvinuly k oxidaci xenobiotik včetně *trans*-dihydrodiolů PAHů. Členové podrodiny AKR1C přednostně oxidují endogenní substráty - hydroxysteroidy, žlučové kyseliny a hydroxyprostaglandiny. Často působí jako dvousměrné katalyzátory a vzájemně přeměňují karbonyly a sekundární alkoholy za využití NAD(P)H nebo NAD(P)⁺ jako kofaktorů. Produkcí alkoholů z řady aldehydů a ketonů zvyšují dostupnost biotransformovaných látek konjugačním reakcím [3]. Tyto enzymy mohou působit na endogenní substráty stejně dobře jako na exogenní (aromatické aldehydy, ketony a chinony), jejich substrátová specifita je široká.

¹ http://www.med.upenn.edu/akr/akr_graphic.html

Dihydrodiol dehydrogenasová aktivita může být sdružena s rozličnými enzymy (např. s karbonyl reduktasou, aldehyd reduktasou a 3 α - a 17 β –hydroxysteroid dehydrogenasou) v závislosti na druhu organismu, orgánu a tkáni, liší se také interindividuálně. Při průzkumu 23 vzorků lidských jater byla pozorována značná interindividuální variabilita. Specifická aktivita vůči benzendihydrodiolu se lišila až 60krát [2].

Biotransformace PAHů je regiospecifická, (upřednostňuje tvorbu non-K-region *trans*-dihydrodiolů) [2], ale není stereospecifická. Rodina AKR1C při oxidaci racemických *trans*-dihydrodiolů spotřebovala 100 % substrátu, což značí, že tato rodina enzymů má schopnost metabolizovat oba enantiomery [4]. Dihydrodiol dehydrogenasy katalyzují také redukci *o*-chinonů PAHů, avšak pouze K-region *o*-chinony mohou být redukovány na K-region *trans*-dihydrodioly. Non-K-region *o*-chinony jsou velmi špatným substrátem pro redukci působenou DD. Tyto enzymy však oxidují non-K-region *trans*-dihydrodioly na odpovídající non-K-region *o*-chinony, které mohou působit jako enzymaticky vytvořené inaktivátory DD [2].

Aldehyd reduktasy - AKR 1A

Aldehyd reduktasa AKR1A1, všeobecně rozšířený enzym, se také podílí na biotransformační aktivaci prokarcinogenních PAHů a má tak významnou roli v rozvoji jejich karcinogenity. Jedná se o konstitutivně exprimovaný a v největších množstvích zastoupený enzym z nadrodiny AKR v lidských tkáních. Fyziologicky je součástí metabolické cesty syntézy cholesterolu a triglyceridů. Enzym katalyzoval NADP⁺dependentní oxidaci mnoha non-K-region *trans*-dihydrodiolů a byl vysoce stereoselektivní. Přednostně oxidoval pouze 50 % racemických testovaných *trans*-dihydrodiolů. *trans*-Dihydrodioly PAHů s metylovanými non-bay-regiony byly oxidovány s vyšším utilizačním poměrem, ale sloučeniny s bay-region methylovou skupinou nebyly substrátem tohoto enzymu. Aldehyd reduktasa AKR1A1 může katalyzovat redukci široké škály aromatických a alifatických aldehydů se středním řetězcem na jejich odpovídající alkoholy [1].

2.4 Působení PAHů na enzymy

Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou substrátem mnohých biotransformačních enzymů. Parentní látky mohou ovlivňovat své biotransformační enzymy, a produkty jejich biotransformace mohou zpětně ovlivňovat enzymy, kterými byly vytvořeny. Toto ovlivnění může být ve smyslu jak inaktivace tak indukce.

2.4.1 Ovlivnění genové exprese

Na molekulární úrovni řada látek včetně PAHů a jejich endogenně vzniklých derivátů vykazuje svoje účinky na buňku a následně celý organismus ovlivněním genové exprese. Syntézu proteinů (a jelikož enzymy mají povahu bílkovin, lze říci syntézu enzymů) buňka reguluje na úrovni transkripce, sestřihu, translace a aktivace nebo inaktivace vzniklých proteinů. PAHy a jejich biotransformační produkty zasahují již do první úrovně regulace genové exprese – transkripce. Transkripce začíná v iniciačním místě promotoru genu navázáním RNA-polymerasy. Kromě promotoru mají téměř všechny geny ještě regulační sekvence, které řídí zapínání a vypínání genu. Tento efekt se může projevit jen v případě, že jsou rozpoznány regulačními proteiny. Každá regulační sekvence je rozpoznávána jedním nebo větším množstvím regulačních proteinů [5].

2.4.2 Specifické DNA sekvence - RE (response elements)

V oblasti promotoru genu se nacházejí specifické DNA sekvence zvané RE (response elements). XRE (xenobiotic response element) je specifická nukleotidová sekvence pro transkripční faktor AhR (arylhydrocarbon receptor), ARE/EpRE (antioxidant/electrophile response element) je specifická nukleotidová sekvence pro další transkripční faktory, především Nrf2 (nuclear factor-E2 p45-related factor 2).

AhR je sdružený se dvěma molekulami hsp90 (heat shock protein 90). Hsp90 je odpovědný za rozpoznání exogenních látek znečišťujících životní prostředí nebo léčiv, které se na AhR váží jako ligand. K vazbě ligandu dochází v cytoplazmě. Vzniklý komplex vstupuje do jádra, kde tvoří homodimer nebo heterodimer s jinými proteiny. Dimer se váže na odpovídající XRE¹.

¹ <http://www.jsbi.org/journal/GIW05/GIW05P165.pdf>

ARE/EpRE se objevuje v 5'-koncové oblasti mnoha genů kódujících proteiny, které se podílejí na obraně proti xenobiotikům, jedná se především o antioxidační enzymy a enzymy druhé fáze detoxikace. Syntéza těchto enzymů je indukována především v buňkách vystavených působení elektrofilních sloučenin. Hlavním proteinem interagujícím s ARE/EpRE je transkripční faktor Nrf2, který aktivuje genovou transkripci konstitutivně nebo jako odpověď na signály oxidačního stresu. Aktivuje se celá skupina obranných genů (mezi nimi *p53*), které chrání buňku proti oxidačnímu stresu^{1,2}.

Vazba transkripčních faktorů na RE vyžaduje ještě přítomnost kofaktorů (korepresorů nebo koaktivátorů). Až po kompletním vzniku transkripčního iniciačního komplexu je zahájena transkripce, tedy syntéza mRNA. mRNA je předlohou pro syntézu bílkovin, jimiž jsou také enzymy biotransformující vstupující látky. Povahu bílkovin mají také systémy transportující vstupující látky a produkty jejich biotransformace³.

2.4.3 Indukce zprostředkovaná ARE/EpRE a XRE

Indukce enzymů nadrodiny AKR působením PAHů a dalších bifunkčních induktorů je zprostředkována přes ARE/EpRE spíše než přes XRE. Tuto hypotézu potvrzuje skutečnost, že AKR mRNA nebyla indukována působením TCDD (2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin). TCDD, nejúčinnější známý ligand receptoru AhR, ale způsoboval indukci XRE-obsahující genů jako například genů pro CYP [7]. Indukce AKR mRNA polycyklickými aromatickými uhlovodíky byla vzhledem k indukci CYP mRNA opožděna. Časová prodleva v indukci odpovídá nutnosti transformace induktorů na elektrofilní látky, dříve než mohou indukci způsobit [3].

Klasické bifunkční induktory zvyšují expresi CYP cestou XRE. Enzymem, jehož indukci tak způsobily, jsou transformovány na elektrofilny, které indukují enzymy druhé fáze detoxikace cestou ARE/EpRE [11].

¹ <http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140229>

² <http://www.bcm.edu/pharmacology/ja-a.htm>

³ <http://www.jsbi.org/journal/GIW05/GIW05P165.pdf>

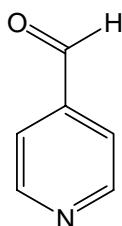
Také PAHy patří do skupiny bifunkčních induktorů, ale představují jejich novou třídu. Parentní PAHy se váží přímo na receptor AhR. Tímto mechanismem PAHy indukují geny obsahující XRE (geny CYP). Indukovanými geny dochází v první fázi detoxikace k prvnímu stupni biotransformace na elektrofilny (*trans*-dihydrodioly). Tyto látky následně cestou XRE indukují enzymy, kterými byly vytvořeny, a cestou ARE/EpRE indukují AKR izoenzymy, kterými budou ve druhém stupni první fáze detoxikace dále transformovány na *o*-chinony [11].

Indukce enzymů je součástí efektivní odpovědi na stres vyvolaný xenobiotiky a změnami redoxního stavu buňky. AKR1C mRNA může být indukována až desetkrát působením bifunkčních induktorů (PAHy), monofunkčních induktorů (fenolické antioxidanty) a ROS (reactive oxygen species) [7]. Enzym AKR1C1 je exprimován v relativně vysokých hladinách v mnohých tkáních spojených s metabolismem xenobiotik či oxidativním stresem, jako například v plicích, játrech a prsní žláze [8]. Zvýšené množství AKR1C1 mRNA transkriptu je přítomno například v lidských buňkách hepatomu (HepG2) i v buňkách karcinomu tlustého střeva (HT29) [7]. Indukce mRNA je tak jedním z mechanismů, jimiž polycyklické aromatické uhlovodíky vykazují své škodlivé účinky.

2.5 Metabolismus substrátů použitých v této práci

V této práci byl jako relativně specifický substrát redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů použit 4-pyridinkarboxaldehyd a 1-acenaftenol.

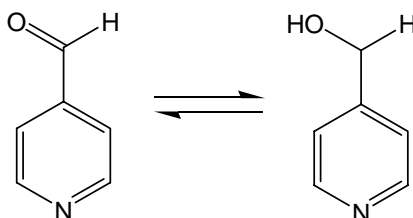
2.5.1 4-Pyridinkarboxaldehyd



Obr. 13: 4-Pyridinkarboxaldehyd

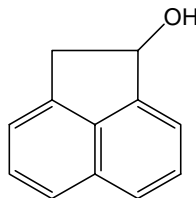
Pro označení této látky s molekulovou hmotností 107,11 g/mol se používají i synonyma, například isonikotinaldehyd, p-pyridinaldehyd, 4-pyridinaldehyd, pyridin-4-karbaldehyd, 4-formylpyridin¹.

V cytosolické frakci lidských jater je 4-pyridinkarboxaldehyd redukován na 4-pyridinkarbinol aldehydreduktasou (AKR1A1), v mikrosomální pak 3 α -HSD [10].



Obr. 14: Biotransformace 4-pyridinkarboxaldehydu v cytosolické frakci lidských jater

2.5.2 1-Acenaftenol



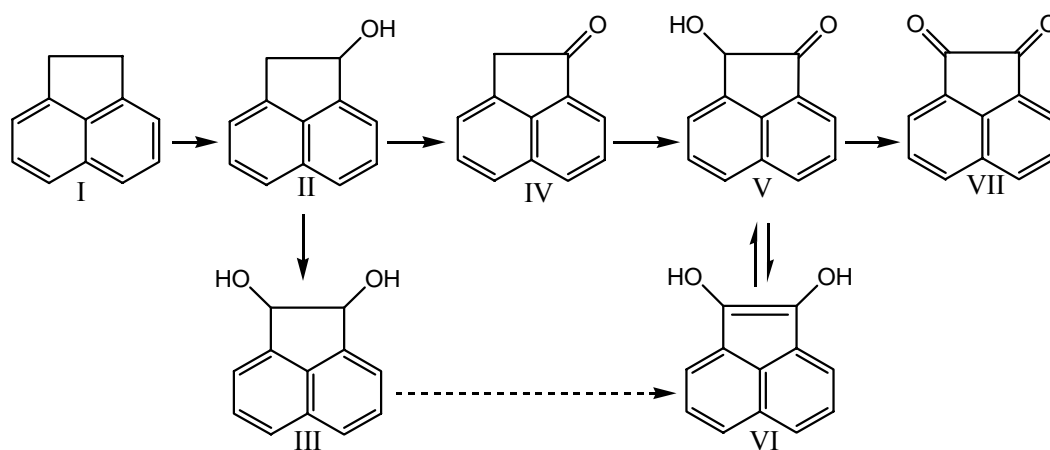
Obr. 15: 1-Acenaftenol²

¹ <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=74566>

² <http://www.sciencedirect.com/science>

Pro označení této látky s molekulovou hmotností 170,207 g/mol se používají i synonymní názvy, například 7-acenaftenol, acenaften-1-ol, 1-hydroxyacenaften, 1,2-dihydro-1-acenaftylenol¹.

Oxidace 1-acenaftenolu u *Beijerinckia sp.* (půdní bakterie vážící atmosférický dusík)² probíhala v prostředí K₂HPO₄ pufru, při pH 7,5, v přítomnosti NAD⁺ nebo NADP⁺, jak ukazuje obrázek 16. Dehydrogenasová aktivita byla stanovena redukcí NAD⁺ nebo NADP⁺, monitorována byla spektrofotometricky měřením rychlosti nárůstu absorbance při 340 nm. Identifikovanými metabolity byl 1-acenaftenon, 1,2-acenaftendiol, acenaftenchinon a 1,2-dihydroxyacenaftylen.



Obr. 16: Předpokládaná biotransformace acenaftenu u *Beijerinckia sp.*: I, acenaften; II, 1-acenaftenol; III, acenaftendiol; IV, 1-acenaftenon; V, 1-hydroxy-2-ketoacenaften; VI, 1,2-dihydroxyacenaftylen; VII, acenaftenchinon³

¹ <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=22750#Properties>

² http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822000000300004&script=sci_arttext&tlng=en

³ <http://www.pubmedcentral.gov/picrender.fcgi?tool=pmcentrez&blobtype=pdf&artid=240288>

3. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo stanovení modulační aktivity cytosolických reduktas z nadrodiny AKR v hepatocytech potkana (*Rattus norvegicus var. alba*) vybranými polycyklickými aromatickými uhlovodíky. Ke zjištění vlivu těchto PAHů (benzo[*a*]pyren, benzo[*b*]fluoranten) bylo nutné:

- stanovit aktivitu AKR1C9 v cytosolické frakci hepatocytů laboratorních potkanů kontrolních i ovlivněných vybranými PAHy vůči relativně specifickým substrátům
- izolovat RNA z kontrolních a ovlivněných hepatocytů a kvantifikovat m-RNA pro AKR1C9

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 *Biologický materiál*

Primární kultury hepatocytů samců potkana (*Rattus norvegicus var. alba*).

4.1.2 *Chemikálie*

EGTA - Sigma, ČR

Albumin - Sigma, ČR

Kolagenasa - Sevapharma a.s., ČR

WILIAMS - Sigma, ČR

HAM F12 - Sigma, ČR

Penicilin - Sigma, ČR

Streptomycin - Sigma, ČR

Insulin - Sigma, ČR

Fetální hovězí sérum (FBS) - Sigma, ČR

Pneumoxid (tlaková láhev) – Linde, ČR

Trypanová modř - Sigma, ČR

Benzo[*a*]pyren - Sigma, ČR

Benzo[*b*]fluoranten – Aldrich, ČR

MTT - Sigma, ČR

Set pro stanovení bílkovin s BCA - Sigma, ČR

NADPH - Sigma, ČR

NADP⁺ - Sigma, ČR

1-Acenaftenol – Aldrich, ČR

4-Pyridinkarboxaldehyd – Aldrich, ČR

Trishydroxymethylaminomethan – Lachema, ČR

Oracin - VÚFB Praha

Hexansulfonan sodný – Fluka Chemie, Německo

Triethylamin - Fluka Chemie, Německo

Acetonitril Chromasolv for HPLC Gradient Grade – Aldrich, ČR

Amoniak 25 % - Lachema, ČR

14,3 M β -merkptoethanol (β -ME) - Sigma, ČR

RNeasy® Mini Kit - Qiagen, Německo

QuantiTect Probe RT-PCR® Kit - Qiagen, Německo

Další chemikálie čistoty p.a. - Penta, ČR; Lachema, ČR:

NaHCO₃, Na₂CO₃, CaCl₂, 4M HCl, isopropanol, Na₂HPO₄ · 12H₂O,

NaH₂PO₄ · 2H₂O, Na₂HPO₄ · 12H₂O, NaH₂PO₄ · 2H₂O, NaOH, CuSO₄ · 5H₂O,

dimethylsulfoxid, KH₂PO₄, K₂HPO₄, 0,1M HCl, H₃PO₄, destilovaný octan

ethylnatý, ethanol 96-100%

4.1.3 Připravované roztoky

Zásobní roztok solí (NaCl, KCl, MgSO₄ · 7H₂O)

Roztok NaHCO₃ (1 M)

Roztok CaCl₂ (8 g/100ml)

Roztok albuminu (1,0 g/100ml)

Roztok kolagenasy s vápníkem (30 mg/100ml)

Živné medium ISOM: Roztok WILIAMS a roztok HAM F12 v poměru 1:1

Roztok HAM F12 s NaHCO₃, obohacený penicilinem a streptomycinem

Roztok WILIAMS s NaHCO₃, obohacený penicilinem a streptomycinem

Živné medium ISOM s insulinem (29 mg/l)

Živné medium ISOM s fetálním hovězím sérem (FBS) (10 ml/l)

Zásobní roztok benzo[*a*]pyrenu v dimethylsulfoxidu (5 mM)

Zásobní roztok benzo[*b*]fluorantenu v dimethylsulfoxidu (10 mM)

Roztok MTT (3mg/1ml fosfátového pufru 0,1 M; pH 7,4)

Roztok 0,08 M HCl v isopropanolu

Fosfátový pufr 0,1 M; pH 7,4

TRIS pufr 0,1 M; pH 8,9

Draselno-fosfátový pufr 0,1 M; pH 6,0

Hexansulfonanový pufr 10 mM

Zásobní roztok oracinu (1 mM)

Zásobní roztok NADPH (6 mM)

Roztok triethylaminu 0,1M (7,1 ml/l)

4.1.4 Pomůcky a přístroje

Pomůcky

Laboratorní sklo (kádinky, Erlenmayerovy a odměrné baňky, odměrný válec, skleněná miska, pipety, odsávací baňky, lahvičky), Büchnerova nálevka, Bürkerova komůrka, Petriho misky, kyvety pro spektrofotometrické stanovení, centrifugační kyvety, stojánek na kyvety, stojánek na mikrozkuřavky, mikrozkuřavky, automatické pipety, multikanálové pipety, pipetovací špičky, mikrotitrační destička, stopky, nádoba na led, ledový blok, hadičky, špachtle, magnetické míchadlo, inserty, váženky, laboratorní lžička, navařovací kopist, stopky, buničina, nůžky, parafilm, rukavice, lihový fix a další.

Přístroje

Laboratorní magnetická míchačka IKA Color Squid Hytrel HTR 8068

Vodní lázeň Memmert

Centrifuga Eppendorf 5810R

Centrifuga Eppendorf 5415D

Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos

Ultracentrifuga Sorvall OTD Combi – rotor TST 60.4

Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex

Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls Bandelin HD 2070

Čtečka absorbance Biorad Microplate Reader 550

UV-VIS spektrofotometr Unicam Helios

Laminární box BioAir AURA 2000 M.A.C.

Digitální pH-metr Jenway LTD 3020

Mikroskop Nikon Eclipse TS 100 s počítačem

CO₂ inkubátor HeraCell, Heraeus

Inkubátor Eppendorf Thermomixer Comfort

Třepačka IKA MS2 Minishaker

Koncentrátor Eppendorf Concentrator 5301

LightCycler - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo

Analytické váhy Scaltec SBC 22

Předvážky Kern KB

Freezer Heraeus – Herafreeze

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf – Agilent 1100 Series

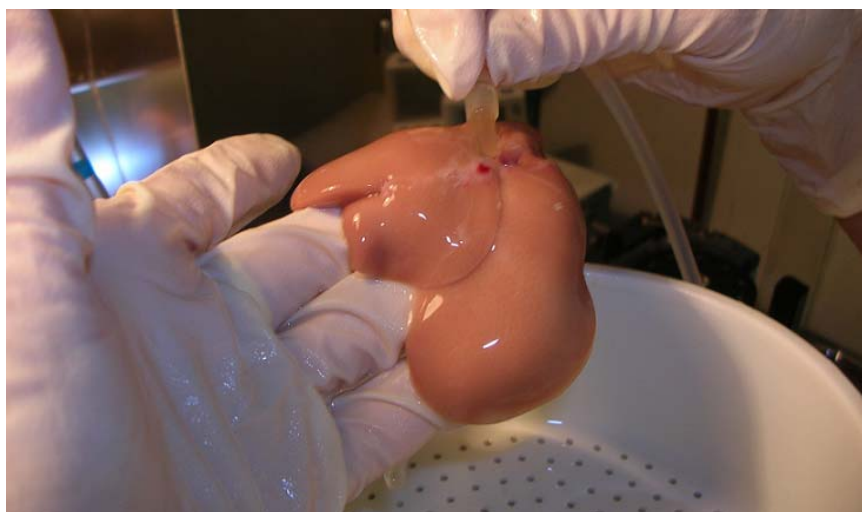
4.2 Pracovní postup

4.2.1 *Izolace hepatocytů*

Celá nepoškozená játra bezprostředně po jejich získání byla přenesena do Büchnerovy nálevky umístěné nad odpadní nádobou.

Následná perfúze jater byla prováděna postupnou a opakovanou kanylací všech cév vstupujících do jater. Nejdříve byla játra promývána perfúzním roztokem bez vápníku (teplota 37 °C) vzdušněným pneumoxidem bez recirkulace až do jejich odkrvení, tzn. po dobu 5-10 minut.

Následně byla játra promývána médiem s kolagenasou a vápníkem (teplota 37 °C), roztok recirkuloval játry po dobu 5-7 minut, až byla jaterní tkáň dostatečně natrávená působením kolagenasy.



Obr. 17: Promývání jater médiem s kolagenasou a vápníkem

Do skleněné misky umístěné v ledové lázni byla přendána játra a přidán roztok B_v. Pomocí pinzety se do media vyklepaly jednotlivé hepatocyty, tato směs hepatocytů a zbytků jaterní tkáně se zfiltrovala přes nylonové sítko. Získaná suspenze se v předem vychlazených centrifugačních kyvetách (50 ml) centrifugovala za chlazení (4 °C) na centrifuze Eppendorf při 40 g po dobu 5 minut.



Obr. 18: Peleta hepatocytů v kyvetách po centrifugaci na centrifuze Eppendorf

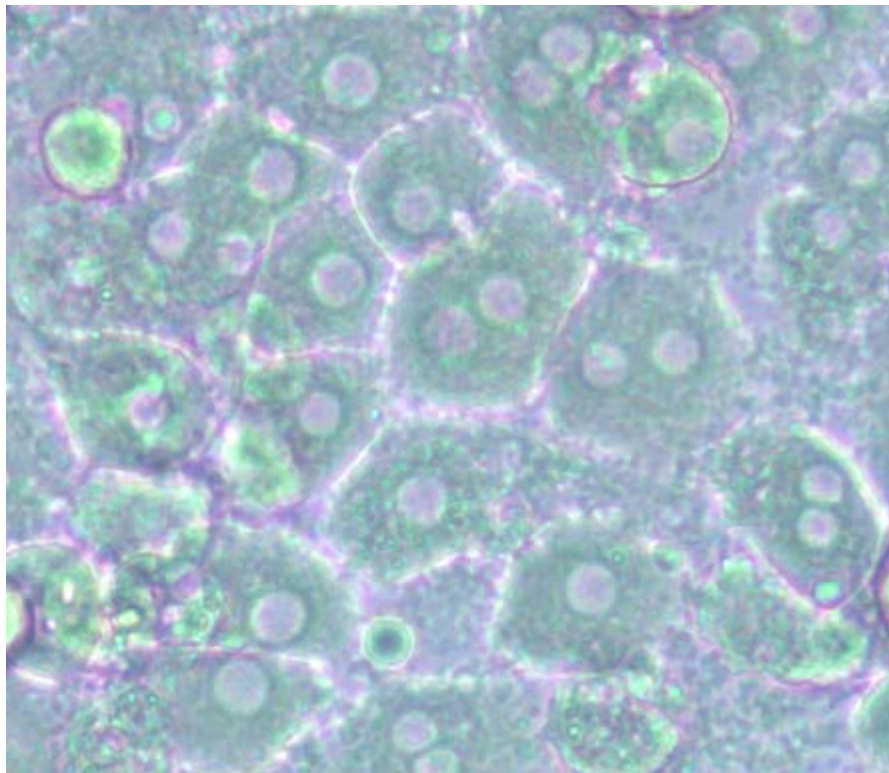
Po odsání supernatantu se peleta resuspendovala repipetací ve vychlazeném roztoku C a opět centrifugovala za stejných podmínek. Tento postup byl opakován ještě jednou, ale v laminárním boxu. Tím byly hepatocyty přeneseny do sterilního media C.

V laminárním boxu byl supernatant opět odsán, peleta resuspendována repipetací ve vychlazeném živném mediu ISOM a naposledy centrifugována za stejných podmínek, ale ve sterilních vychlazených kyvetách.

V laminárním boxu byl supernatant opět odsán, peleta resuspendována repipetací ve vychlazeném živném mediu ISOM a suspenze přenesena z kyvet do kádinky. Dle konečného objemu suspenze jsme přidali fetální hovězí sérum, aby jeho výsledná koncentrace odpovídala 10 ml/l.

Ze suspenze v kádince se odebral vzorek 30 μ l do mikrozkušavky a přidalo k němu 30 μ l 0,4% roztoku trypanové modři, repipetací promíchalo. Směs byla nanesena do Bürkerovy komůrky a zjištěna koncentrace hepatocytů v suspenzi a jejich životnost. P-glykoprotein živých buněk zabrání pronikání modře do buňky, tedy živé buňky zůstanou neobarvené. Živé a mrtvé buňky byly počítány na mikroskopu s počítačem.

Suspenze hepatocytů byla naředěna na koncentraci $0,8-1 \cdot 10^6$ hepatocytů/ml pomocí živného media ISOM + FBS (bez insulinu) a tato konečná suspenze byla nanášena na Petriho misky (3 ml/miska).



Obr. 19: Monovrstva hepatocytů uchycených na dně Petriho misky

Hepatocyty se nechaly uchytit ke dnu misek při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v CO_2 inkubátoru 3-4 h a potom bylo medium vyměněno za čerstvé, medium s insulinem, bez FBS, s obsahem testovaných látek, nebo bez nich v případě kontrolních vzorků.

Testovanými látkami byly: benzo[*a*]pyren a benzo[*b*]fluoranten, každá látka v koncentracích $0,2\text{ }\mu\text{M}$; $1,0\text{ }\mu\text{M}$; $5,0\text{ }\mu\text{M}$. Hepatocyty byly s testovanými látkami inkubovány po dobu 24 h při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v CO_2 inkubátoru ($5\text{ }\%$ CO_2).

4.2.2 Test cytotoxicity – MTT

Suspenze izolovaných hepatocytů (o hustotě cca $1 \cdot 10^6$ buněk/ml) se nanasla pomocí multikanálové pipety na mikrotitrační destičku s plochým dnem (50 μ l/jamka). Nanášenou suspenzí se muselo neustále míchat.

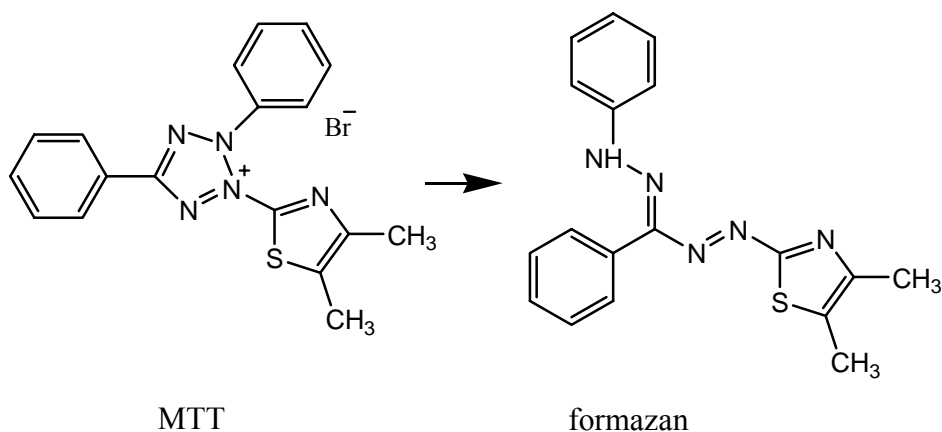
4h inkubací při 37 °C v CO₂ inkubátoru (5 % CO₂) se hepatocyty nechaly uchytit ke dnu jamek. Poté bylo medium slito a nanaseny roztoky testovaných substancí v daných koncentracích v živném mediu s inzulinem (100 μ l/jamka).

Slepý vzorek – k hepatocytům se pipetovalo pouze čisté živné medium s inzulinem.

Kontrola – k hepatocytům se pipetovalo živné medium s inzulinem a příslušným množstvím rozpouštědla (dimethylsulfoxid), které bylo použito při přípravě zásobních roztoků testovaných substancí.

Hepatocyty byly s testovanými látkami v daných koncentracích inkubovány po dobu 24 h při teplotě 37 °C v CO₂ inkubátoru (5 % CO₂), (stejně podmínky a doba jako ve vlastním experimentu).

Po skončení inkubace byl proveden vlastní MTT test. Jeho principem je přeměna žlutého, ve vodě rozpustného substrátu 3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid (MTT) působením mitochondriální dehydrogenasy živých buněk na fialový, ve vodě nerozpustný produkt formazan (obr. 20).



Obr. 20: Schematické znázornění metabolizace MTT na formazan živými buňkami¹

¹ <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1465007a.pdf>

Po skončení 24h inkubace se pipetoval (pomocí multikanálové pipety) k médiu nad hepatocyty ve všech jamkách (včetně kontroly, s výjimkou slepých vzorků) na 37 °C předeřtý roztok MTT (25 µl/jamka).

Hepatocyty s MTT byly inkubovány 1h při teplotě 37 °C v CO₂ inkubátoru (5 % CO₂). Po ukončení inkubace bylo medium slito a napipetován HCl-isopropanol (50 µl/jamka) včetně slepých vzorků, opatrným mícháním buňky lyzovaly a rozpustil se vzniklý fialový formazan.

Na čtečce Biorad (filtr číslo 4) se měřila absorbance při 595 nm proti slepým vzorkům. Životnost hepatocytů inkubovaných s testovanými substancemi byla vyjádřena jako % absorbance, kdy absorbance kontroly představuje 100%.

4.2.3 Příprava subcelulárních frakcí

Po ukončení inkubace hepatocytů v médiu s insulinem, bez FBS, s obsahem testovaných látek, (nebo bez nich v případě kontrolních vzorků) se z inkubátoru vyndaly 4 misky s příslušným PAHem a příslušnou koncentrací. Po odsátí živného média se misky ihned pokládaly na ledový blok. Na každou misku stále umístěnou na ledovém bloku se napipetovalo 0,5 ml chlazeného 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4.

Špachtličkou byly seškrabány hepatocyty z misky, suspenze se přenesla špičkou vždy ze dvou misek do jedné chlazené mikrozkuhavky, tj. ze 4 misek do 2 mikrozkuhovek jeden PAH. Takto se postupně zpracovaly všechny misky s kontrolními hepatocyty i s hepatocyty inkubovanými s testovanými látkami.

Mikrozkuhavky byly umístěny ve stojánku v ledové lázni a přeneseny do chladicího boxu, kde se obsah každé mikrozkuhavky sonikoval 30 s. Následovala centrifugace na centrifuze Heraeus po dobu 20 minut při 5000 g a 4 °C.

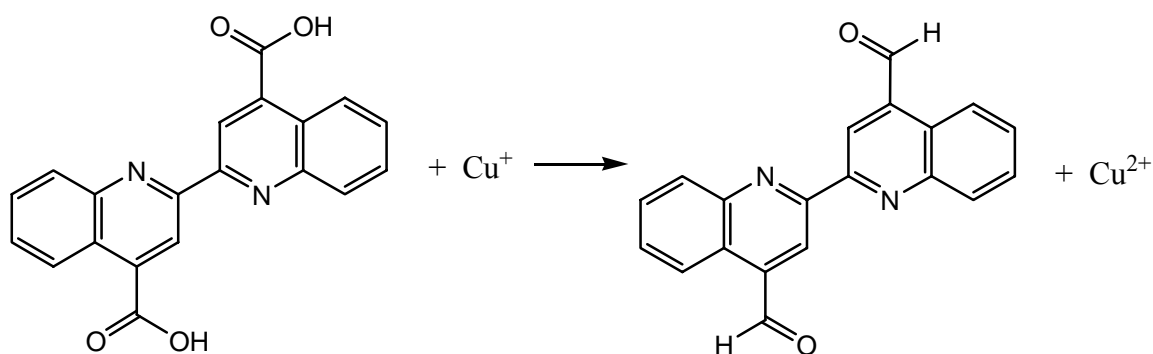
Po této centrifugaci se opět v chladícím boxu supernatant z mikrozkuhovek odpipetoval do kyvet pro centrifugu Sorvall – každý PAH dané koncentrace do jedné zkuhavky. Následovala centrifugace na centrifuze Sorvall po dobu 1 h 07 minut při 105000 g a 2 °C.

Supernatant (cytosol) byl rozpipetován do mikrozkuhovek a zmražen, uchován v hlubokomrazícím boxu při -80 °C.

Peleta - mikrosomy z poslední centrifugace byly resuspendovány sonikací v 0,5 ml 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,4 s 20 % glycerolu a dále využity pro jiné výzkumné účely.

4.2.4 Stanovení koncentrace bílkoviny metodou redukce BCA

Principem této metody je reakce proteinů s Cu^{2+} v alkalickém prostředí. Měď přechází na Cu^+ kationty, které v prostředí pH kolem 10 redukují BCA (bicinchoninic acid) za vzniku stabilního modrofialového komplexu s BCA (obr. 21). Intenzita zabarvení je přímo úměrná množství bílkoviny [10].



Obr. 21: Schematické znázornění redukce BCA měďnými ionty [10]

Roztok A: NaHCO_3 , Na_2CO_3 , BCA v 0,1 M NaOH

Roztok B: 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Roztok C: Vznikne smícháním roztoků A a B v čas potřeby v poměru 50:1

Stanovila se kalibrační křivka, pomocí které se dále určovala koncentrace bílkoviny. Jako standard se užil 1% roztok BSA (hovězí sérový albumin).

Tab. 1: Příprava šesti koncentrací BSA pro stanovení kalibrační přímky

	Koncentrace bílkoviny [$\mu\text{g/ml}$]	Roztok 1% BSA [μl]	Redestilovaná voda [μl]
1	0	0	100
2	200	20	80
3	400	40	60
4	600	60	40
5	800	80	20
6	1000	100	0

Cytosol se naředil 20krát redestilovanou vodou, udělala se takto dvě ředění a z každého ředění se odebraly 4 vzorky (= 2krát 4 paralelní měření pro jeden cytosol). Do mikrotitrační destičky se napipetovalo 10 μl vzorku bílkoviny a 200 μl pracovního roztoku C (pomocí multikanálové pipety). Napipetoval se též slepý vzorek, ve kterém místo bílkoviny bylo 10 μl redestilované vody.

Mikrotitrační destička se dobře protřepala a nechala se inkubovat 30 minut při 37 °C. Po inkubaci se na čtečce Biorad (filtr číslo 3) měřila absorbance při 562 nm proti destilované vodě.

4.2.5 Spektrofotometrické stanovení aktivit reduktas

Aktivita redukčních enzymů byla měřena jako pokles absorbance způsobený přeměnou kofaktoru NADPH na NADP^+ (nebo jako vzestup absorbance způsobený přeměnou kofaktoru NADP^+ na NADPH) ve vzorku za laboratorní teploty (25 °C) při 340 nm. Pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu $\text{NADPH/NADP}^+ \epsilon = 6270 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ lze kvantitativně vyjádřit aktivitu reduktas [15].

Roztok NADPH ($M_r = 833,4 \text{ g/mol}$) v redestilované vodě a roztok NADP^+ ($M_r = 787,4 \text{ g/mol}$) v redestilované vodě byly společně se vzorky cytosolu uchovávány v průběhu měření v ledové lázni. Z důvodu nižší stability bylo nutno roztoky připravovat 2krát denně čerstvé.

Teplota pufrů vytvářejících reakční prostředí byla 37 °C.

Substrát acenaftenol ($M_r = 170,2 \text{ g/mol}$) byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu, 4-pyridinkarboxaldehyd ($M_r = 151,1 \text{ g/mol}$; $\rho = 1,122 \text{ g/cm}^3$) byl rozpuštěný v redestilované vodě.

Pro měření oxidace acenaftenolu byla v kyvetě následující reakční směs:

- 890 μl TRIS pufru (0,1 M; pH 8,9)
- 10 μl substrátu o koncentraci 0,1 M
- 10 μl NADP⁺ o koncentraci 100 mM
- 90 μl měřeného vzorku cytosolu (enzym)

Po přidání pufru, substrátu a NADP⁺ byla kyveta uzavřena parafilmem a obsah byl dobře promíchán. Poté byla vložena do spektrofotometru a přístroj byl vynulován (slepý vzorek). Reakce byla zahájena přidáním enzymu. Zaznamenávaly se hodnoty absorbance v čase 0 minut a 6 minut.

Pro měření redukce 4-pyridinkarboxaldehydu byla v kyvetě následující reakční směs:

- 960 μl draselno-fosfátového pufru (0,1 M; pH 6,0)
- 10 μl substrátu o koncentraci 0,1 M
- 10 μl NADPH o koncentraci 10 mM
- 20 μl měřeného vzorku cytosolu (enzym)

Po přidání pufru, substrátu a NADPH byla kyveta uzavřena parafilmem a obsah byl dobře promíchán. Poté byla vložena do spektrofotometru a přístroj byl vynulován (slepý vzorek). Reakce byla zahájena přidáním enzymu. Zaznamenávaly se hodnoty absorbance v čase 0 minut a 4 minuty.

Enzymová aktivita [$\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$] byla spočítána pomocí Lambert-Beerova zákona:

$$\Delta c = \Delta Abs / \epsilon d$$

Δc přírůstek koncentrace NADP^+ nebo NADPH [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]

ΔAbs změna absorbance

ϵ molární absorpční koeficient [$\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]

d délka optické dráhy [cm]

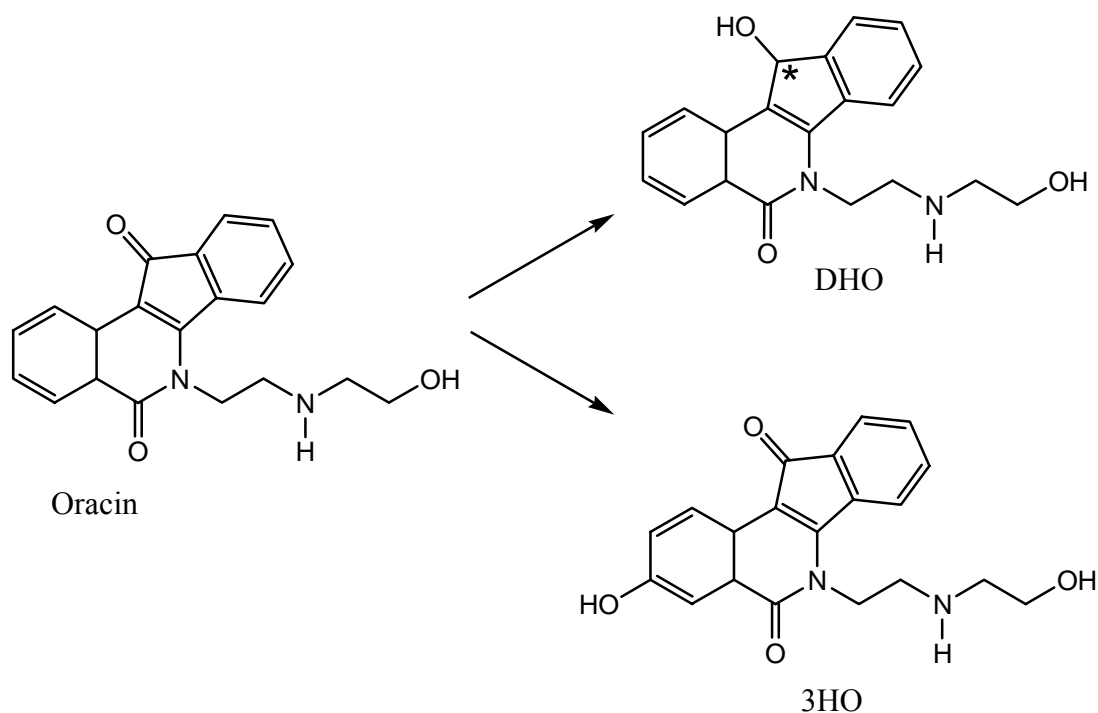
Hodnota Δc byla přepočítána na objem inkubační směsi a 1 minutu (vzniklé látkové množství za 1 minutu).

Specifická aktivita se získala vztažením enzymové aktivity na mg proteinu [$\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$].

4.2.6 Inkubace cytosolu z hepatocytů s oracinem

Oracin je potenciální cytostatikum pro orální užití. Hlavním produktem jeho biotransformace je 3-hydroxyoracin (3HO) a 11-dihydrooracin (DHO).

DHO je chirální metabolit tvořený redukcí pro-chirální karbonylové skupiny na pozici C11 molekuly oracinu, je stereospecificky tvořen jak v mikrosomálních tak cytosolických frakcích buněk. Tuto biotransformaci působí především 11β -HSD1, ale i další enzym, protože v celých mikrosomech vzniká větší množství (+)-DHO než působením čistého enzymu[12].



Obr. 22: Biotransformace oracinu na DHO a 3HO

Inkubační směs o celkovém objemu 0,3 ml obsahovala 0,33 mM oracin (100 μ l zásobního 1 mM roztoku oracinu), 1 mM NADPH (50 μ l zásobního 6 mM roztoku NADPH), 150 μ l cytosolu o známém obsahu proteinů.

Do mikrozkušavek se napipetoval roztok oracinu a NADPH, nechal se preinkubovat při 37 °C po dobu asi 5 minut. Inkubace se zahájila přidáním 150 μ l cytosolu (v případě slepého vzorku 0,1 M fosfátového pufru pH 7,4) a protřepáním. Inkubace při 37 °C se skončila po 60 minutách ochlazením inkubační směsi na 0 °C v ledové lázni, přidáním 30 μ l koncentrovaného amoniaku a promícháním. Po přidání 0,9 ml destilovaného octanu ethylnatého se mikrozkušavky intenzivně třepaly na třepačce 2 minuty. Mikrozkušavky se zcentrifugovaly (5000 otáček, 3 minuty). Pipetou se přeneslo 0,8 ml horní organické vrstvy s extrahovanými metabolity do připravené vialky. Extrakt se odpařil v koncentrátoru (45 °C) do sucha. Vzorky byly uchovány v chladu a temnu a dále podrobeny HPLC analýze.

4.2.7 HPLC analýza produktů biotransformace oracinu

HPLC analýza produktů biotransformace oracinu byla provedena na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu Agilent 1100 Series, na chromatografické koloně typu BDH Hypersil C18 o rozměrech 250 x 4 mm. Mobilní fáze vznikla smísením acetonitrilu a hexansulfonanového pufru v poměru 1:3. Hodnota pH 10 mM hexansulfonanového pufru s obsahem 0,1 M triethylaminu byla upravena kyselinou fosforečnou na 3,27 (při teplotě 25 °C).

Analýza byla provedena při teplotě 25 °C, pod tlakem 200 bar, mobilní fáze protékala rychlostí 1,5 ml/min.

Předem připravené odparky látek (viz kapitola 4.2.6) se rozpustily v 250 µl mobilní fáze, k nástřiku na chromatografickou kolonu se použilo 100 µl toho roztoku. Detekce byla provedena pomocí fluorescenčního detektoru Agilent 1100 Series a záznam píků vyhodnocen chromatografickým softwarem Agilent ChemStation for LC/MS Systems.

4.2.8 Izolace celkové RNA z izolovaných hepatocytů

Princip: po lýze buněk pomocí detergentů (guanidiniové soli) a homogenizace lyzátů následuje izolace založená na selektivním navázání RNA na silikagelovou membránu kolony, postupném promývání specifickými pufrů a finální eluci přečištěné RNA vodou. Vazebná kapacita použité kolony je 100 µg RNA, zachyceny jsou molekuly delší než 200 bází.

Množství počátečního materiálu nesmí přesahovat $1 \cdot 10^7$ buněk. Doporučuje se množství $3-4 \cdot 10^6$ buněk. Kolona se nesmí přeplňovat.

Do pufru RLT musí být přidán β -merkaptoethanol v množství 10 µl na 1 ml pufru. Roztok je stabilní jeden měsíc.

Pufr RPE je koncentrovaný, abychom získali pracovní roztok, musí se přidat 4 objemové díly ethanolu (96-100%).

Vše se děje za laboratorní teploty, teplota centrifugy nesmí být nižší než 20 °C. Během izolace je třeba pracovat rychle.

RNA byla izolována z buněk kultivovaných v monovrstvě na miskách o průměru 6 cm (pro daný PAH o dané koncentraci byly ze třech misek vybrány pro použití pouze

dvě). Z misek bylo úplně odsáto médium. Přídavkem 600 μ l RLT pufru na misky byly buňky lyzovány (rozrušením buněk obsah misek zgelovají). Lyzát byl sebrán špachtlí a přepipetován do mikrocentrifugační zkumavky (z každé misky zvlášť). Obsah zkumavek byl promíchán na vortexu, aby nebyly přítomné viditelné shluky. Po promíchání byl přidán stejný objem (600 μ l) 70% ethanolu a promíchán na vortexu.

Nejvýše 700 μ l vzorku bylo nanášeno na kolonku umístěnou ve 2 ml sběrné zkumavce. Zavřené zkumavky se centrifugovaly po dobu 15 s při 11000 rpm, čímž došlo k přefiltrování tekutiny přes kolonku. Filtrát byl odlit a opět nanášena další dávka vzorku, až byl postupně takto zpracován obsah obou mikrozkumavek pro daný substrát dané koncentrace.

Přídavkem 700 μ l pufru RW1 na kolonku a centrifugací po dobu 15 s při 11000 rpm se promývá kolonka a odstraňuje zachycená DNA, filtrát se odlije.

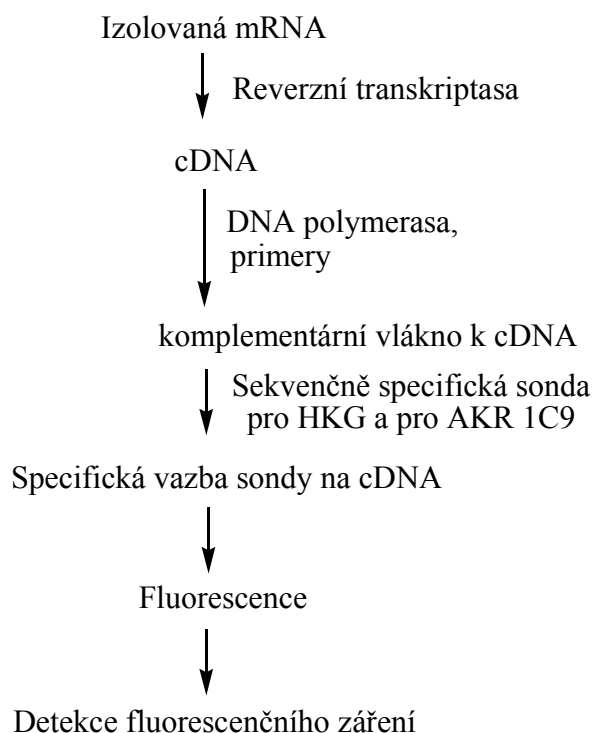
Kolonka byla přenesena do nové 2ml sběrné zkumavky. Na kolonku se napipetovalo 500 μ l pufru RPE, centrifugovalo po dobu 15 s při 11000 rpm, odlil se filtrát. Tento krok se opakoval ještě jednou, ale centrifugace trvala 2 minuty.

Kolonka se opatrně přenesla do 1,5ml sběrné zkumavky. Eluce RNA se provedla přídavkem 30 μ l RNasa-free vody, centrifugací po dobu jedné minuty při 11000 rpm, následným přídavkem stejného množství RNasa-free vody a stejnou centrifugací.

Takto jsme získali 60 μ l roztoku celkové RNA z hepatocytů inkubovaných s jednotlivými PAHy v jednotlivých koncentracích. Získané vzorky byly skladovány zamrazené při -80 °C.

4.2.9 Kvantifikace genové exprese

Při kvantifikaci genové exprese se jako stěžejní metoda využívá kvantifikace nukleových kyselin, založená na polymerázové řetězové reakci (PCR) [13]. V této práci byla použita metoda Quantitative RT-PCR (QuantiTect Custom Assays), při níž se průběh PCR měří v reálném čase. RT-PCR (real time-PCR) je vysoce selektivní a senzitivní metoda nezávislá na použití radioaktivních látek. Selektivita detekce je zajištěna specifickými fluorescenčně značenými sondami, zaznamenává se intenzita fluorescenčního záření. QuantiTect® Probe RT-PCR Kit umožňuje na přístroji Light Cycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo) provedení reverzní transkripce a PCR v jediné zkumavce. Všechny reagenty jsou součástí reakční směsi již na počátku reakce.



Obr. 23: Schematické znázornění kvantifikace nukleových kyselin

Reverzní transkripce probíhá po dobu 20 minut při teplotě 50 °C. Následuje zvýšení teploty na 95 °C po dobu 15 minut, čímž se aktivuje HotStarTaq DNA Polymerasa a zároveň inaktivují reverzní transkriptasy. Působením této vysoké teploty dochází také k denaturaci, tzn. oddělení vlákna původní mRNA a nově syntetizovaného vlákna cDNA. V následném kroku teplota klesne na 56 °C, a tím je zahájena hybridizace, tj. specifické navázání primeru a sondy na sekvenci cDNA. V průběhu hybridizace (30 sekund) zároveň probíhá detekce vznikající fluorescence. Teplota dále vzrůstá až na 76 °C. Po dobu 30 sekund se syntetizují nová vlákna DNA. Poslední uvedené teplotní změny bylo dosaženo rychlostí 2 °C/s, ve všech ostatních případech se teplota měnila rychlostí 20 °C/s. Denaturace, hybridizace/detekce a polymerace se opakovaly ve 45 cyklech [14].

Amplifikace vzorků byla provedena v celkovém objemu 20 µl reakční směsi obsahující 10 µl QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix, 0,2 µl QuantiTect RT Mix, 2µl roztoku primerů a sondy, 5,8 µl vody a 2 µl vzorku. Konečná koncentrace roztoku každého primeru byla 1 µM a sondy 0,2 µM.

Reakční prostředí vytváří QuantiTect Probe RT-PCR pufr, který obsahuje RNase-free vodu, TRIS·Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 8 mM MgCl₂, jeho pH je 8,7. Kombinace

reverzní transkriptasy Omniscript a Sensiscript umožňuje provedení vysoce účinné a citlivé reverzní transkripce v širokém rozsahu přítomného množství templátové RNA. V reakční směsi o celkovém objemu 20 μ l jsou obsaženy 2 μ l vzorku templátové RNA. Dalším přítomným enzymem je HotStarTaq DNA Polymerasa, což je modifikovaná forma rekombinantní DNA polymerasy, původně izolované z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* a naklonované do *E. coli*. Oba enzymy tvoří vlákno nukleové kyseliny z přítomných dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dUTP). V reakční směsi jsou dále obsaženy primery a sondy [14]. Primery jsou oligonukleotidy, které se párují s templátovou DNA na počátku a konci amplifikovaného fragmentu, po jejich navázání může DNA polymerasa nasynthetizovat komplementární vlákno DNA [5]. V této práci byly použity sondy QuantiProbes pro sledovaný gen (AKR1C9) a pro housekeeping gen (h-PBGD), jako vnitřní kontrolu. (Housekeeping geny jsou exprimovány konstitutivně, používají se jako referenční geny¹. Tyto tzv. provozní geny kódují tzv. provozní proteiny, které jsou společné všem druhům buněk mnohobuněčného organismu [5]).

QuantiProbes jsou sekvenčně specifické sondy značené fluoroforem na 3'konci, na 5'konci nefluorescenčním zhášecem a MGBTM (minor groove binder). MGBTM brání hydrolyze QuantiProbes působením 5'→3'exonukleasové aktivity Taq DNA polymerasy. QuantiProbes v roztoku tvoří náhodné struktury, které usnadňují účinné zhášení fluorescenčního signálu. Když sonda během PCR hybridizuje se svou cílovou sekvencí, fluorofor a zhášec se oddělí a je generován fluorescenční signál.

Tento signál je zobrazen v závislosti na počtu cyklů, křivka má sigmoidální tvar. Z této křivky byl pro každý vzorek metodou druhé derivace maxima určen bod, ve kterém je maximální nárůst fluorescence v logaritmicke-lineární části křivky. Software přístroje zároveň určí číslo cyklu, ve kterém bylo dosaženo bodu křížení (dochází k signifikantnímu nárůstu fluorescence – je protnut stanovený práh „threshold“). Bod křížení je popsán hodnotou CT (threshold cycle).

Pomocí hodnoty CT a porovnávací metody ($\Delta\Delta$ CT metoda) byl v každém vzorku vyjádřen relativní obsah cílového amplikonu podle vzorce:

$$\text{Relativní obsah cílového amplikonu} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = (\text{CT}_{\text{AKR1C9}} - \text{CT}_{\text{HKG}})_{\text{vzorek}} - (\text{CT}_{\text{AKR1C9}} - \text{CT}_{\text{HKG}})_{\text{kontrola}}$$

¹ <http://bmc.ub.uni-potsdam.de/1471-2199-6-4/1471-2199-6-4.pdf>

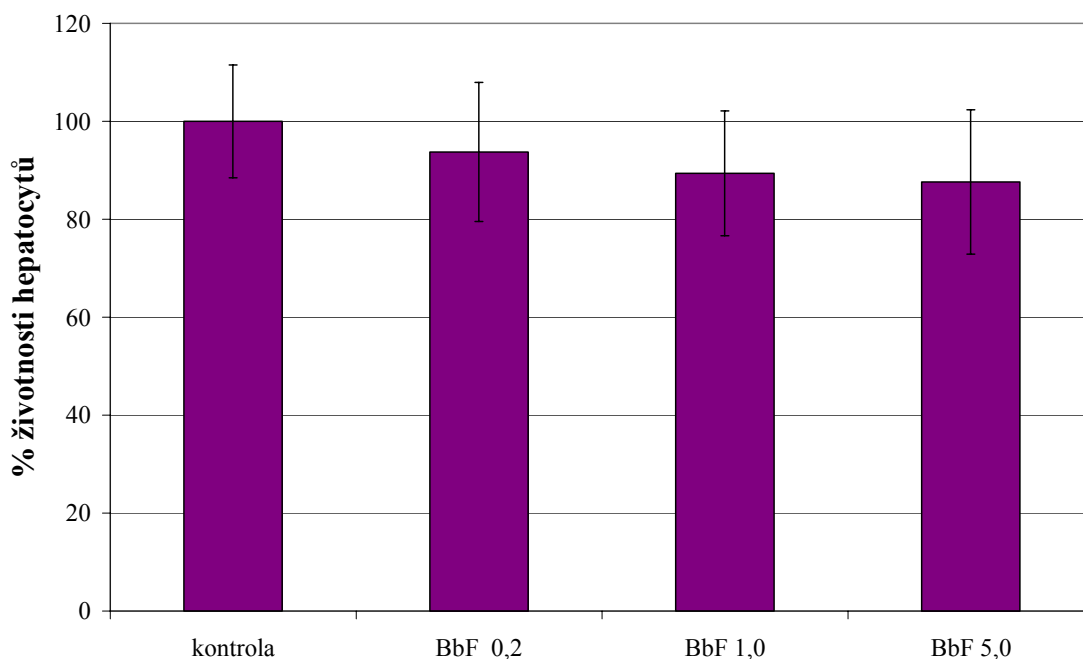
5. VÝSLEDKY

5.1 Test cytotoxicity

Životnost hepatocytů inkubovaných s testovanými substancemi byla vyjádřena jako % absorbance, kdy absorbance kontroly představuje 100%. S každým induktorem byly hepatocyty inkubovány ve 24 jamkách mikrotitrační destičky.

Tab. 2: Životnost hepatocytů inkubovaných s benzo[*b*]fluorantenem v koncentracích 0,2 μM, 1,0 μM a 5,0 μM

kontrola	100,00 ± 11,55
BbF 0,2	93,73 ± 14,18
BbF 1,0	89,41 ± 12,74
BbF 5,0	87,66 ± 14,73

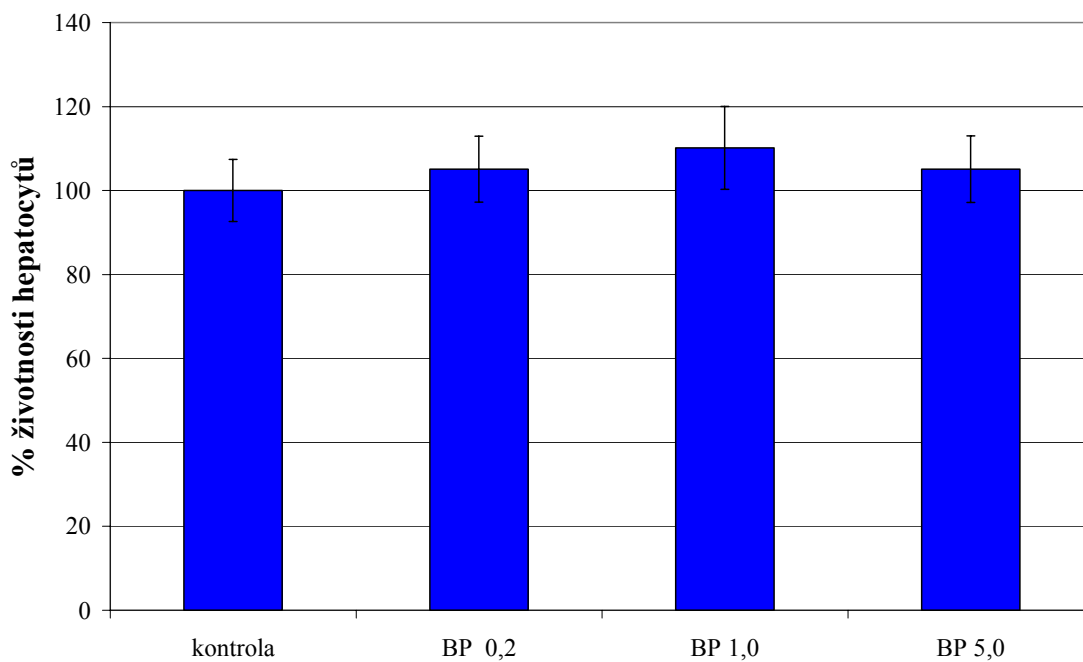


Obr. 24: Grafické znázornění životnosti hepatocytů inkubovaných s benzo[*b*]fluorantenem

Parametrickým t-testem (hladina významnosti $P < 0.05$) nebyl prokázán statisticky významný rozdíl životnosti buněk inkubovaných s BbF a buněk kontroly.

Tab. 3: Životnost hepatocytů inkubovaných s benzyrenem v koncentracích 0,2 μM, 1,0 μM a 5,0 μM

Kontrola	100,00 ± 7,41
BP 0,2	105,10 ± 7,84
BP 1,0	110,16 ± 9,86
BP 5,0	105,08 ± 7,96

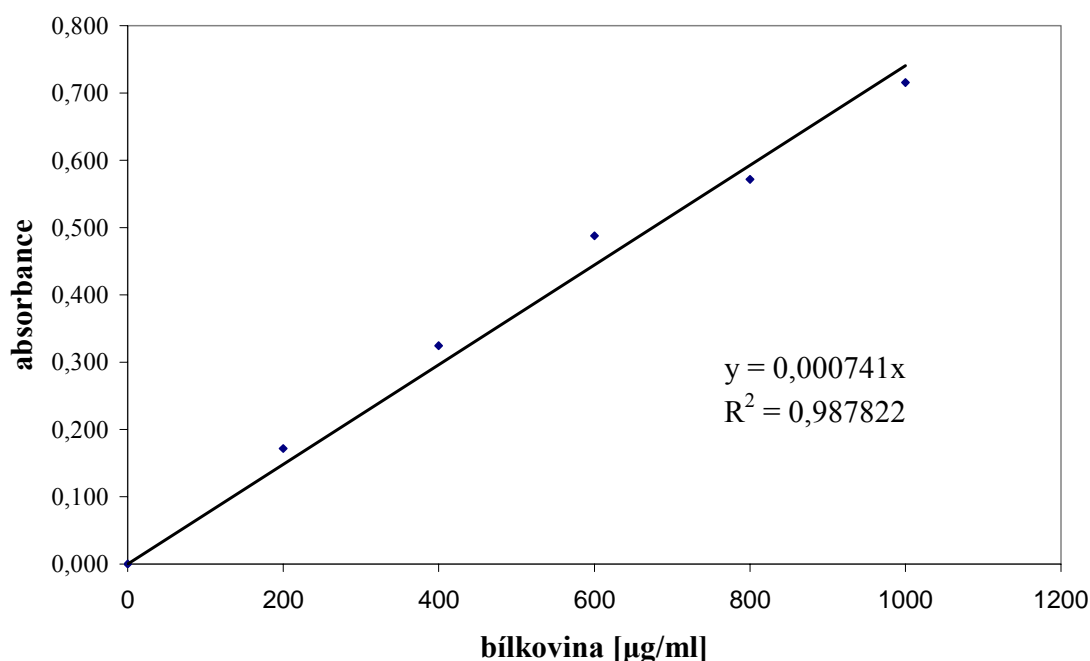


Obr. 25: Grafické znázornění životnosti hepatocytů inkubovaných s benzyrenem

Parametrickým t-testem (hladina významnosti $P < 0.05$) nebyl prokázán statisticky významný rozdíl životnosti buněk inkubovaných s BP a buněk kontroly.

5.2 Obsah bílkoviny

Obsah bílkoviny byl v jednotlivých vzorcích stanoven metodou BCA (viz. kapitola 4.2.4). Pro cytosol z hepatocytů inkubovaných s daným induktorem o dané koncentraci bylo připraveno osm paralelních vzorků v každém pokusu. Jednotlivé koncentrace bílkoviny byly vypočteny pomocí směrnice kalibrační přímky (viz obr. 26).



Obr. 26: Závislost absorbance na koncentraci bílkoviny, získaná změřením standardních roztoků BSA. Každý koncentrační bod je průměrem osmi měření. Rovnice přímky $y = 0,000741x$, korelační koeficient $R^2 = 0,987822$. Od naměřených hodnot byla odečtena absorbance slepého pokusu (0,080429), proto přímka prochází počátkem.

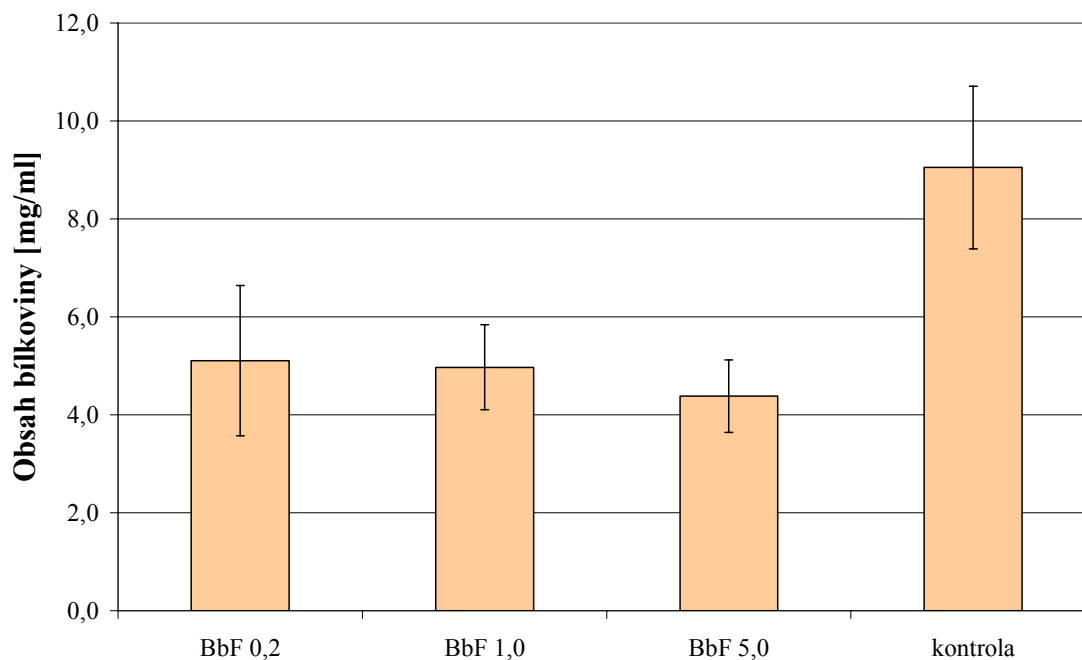
Z naměřených hodnot absorbance paralelních vzorků byla vypočítána průměrná koncentrace bílkoviny. Stanovení obsahu bílkoviny v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s benzo[b]fluorantenem bylo provedeno v jednom pokusu, stanovení obsahu bílkoviny v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s benzpyrenem bylo provedeno opakovaně ve třech pokusech.

Ke zjištění statistické významnosti rozdílu koncentrace bílkovin v jednotlivých pokusech oproti kontrole byl použit Studentův nepárový t-test a neparametrický Mann-Whitney U test s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$.

Tab. 4: Koncentrace bílkoviny [mg/ml] v cytosolu hepatocytů kontrolních a inkubovaných s benzo[*b*]fluorantenem v koncentracích 0,2 μM, 1,0 μM a 5,0 μM

BbF 0,2	5,11 ± 1,53*
BbF 1,0	4,97 ± 0,87*
BbF 5,0	4,38 ± 0,74*
kontrola	9,05 ± 1,66

* statistická významnost oproti kontrole ($P < 0,05$)



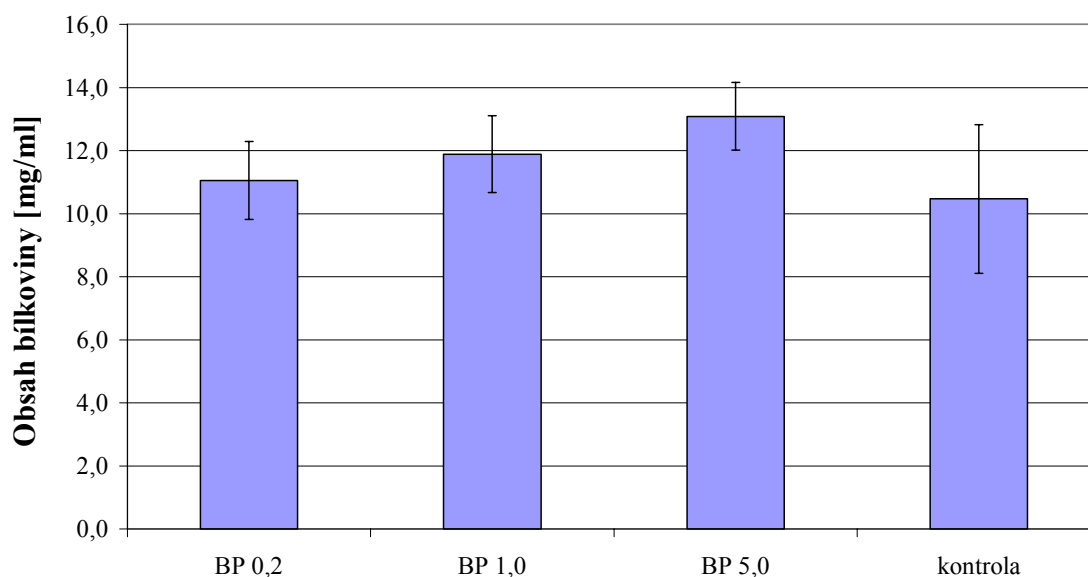
Obr. 27: Grafické znázornění obsahu bílkovin v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s benzo[*b*]fluorantenem

Z obrázku je jasně patrné, že koncentrace bílkovin v cytosolu hepatocytů inkubovaných s benzo[*b*]fluorantenem byla statisticky významně snížena v porovnání s kontrolou ($P < 0,05$) a to už v případě, kdy byla použita nejnižší koncentrace induktoru.

Tab. 5: Koncentrace bílkoviny [mg/ml] v cytosolu hepatocytů kontrolních a inkubovaných s benzyrenem v koncentracích 0,2 μ M, 1,0 μ M a 5,0 μ M v pokusu č. 1

BP 0,2	11,05 \pm 1,23
BP 1,0	11,89 \pm 1,22
BP 5,0	13,08 \pm 1,08*
kontrola	10,47 \pm 2,35

* statistická významnost oproti kontrole ($P < 0,05$)



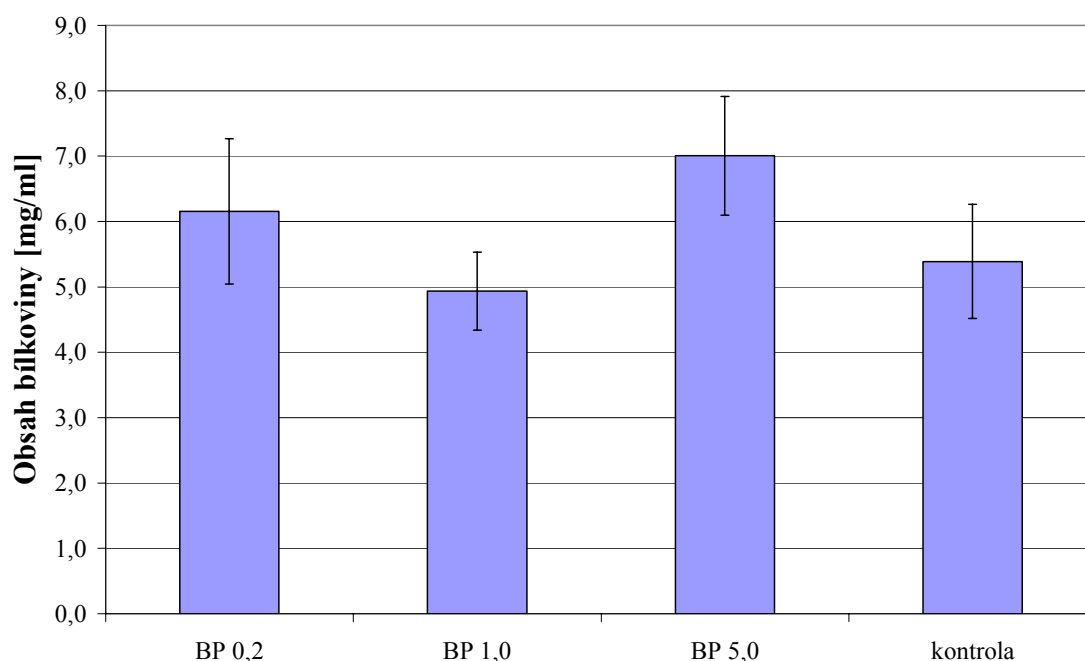
Obr. 28: Grafické znázornění obsahu bílkovin v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s benzyrenem v pokusu č. 1

Koncentrace bílkovin v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s benzyrenem v pokusu č. 1 byla zvýšena v porovnání s kontrolou, ale jenom v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s benzyrenem v koncentraci 5,0 μ M byl tento nárůst statisticky významný oproti kontrole ($P < 0,05$).

Tab. 6: Koncentrace bílkoviny [mg/ml] v cytosolu hepatocytů kontrolních a inkubovaných s benzyrenem v koncentracích 0,2 μM, 1,0 μM a 5,0 μM v pokusu č. 2

BP 0,2	6,15 ± 1,11
BP 1,0	4,94 ± 0,60
BP 5,0	7,01 ± 0,91*
kontrola	5,39 ± 0,87

* statistická významnost oproti kontrole (P < 0,05)

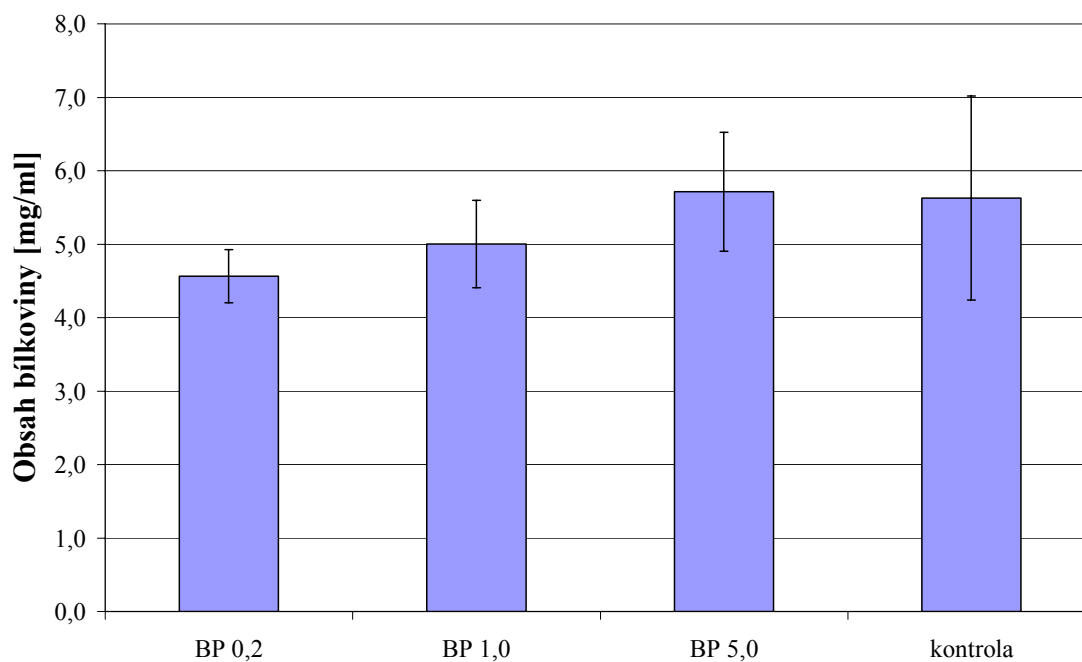


Obr. 29: Grafické znázornění obsahu bílkovin v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s benzyrenem v pokusu č. 2

V pokusu č. 2 nelze pozorovat jednoznačný trend změn koncentrace bílkovin v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s benzyrenem. Nejnižší a nejvyšší použitá koncentrace benzyrenu způsobila zvýšení koncentrace bílkovin. Toto zvýšení bylo statisticky významné oproti kontrole (P < 0,05) pouze v případě koncentrace benzyrenu 5,0 μM.

Tab. 7: Koncentrace bílkoviny [mg/ml] v cytosolu hepatocytů kontrolních a inkubovaných s benzyrenem v koncentracích 0,2 μM, 1,0 μM a 5,0 μM v pokusu č. 3

BP 0,2	4,56 ± 0,36
BP 1,0	5,00 ± 0,60
BP 5,0	5,72 ± 0,81
kontrola	5,63 ± 1,39



Obr. 30: Grafické znázornění obsahu bílkovin v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s benzyrenem v pokusu č. 3

V pokusu č. 3 bylo pozorováno jen malé ovlivnění koncentrace bílkovin působením benzyrenu ve všech použitých koncentracích. Žádná změna nebyla statisticky významná oproti kontrole ($P < 0,05$).

Po chemické stránce jsou enzymy bílkovinami, a proto mj. i množství bílkoviny je úměrné enzymové aktivitě. Stanovení obsahu bílkoviny je nutné pro výpočet specifické enzymové aktivity, tj. aktivity vztahované na 1 mg bílkoviny. Množství bílkoviny může též vypovídat o stavu jaterní tkáně [10].

5.3 Aktivity redukčních enzymů

Aktivita cytosolických redukčních enzymů byla měřena spektrofotometricky (viz kapitola 4.2.5). Ke zjištění statistické významnosti jednotlivých pokusných variant oproti kontrole byl použit Studentův nepárový t-test a neparametrický Mann-Whitney U test s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$.

Redukce acenaftenu

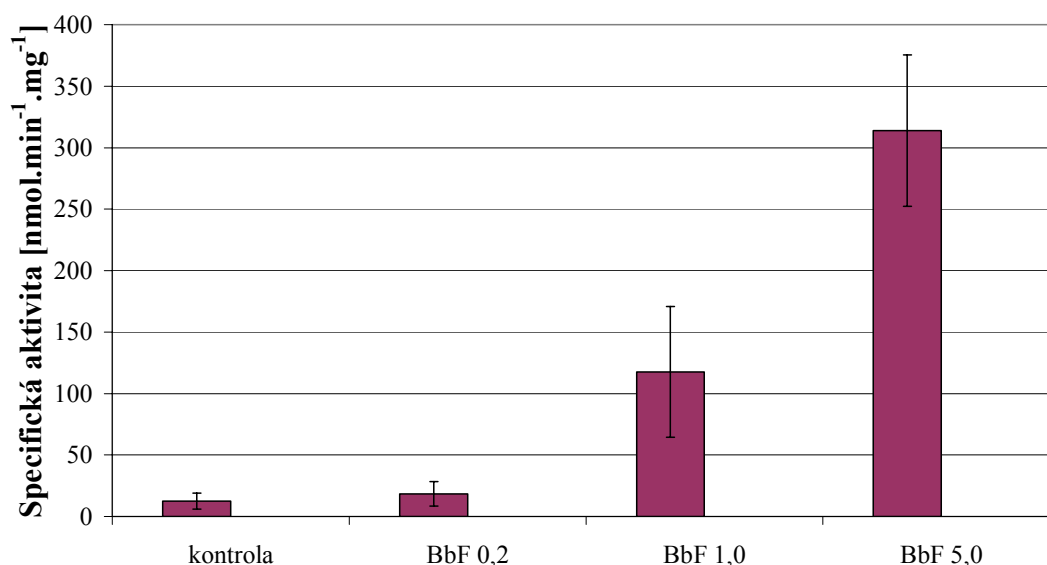
V následujících tabulkách jsou uvedeny výsledky měření enzymové aktivity při redukci acenaftenu v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s příslušnými induktory v daných koncentracích. Enzymová aktivita je vztažena na 1 mg bílkoviny a uvedena jako specifická aktivita.

Inkubace hepatocytů s benzo[*b*]fluorantem byla provedena v jednom pokusu.

Tab. 8: Specifická aktivita redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů kontrolních a inkubovaných s BbF v koncentracích 0,2 μM, 1,0 μM a 5,0 μM při redukcí acenaftenolu. Každá hodnota je průměrem čtyř paralelních měření

acenaftenol	Specifická aktivita [nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹]
Kontrola	12,48 ± 6,51
BbF 0,2	18,22 ± 9,97
BbF 1,0	117,64 ± 53,11*
BbF 5,0	313,77 ± 61,51*

* statistická významnost oproti kontrole (P < 0,05)



Obr. 31: Grafické znázornění specifické aktivity redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů inkubovaných s BbF při redukcí acenaftenolu

Z obrázku je jasně patrné, že nejvyšší specifická enzymová aktivita při redukcí acenaftenolu byla naměřena v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BbF v koncentraci 5,0 μM. Také specifická enzymová aktivita v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BbF v koncentraci 1,0 μM je statisticky významně vyšší oproti kontrole (P < 0,05). Specifická enzymová aktivita v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BbF v koncentraci 0,2 μM se statisticky významně neliší oproti kontrole (P < 0,05). Celkově je patrný nárůst specifické enzymové aktivity se vzrůstající koncentrací induktoru.

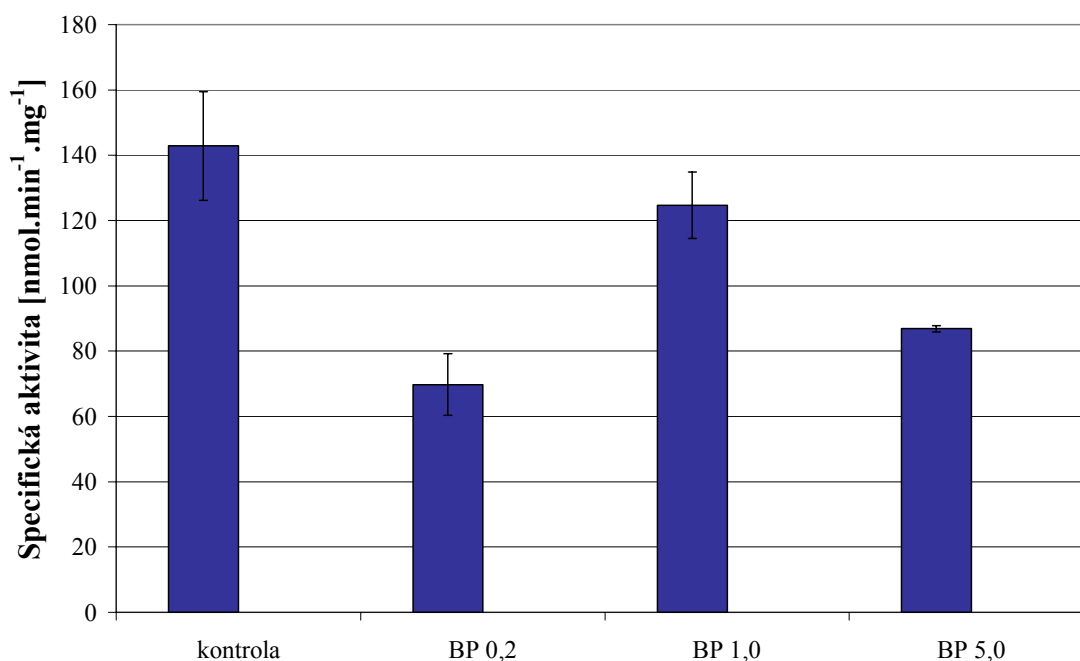
Inkubace hepatocytů s benzpyrenem byla provedena ve třech pokusech.

Pokus č. 1

Tab. 9: Specifická aktivita redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů kontrolních a inkubovaných s BP v koncentracích 0,2 μM , 1,0 μM a 5,0 μM při redukci acenaftenolu v pokusu č.1. Každá hodnota je průměrem čtyř paralelních měření

acenaftenol	Specifická aktivita [$\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]
Kontrola	$142,87 \pm 16,64$
BP 0,2	$69,77 \pm 9,42^*$
BP 1,0	$124,68 \pm 10,23$
BP 5,0	$86,85 \pm 1,02^*$

* statistická významnost oproti kontrole ($P < 0,05$)



Obr. 32: Grafické znázornění specifické aktivity redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů inkubovaných s BP při redukci acenaftenolu v pokusu č. 1

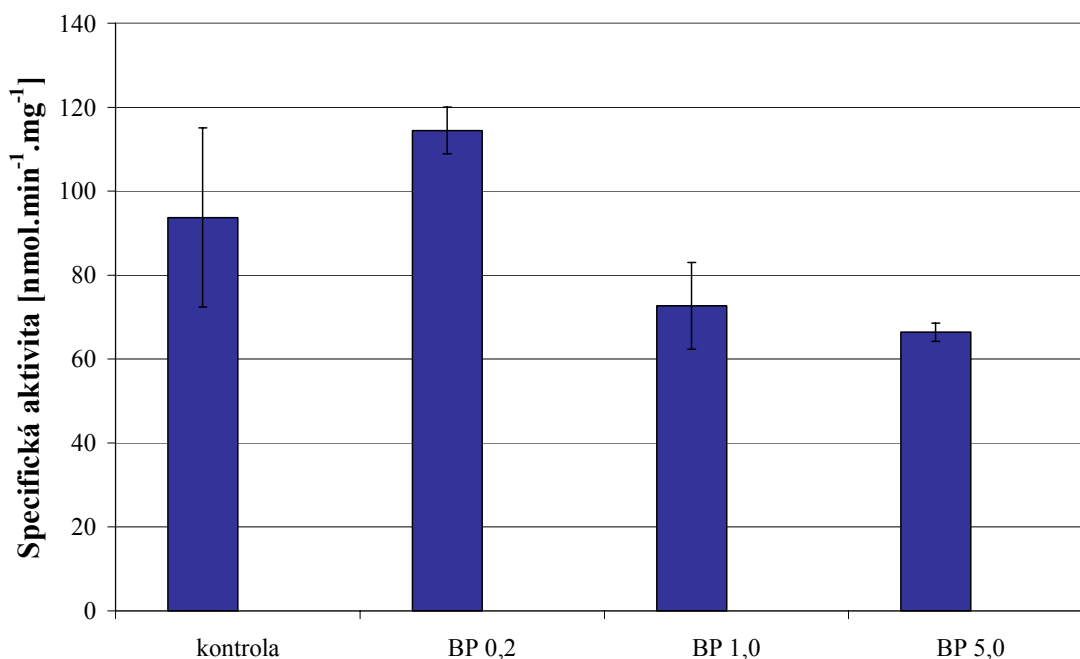
Z obrázku je patrné, že nejvyšší specifická enzymová aktivita při redukci acenaftenolu byla naměřena v cytosolické frakci hepatocytů neinkubovaných s induktorem. Statisticky významné snížení specifické enzymové aktivity oproti kontrole při redukci acenaftenolu pozorujeme v cytosolické frakci buněk inkubovaných s BP v koncentraci 0,2 μM a 5,0 μM .

Pokus č. 2

Tab. 10: Specifická aktivita redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů kontrolních a inkubovaných s BP v koncentracích 0,2 μM , 1,0 μM a 5,0 μM při redukcí acenaftenolu v pokusu č. 2. Každá hodnota je průměrem čtyř paralelních měření

acenaftenol	Specifická aktivita [$\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]
Kontrola	$93,71 \pm 21,31$
BP 0,2	$114,47 \pm 5,58$
BP 1,0	$72,68 \pm 10,31$
BP 5,0	$66,40 \pm 2,19^*$

* statistická významnost oproti kontrole ($P < 0,05$)



Obr. 33: Grafické znázornění specifické aktivity redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů inkubovaných s BP při redukcí acenaftenolu v pokusu č.2

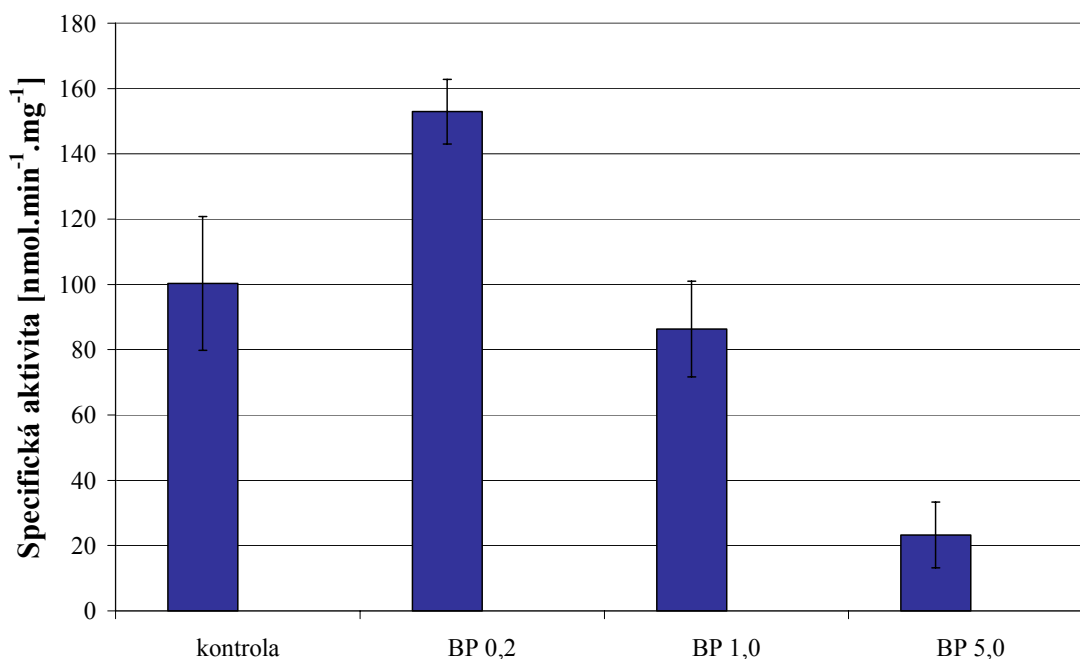
Na obrázku můžeme pozorovat mírný nárůst specifické enzymové aktivity při redukcí acenaftenolu v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BP v koncentraci 0,2 μM . Tento nárůst není statisticky významný ($P < 0,05$) v porovnání s kontrolou narozdíl od poklesu specifické enzymové aktivity při redukcí acenaftenolu v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BP v koncentraci 5,0 μM . Celkově tedy pozorujeme mírný nárůst specifické enzymové aktivity při redukcí acenaftenolu v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BP v nejnižší koncentraci a následný pokles aktivity při redukcí acenaftenolu v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BP ve vyšších koncentracích.

Pokus č. 3

Tab. 11: Specifická aktivita redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů kontrolních a inkubovaných s BP v koncentracích 0,2 μM , 1,0 μM a 5,0 μM při redukci acenaftenolu v pokusu č. 3. Každá hodnota je průměrem čtyř paralelních měření

acenaftenol	Specifická aktivita [nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹]
Kontrola	100,31 \pm 20,53
BP 0,2	152,92 \pm 9,95*
BP 1,0	86,37 \pm 14,64
BP 5,0	23,25 \pm 10,04*

* statistická významnost oproti kontrole ($P < 0,05$)



Obr. 34: Grafické znázornění specifické aktivity redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů inkubovaných s BP při redukci acenaftenolu v pokusu č. 3

Na obrázku pozorujeme v porovnání s kontrolou statisticky významný ($P < 0,05$) nárůst specifické enzymové aktivity při redukci acenaftenolu v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BP v koncentraci 0,2 μM a statisticky významný ($P < 0,05$) pokles specifické enzymové aktivity při redukci acenaftenolu v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BP v koncentraci 5,0 μM . Celkově tedy pozorujeme nárůst specifické enzymové aktivity při redukci acenaftenolu v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BP v nejnižší koncentraci a následný pokles aktivity při redukci acenaftenolu v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BP ve vyšších koncentracích. Tento trend je shodný s trendem pozorovaným v pokusu č. 2.

Redukce 4-pyridinkarboxaldehydu

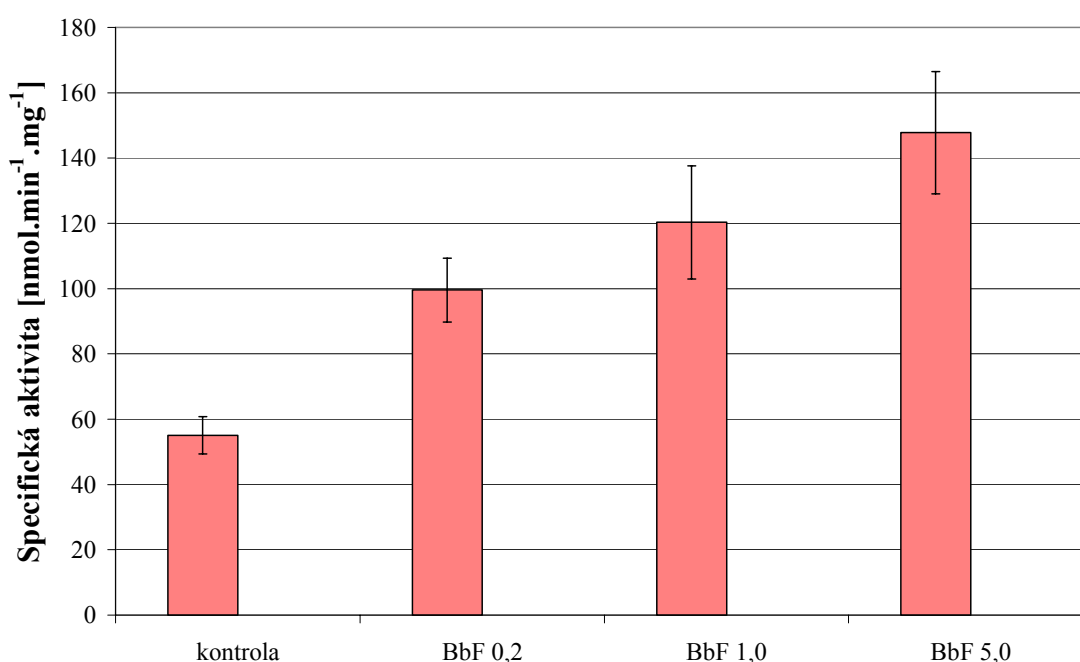
V následující tabulkách jsou uvedené výsledky měření enzymové aktivity při redukci 4-pyridinkarboxaldehydu v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s příslušnými induktory v daných koncentracích. Enzymová aktivita je vztažena na 1 mg bílkoviny a vyjádřena jako specifická aktivita.

Inkubace hepatocytů s benzo[b]fluorantenem byla provedena v jednom pokusu.

Tab. 12: Specifická aktivita redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů kontrolních a inkubovaných s BbF v koncentracích 0,2 μM , 1,0 μM a 5,0 μM při redukcí 4-pyridinkarboxaldehydu. Každá hodnota je průměrem čtyř paralelních měření

4-pyridinkarboxaldehyd	Specifická aktivita [$\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]
Kontrola	$55,07 \pm 5,60$
BbF 0,2	$99,56 \pm 9,83^*$
BbF 1,0	$120,31 \pm 17,33^*$
BbF 5,0	$147,79 \pm 18,75^*$

* statistická významnost oproti kontrole ($P < 0,05$)



Obr. 35: Grafické znázornění specifické aktivity redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů inkubovaných s BbF při redukcí 4-pyridinkarboxaldehydu

Z obrázku je jasně patrná nejvyšší specifická enzymová aktivita při redukcí 4-pyridinkarboxaldehydu naměřená v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BbF v koncentraci 5,0 μM . Také specifická enzymová aktivita v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BbF v koncentraci 1,0 μM a 0,2 μM je statisticky významná oproti kontrole ($P < 0,05$). Celkově je patrný nárůst specifické enzymové aktivity se vzrůstající koncentrací induktoru.

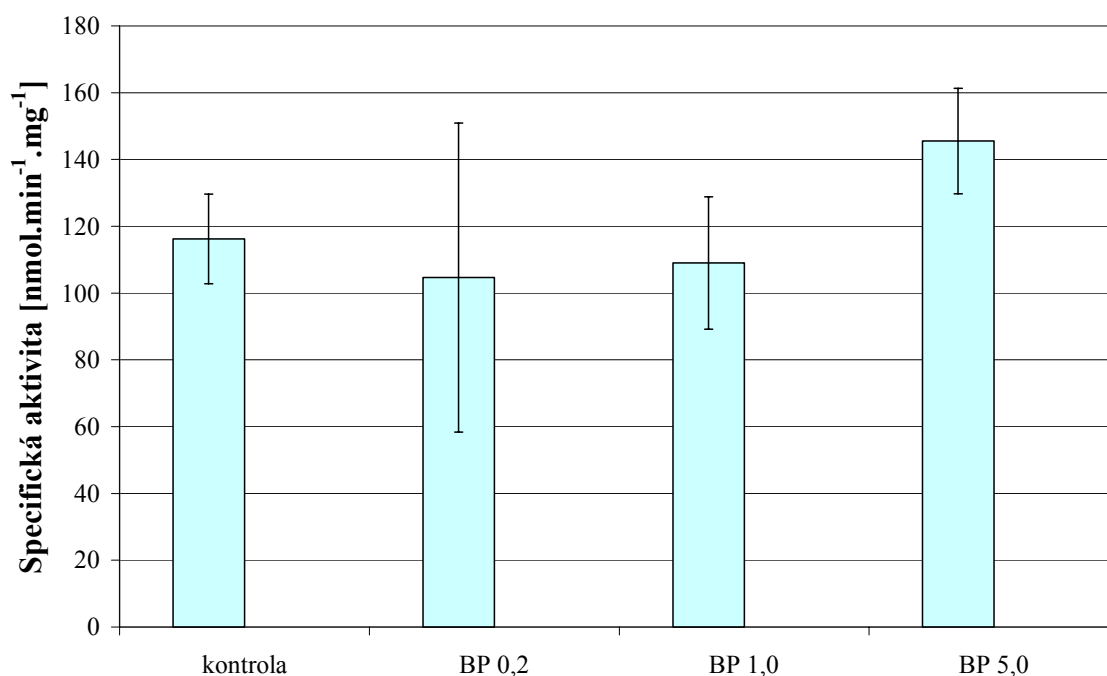
Inkubace hepatocytů s benzyrenem byla provedena ve třech pokusech.

Pokus č. 1

Tab. 13: Specifická aktivita redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů kontrolních a inkubovaných s BP v koncentracích 0,2 μM , 1,0 μM a 5,0 μM při redukcí 4-pyridinkarboxaldehydu v pokusu č.1. Každá hodnota je průměrem čtyř paralelních měření

4-pyridinkarboxaldehyd	Specifická aktivita [$\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]
Kontrola	116,20 \pm 13,38
BP 0,2	104,65 \pm 46,31
BP 1,0	109,02 \pm 19,85
BP 5,0	145,52 \pm 15,81*

* statistická významnost oproti kontrole ($P < 0,05$)



Obr. 36: Grafické znázornění specifické aktivity redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů inkubovaných s BP při redukcí 4-pyridinkarboxaldehydu v pokusu č.1

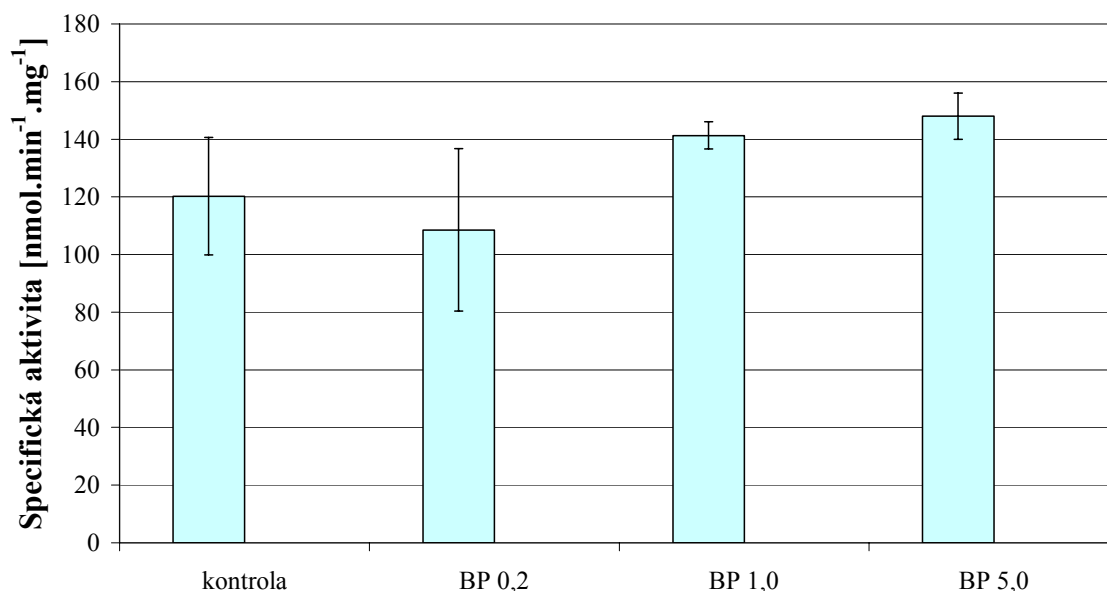
Z obrázku je patrný v porovnání s kontrolou statisticky významný ($P < 0,05$) nárůst specifické enzymové aktivity při redukcí 4-pyridinkarboxaldehydu naměřený v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BP v koncentraci 5,0 μM . Specifická enzymová aktivita v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BP v koncentraci 1,0 μM a 0,2 μM je nižší než specifická enzymová aktivita v cytosolické frakci hepatocytů neinkubovaných s induktory, avšak tento pokles není statisticky významný oproti kontrole ($P < 0,05$).

Pokus č. 2

Tab. 14: Specifická aktivita redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů kontrolních a inkubovaných s BP v koncentracích 0,2 μM , 1,0 μM a 5,0 μM při redukci 4-pyridinkarboxaldehydu v pokusu č.2. Každá hodnota je průměrem čtyř paralelních měření

4-pyridinkarboxaldehyd	Specifická aktivita [$\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]
Kontrola	120,22 \pm 20,37
BP 0,2	108,53 \pm 28,18
BP 1,0	141,32 \pm 4,66
BP 5,0	147,98 \pm 8,05*

* statistická významnost oproti kontrole ($P < 0,05$)



Obr. 37: Grafické znázornění specifické aktivity redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů inkubovaných s BP při redukci 4-pyridinkarboxaldehydu v pokusu č.2

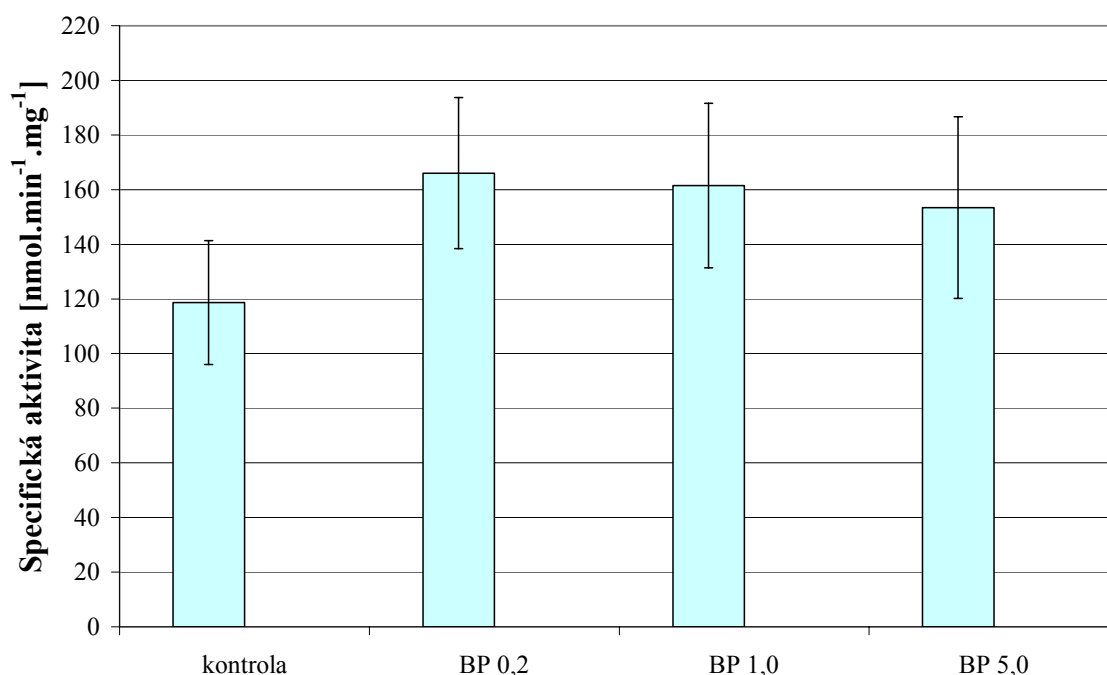
Z obrázku je patrný v porovnání s kontrolou statisticky významný ($P < 0,05$) nárůst specifické enzymové aktivity při redukci 4-pyridinkarboxaldehydu naměřený v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BP v koncentraci 5,0 μM . Specifická enzymová aktivita v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BP v koncentraci 1,0 μM je vyšší v porovnání s kontrolou, ale změna není statisticky významná oproti kontrole ($P < 0,05$). Specifická enzymová aktivita v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BP v koncentraci 0,2 μM je nižší než specifická enzymová aktivita v cytosolické frakci hepatocytů neinkubovaných s induktory, avšak tento pokles není statisticky významný oproti kontrole ($P < 0,05$).

Pokus č. 3

Tab. 15: Specifická aktivita redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů kontrolních a inkubovaných s BP v koncentracích 0,2 μM , 1,0 μM a 5,0 μM při redukcí 4-pyridinkarboxaldehydu v pokusu č.3. Každá hodnota je průměrem čtyř paralelních měření

4-pyridinkarboxaldehyd	Specifická aktivita [$\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]
Kontrola	118,61 \pm 22,67
BP 0,2	166,03 \pm 27,63*
BP 1,0	161,44 \pm 30,09
BP 5,0	153,44 \pm 33,21

* statistická významnost oproti kontrole ($P < 0,05$)



Obr. 38: Grafické znázornění specifické aktivity redukčních enzymů cytosolické frakce potkaních hepatocytů inkubovaných s BP při redukcí 4-pyridinkarboxaldehydu v pokusu č.3

Na obrázku můžeme pozorovat nárůst specifické enzymové aktivity při redukcí 4-pyridinkarboxaldehydu v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BP v koncentraci jak 0,2 μM tak 1,0 μM i 5,0 μM . Tento nárůst statisticky významný ($P < 0,05$) v porovnání s kontrolou pouze v případě specifické enzymové aktivity při redukcí 4-pyridinkarboxaldehydu v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BP v koncentraci 0,2 μM .

5.4 Kvantifikace produktů biotransformace oracinu

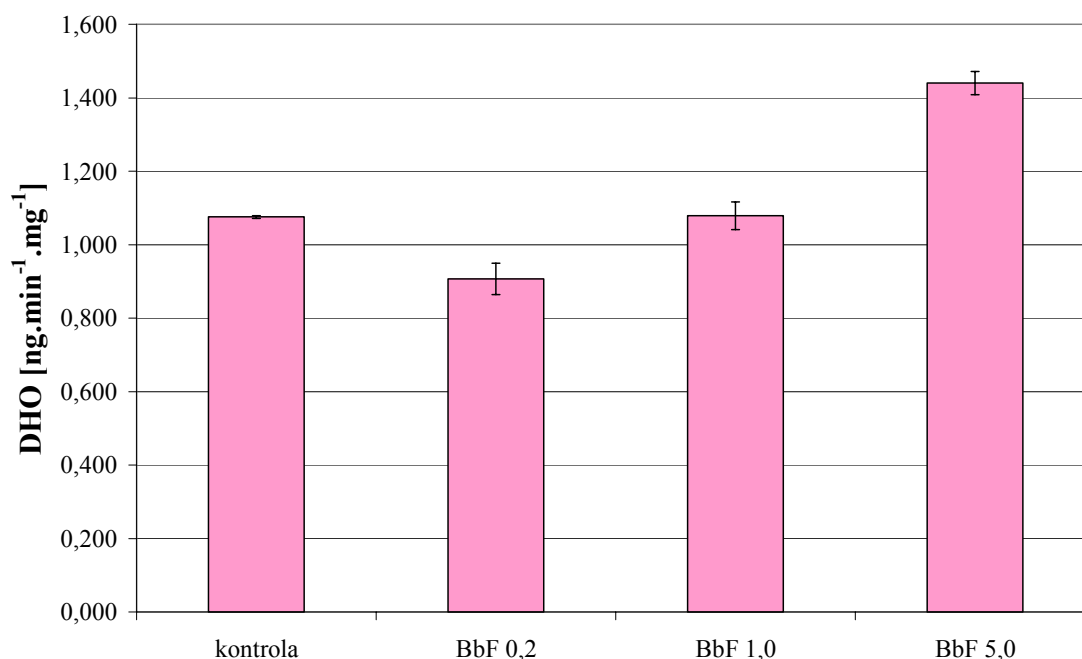
Kvantifikace produktů biotransformace oracinu byla provedena chromatograficky (viz. kapitola 4.2.7). Za podmínek uvedených výše, byl retenční čas 11-dihydrooracinu, jako hlavního produktu biotransformace oracinu, 2,720 min.

V následujících tabulkách je uvedena specifická enzymová aktivita pro redukcí oracinu jako množství dihydrooracinu [ng] vzniklé za 1 minutu působením enzymů cytosolické frakce hepatocytů inkubovaných s benzo[*b*]fluorantem a benzo[*a*]pyrenem v koncentracích 0,2 μM, 1,0 μM a 5,0 μM. Množství dihydrooracinu bylo vztaženo na 1 mg bílkovin v příslušném vzorku cytosolu.

Tab. 16: Množství dihydrooracinu [ng] vzniklého za 1min v cytosolu z hepatocytů kontrolních a inkubovaných s benzo[*b*]fluorantem v koncentracích 0,2 μM, 1,0μM a 5,0μM. Množství cytosolu odpovídá 1 mg bílkovin

	DHO[ng·min ⁻¹ ·mg ⁻¹]
Kontrola	1,075 ± 0,003
BbF 0,2	0,907 ± 0,043*
BbF 1,0	1,079 ± 0,038
BbF 5,0	1,440 ± 0,032*

* statistická významnost oproti kontrole (P < 0,05)



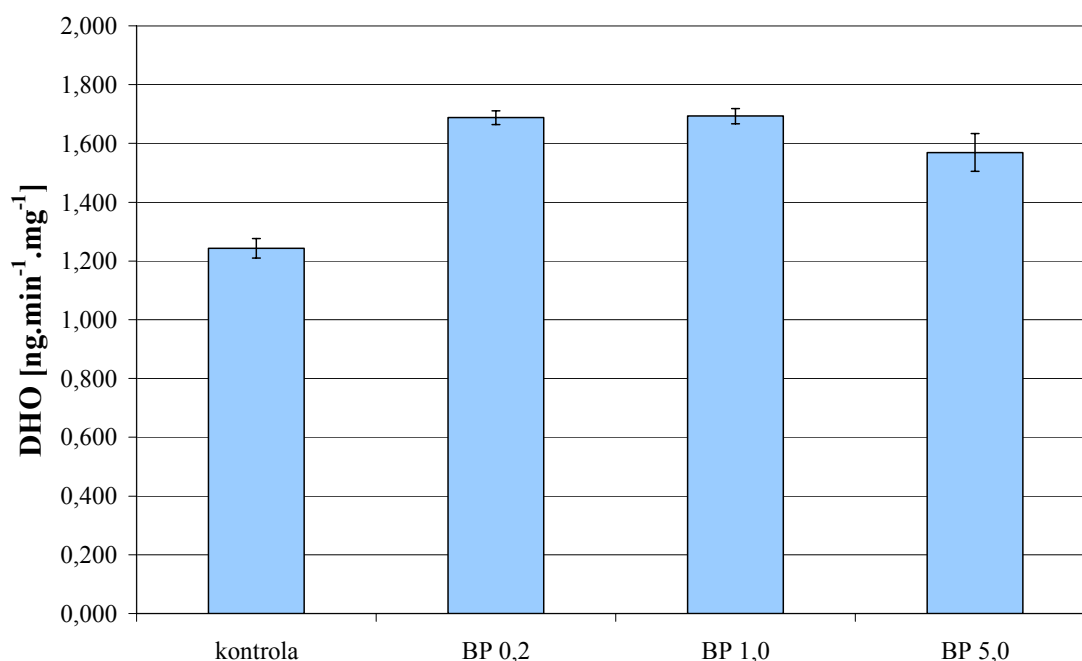
Obr. 39: Grafické vyjádření obsahu DHO v cytosolu hepatocytů inkubovaných s BbF

Z grafu je patrný statisticky významný ($P < 0,05$) pokles obsahu DHO v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BbF v koncentraci $0,2 \mu\text{M}$ a nárůst obsahu DHO při inkubaci s BbF v koncentraci $5,0 \mu\text{M}$.

Tab. 17: Množství dihydrooracinu [ng] vzniklého za 1min v cytosolu z hepatocytů kontrolních a inkubovaných s benzyperenem v koncentracích $0,2 \mu\text{M}$, $1,0 \mu\text{M}$ a $5,0 \mu\text{M}$. Množství cytosolu odpovídá 1 mg bílkovin

	DHO[ng·min ⁻¹ ·mg ⁻¹]
Kontrola	1,243 ± 0,033
BP 0,2	1,688 ± 0,024*
BP 1,0	1,693 ± 0,026*
BP 5,0	1,569 ± 0,064*

* statistická významnost oproti kontrole ($P < 0,05$)



Obr. 40: Grafické vyjádření obsahu DHO v cytosolu hepatocytů inkubovaných s BP

Pro inkubaci s oracinem byly použity vzorky cytosolu připravené současně se vzorky pro stanovení enzymové aktivity při redukci 1-acenaftenolu a 4-pyridinkarboxaldehydu v pokusu č. 3. Množství DHO bylo statisticky významně ($P < 0,05$) zvýšeno v porovnání s kontrolou ve vzorcích cytosolu hepatocytů inkubovaných s BP ve všech koncentracích, ale nezvyšuje se úměrně zvyšující se koncentraci BP.

5.5 Kvantifikace genové exprese

Kvantifikace genové exprese byla provedena ve Výzkumném ústavu veterinárních léčiv (VÚVeL), Brno, oddělení chemie a toxikologie.

V následujících tabulkách jsou uvedeny naměřené CT hodnoty housekeeping genu PBGD (CT_{HKG}), CT hodnoty sledovaného genu (CT_{AKR1C9}) a relativní vyjádření genové exprese vypočítané metodou popsanou v kapitole 4.2.9.

Materiál pro kvantifikaci genové exprese v hepatocytech inkubovaných s benzo[*b*]fluorantem byl připraven v jednom pokusu.

Tab. 18: Relativní vyjádření genové exprese v hepatocytech kontrolních a inkubovaných s BbF v koncentracích 0,2 μM , 1,0 μM a 5,0 μM

BbF	CT_{HKG}	CT_{AKR1C9}	Relativní vyjádření genové exprese
kontrola	23,76*	21,84*	1,00
BbF 0,2	23,87	21,70	0,84
BbF 1,0	23,79	22,66	0,58
BbF 5,0	23,42	21,68	0,89

* průměr hodnot dvou měření

Z tabulky vyplývá, že v pokusu s BbF je relativní genová exprese nižší než hodnota 1 příslušné kontroly.

Materiál pro kvantifikaci genové exprese v hepatocytech inkubovaných s benzpyrenem byl připraven ve třech pokusech.

Tab. 19: Relativní vyjádření genové exprese v hepatocytech kontrolních a inkubovaných s BP v koncentracích 0,2 μM , 1,0 μM a 5,0 μM v pokusu č. 1

BP-pokus č.1	CT _{HKG}	CT _{AKR1C9}	Relativní vyjádření genové exprese
kontrola	23,65	22,98	1,00
BP 0,2	25,08	24,06	1,27
BP 1,0	24,94	23,83	1,36
BP 5,0	25,00	23,36	1,96

Tab. 20: Relativní vyjádření genové exprese v hepatocytech kontrolních a inkubovaných s BP v koncentracích 0,2 μM , 1,0 μM a 5,0 μM v pokusu č. 2

BP-pokus č.2	CT _{HKG}	CT _{AKR1C9}	Relativní vyjádření genové exprese
kontrola	24,28*	23,22*	1,00
BP 0,2	24,93	24,18	0,81
BP 1,0	24,13	23,26	0,88
BP 5,0	25,15	24,27	0,88

* průměr hodnot dvou měření

Tab. 21: Relativní vyjádření genové exprese v hepatocytech kontrolních a inkubovaných s BP v koncentracích 0,2 μM , 1,0 μM a 5,0 μM v pokusu č. 3

BP-pokus č.3	CT _{HKG}	CT _{AKR1C9}	Relativní vyjádření genové exprese
kontrola	23,76*	21,84*	1,00
BP 0,2	23,38	21,58	0,92
BP 1,0	24,37	22,79	0,79
BP 5,0	23,89	21,98	1,00

* průměr hodnot dvou měření

Trend nárůstu genové exprese můžeme pozorovat pouze v hepatocytech inkubovaných s benzpyrenem v pokusu č. 1. Aby se tento nárůst dal považovat za statisticky významný, musela by hodnota relativní genové exprese být větší než 2,5. V ostatních pokusech s BP je relativní genová exprese nižší než hodnota 1 příslušné kontroly, což značí, že nedošlo k indukci. Popř. je možné usuzovat na chybu při stanovení, neboť byly vyloučeny cytotoxické koncentrace snižující expresi pod hodnotu kontroly.

6. DISKUSE

Tato práce byla prováděna s cílem stanovit vliv polycyklických aromatických uhlovodíků na modulaci aktivit cytosolických redukčních enzymů z nadrodiny AKR v hepatocytech potkana (*Rattus norvegicus var. alba*). Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou považovány za modulátory enzymové aktivity ve smyslu inhibice nebo indukce, jak bylo potvrzeno v provedených studiích, např. [7]. Tato práce se konkrétně zaměřuje na působení benzo[*a*]pyrenu a benzo[*b*]fluorantenu.

Inhibice je způsobená například kompeticí o aktivní místo enzymu, sebevraždnými inhibitory nebo kompeticí o kofaktory. Indukce v užším smyslu znamená zvýšení syntézy mRNA a následné zvýšení proteosyntézy specifické bílkoviny, respektive enzymu. V širším smyslu se enzymová indukce definuje jako zvýšení aktivity určitého enzymu, které je výsledkem nejen zvýšení jeho syntézy či aktivace hotového enzymu, ale i možného snížení jeho degradace.

V rámci této práce byla sledována modulace aktivit redukčních enzymů v užším i širším smyslu, tedy byly zjišťovány změny na úrovni mRNA i změny na úrovni aktivity redukčních enzymů v cytosolické frakci potkaních hepatocytů při redukci relativně specifických substrátů 4-pyridinkarboxaldehydu, 1-acenaftenolu a oracinu.

V cytosolické frakci lidských jater je 4-pyridinkarboxaldehyd redukován na 4-pyridinkarbinol aldehydreduktasou (AKR1A1) [10]. 1-Acenaftenol se oxiduje na 1-acenaftenon, 1,2-acenaftendiol, acenaftenchinon a 1,2-dihydroxyacenftylen, tak je tomu například u *Beijerinckia sp*¹. Oracin je redukován na 11-dihydrooracin (DHO), v mikrosomech lidských jater působením 11 β -HSD1 [12], v cytosolu pomocí karbonylreduktasy a aldoketoreduktas (AKR1C1, 1C2 a 1C4) [16] Změny na úrovni mRNA i změny aktivity enzymů byly stanoveny na základě porovnání naměřených hodnot charakterizujících cytosol z hepatocytů, které byly vystaveny působení PAHů, a kontrolních vzorků cytosolu z hepatocytů, které byly vystaveny stejným procesům mimo přítomnosti testovaných látek.

Enzymová aktivita při redukci 4-pyridinkarboxaldehydu a 1-acenaftenolu byla vypočítána z výsledků spektrofotometrického měření změn absorbance v čase způsobených změnami koncentrace oxidované a redukované formy kofaktoru

¹ <http://www.pubmedcentral.gov/picrender.fcgi?tool=pmcentrez&blobtype=pdf&artid=240288>

nikotinamidadenindinukleotidfosfátu. Enzymová aktivita při redukci oracinu byla vypočítána z chromatograficky stanoveného množství 11-dihydrooracinu, hlavního produktu biotransformace parentní látky.

Pro výpočet specifické aktivity, čili aktivity vztažené na miligram bílkoviny, bylo nutné stanovit koncentraci bílkoviny v jednotlivých vzorcích. K tomu byla využita metoda BCA (bicinchonic acid), kterou lze zachytit 0,5 – 10 µg bílkoviny v 1 ml inkubační směsi. Další výhodou metody BCA je nízká spotřeba chemikálií, protože se bílkovina stanovuje na mikrotitrační destičce [10].

Koncentrace bílkovin může odrážet stav laboratorního zvířete a z něho získané jaterní tkáň použité pro přípravu primárních kultur hepatocytů.

Testované polycyklické aromatické uhlovodíky se lišily ve svém vlivu na obsah bílkovin v cytosolu. Zatímco benzo[b]fluoranten koncentraci bílkovin statisticky významně snížil v porovnání s kontrolou ($P < 0,05$) a to už v případě, kdy byla použita jeho nejnižší koncentrace, benzpyren nevykazoval v opakovaných pokusech jednoznačný vliv, obsah bílkovin spíše zvyšoval.

Primární vliv sledovaných polycyklických aromatických uhlovodíků na životnost hepatocytů byl určen testem cytotoxicity MTT (dimethylthiazolodiphenyltetrazolium bromid). Parametrickým t-testem (hladina významnosti $P < 0,05$) nebyl prokázán statisticky významný rozdíl životnosti buněk inkubovaných s BP ani BbF v testovaných koncentracích (0,2 µM, 1,0 µM a 5,0 µM) v porovnání s kontrolními buňkami, zvláště přihlédneme-li k faktu, že variabilita samotného testu je 10 – 15 %.

Obsah bílkovin se odráží ve specifické enzymové aktivitě. Tato veličina byla statisticky významně zvýšena v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s BbF při redukci jak 1-acenaftenolu, tak 4-pyridinkarboxaldehydu i oracinu. Benzo[b]fluoranten v koncentraci 0,2 µM specifickou enzymovou aktivitu zvýšil o 80 % při redukci 4-pyridinkarboxaldehydu. V koncentraci 1,0 µM specifickou enzymovou aktivitu zvýšil o 110 % při redukci 4-pyridinkarboxaldehydu a zdevítinásobil při redukci 1-acenaftenolu. Nejvyšší použitá koncentrace BbF (5,0 µM) měla na specifickou enzymovou aktivitu největší vliv, byla zvýšena při redukci oracinu o 34 %, při redukci 4-pyridinkarboxaldehydu o 170 %. Při redukci 1-acenaftenolu byla dokonce 25krát vyšší než specifická enzymová aktivita v cytosolu kontrolních buněk.

V opakovaných pokusech, kdy byly hepatocyty vystaveny působení BP, nelze pozorovat tak jednoznačné trendy ovlivnění jako při působení BbF. Při redukci 1-acenaftenolu můžeme pozorovat zvýšení specifické aktivity vlivem nejnižší použité

koncentrace BP s výjimkou pokusu č. 1, kdy koncentrace 0,2 μM způsobila pokles specifické enzymové aktivity o 52 %. Pravděpodobně se jedná o chybu měření, tedy tuto hodnotu musíme vyloučit, protože v opakovaných pokusech (pokus č. 2 a č. 3) jsou trendy souhlasné – nejnižší použitá koncentrace BP vede k nárůstu specifické aktivity. Se vzrůstající koncentrací PAHu specifická aktivita klesala (až o 77 % v pokusu č. 3 při koncentraci BbF 5,0 μM).

Při redukci 4-pyridinkarboxaldehydu došlo vlivem nejnižší použité koncentrace BP k mírnému snížení specifické aktivity, se vzrůstající koncentrací PAHu specifická aktivita vzrůstala asi o 25 % (v pokusu č.1 a č. 2). V pokusu č. 3 se však trend lišil – nejvyšší specifická aktivita byla zaznamenána při nejnižší použité koncentraci PAHu, s jeho vzrůstající koncentrací specifická aktivita klesá, trend v tomto pokusu je tak obdobný s trendem změn specifické aktivity při redukci 1-acenaftenolu a oracinu.

Pomocí měření aktivit vůči 1-acenaftenolu, 4-pyridinkarboxaldehydu a oracinu bylo prokázáno zvýšení aktivity redukčních enzymů cytosolické frakce hepatocytů inkubovaných s BbF. Avšak po inkubaci hepatocytů s BP se nepodařilo jednoznačně prokázat zvýšení aktivity cytosolických redukčních enzymů ani vůči 1-acenaftenolu, 4-pyridinkarboxaldehydu, ani oracinu.

Indukce enzymů v užším smyslu (indukce mRNA) se nepodařila prokázat vlivem BP ani BbF. Relativní exprese genu pro AKR1C9 v buňkách inkubovaných s PAHy byla nižší než v buňkách kontrolních, nebo byla zvýšena jen nevýznamně v porovnání s kontrolou (při inkubaci s BP v pokusu č. 1).

Například v lidských buňkách hepatomu (HepG2) a buňkách karcinomu tlustého střeva (HT29) byla AKR1C1 mRNA indukována působením mikromolárních koncentrací benzpyrenchinonu, látky vzniklé biotransformací parentního benzo[*a*]pyrenu. Hladiny AKR1C1 mRNA byly zvýšeny třikrát [7]. Izoenzym AKR1C1 a AKR1C2 patří do téže podrodiny AKR1C, tudíž mají sekvenční aminokyselinovou identitu > 60 %. Avšak izoenzym AKR1C2 v téže studii indukován nebyl. Méně než 40% variabilita sekvence aminokyselin je tedy dostatečná k tomu, aby se tatáž látka projevila v případě jednoho izoenzymu jako induktor a v případě druhého nikoli. Do této podrodiny enzymů náleží také izoenzym AKR1C9, jehož relativní genová exprese byla sledována v této práci, avšak indukce jeho mRNA nebyla pozorována. Popřípadě je možné usuzovat na chybu při stanovení, neboť jak již bylo uvedeno, cytotoxicita použitých koncentrací benzo[*a*]pyrenu a benzo[*b*]fluorantenu byla na základě

MTT-testu vyloučena, tím je také vyloučeno snížení genové exprese pod hodnotu kontroly jako důsledek cytotoxicity.

Pro dosažení jednoznačných výsledků bude ještě nutné provést další pokusy s BbF a zopakovat pokusy s BP.

7. ZÁVĚR

Studie modulace aktivit cytosolických reductas z nadrodiny AKR v hepatocytech potkana (*Rattus norvegicus var. alba*) polycyklickými aromatickými uhlovodíky (benzo[*b*]fluorantenem a benzo[*a*]pyrenem) přinesla tyto výsledky:

- Specifická aktivita redukčních enzymů z nadrodiny AKR v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s benzo[*b*]fluorantenem byla statisticky významně zvýšena v porovnání s kontrolou při redukci 1-acenaftenolu, 4-pyridinkarboxaldehydu v závislosti na zvyšující se koncentraci polycyklického aromatického uhlovodíku (0,2 μM , 1,0 μM a 5,0 μM). Při redukci oracinu byla statisticky významně snížena nejnižší použitou koncentrací BbF a statisticky významně zvýšena nejvyšší použitou koncentrací BbF.
- Specifická aktivita redukčních enzymů z nadrodiny AKR v cytosolické frakci hepatocytů inkubovaných s benzo[*a*]pyrenem (ve všech použitých koncentracích, nejvíce při nejnižší koncentraci (0,2 μM) polycyklického aromatického uhlovodíku) byla v porovnání s kontrolou statisticky významně zvýšena při redukci oracinu. Při redukci 4-pyridinkarboxaldehydu a 1-acenaftenolu nebyl pozorován jednoznačný trend změn specifické aktivity.
- Na základě izolace RNA z kontrolních a ovlivněných hepatocytů a následné kvantifikace mRNA pro AKR1C9 se nepodařilo prokázat zvýšení genové exprese sledovaného enzymu.

8. SEZNAM ZKRATEK

(+/-) <i>anti</i> -BPDE	(+/-) <i>anti</i> -7,8-dihydroxy-9 α ,10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyren
(O ₂ ^{·-})	superoxidový anion radikál
(OH [·])	hydroxylový radikál
3HO	6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-3-hydroxy-5,11-dioxo-5,6-dihydro-11H-indeno[1,2-c] isochinolin
4-PAK	4-pyridinkarboxaldehyd
AhR	arylhydrocarbon receptor
AKR	aldo-keto reduktasa
BbF	benzo[b]fluoranten
BCA	bicinchonic acid; 2,2'-bicincholin-4,4'-dikarboxylová kyselina
BP	benzo[a]pyren
BPQ	benzo[a]pyren-7,8-dion
BSA	hovězí sérový albumin
CYP	cytochrom P450
DD	Dihydrodioldehydrogenasa
DHO	6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5-oxo-11-hydroxy-5,6-dihydro-11H-indeno[1,2-c] isochinolin
dNTP	Deoxynukleotidtrifosfát
EH	epoxid hydrolasa
EpRE/ARE	electrophilic response elements/antioxidant response element
FBS	fetální hovězí sérum
GSH	Glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
GST	glutathion S-transferasa
HKG	housekeepin gen
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
h-PBGD	housekeeping gen porfobilinogen deaminasy
HSD	hydroxysteroid dehydrogenasa
MGB TM	minor groove binder
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
MTT	3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid
NAD ⁺	Nikotinamidadeninukleotid
NADH	redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NADP ⁺	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
Nrf2	nuclear factor-E2 p45-related factor 2
Oracin	6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5,11-dioxo-5,6-dihydro-11H-indeno[1,2-c]isochinolin
P450	cytochrom P450
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

	(polycyklické aromatické uhlovodíky)
ROS	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
RT-PCR	real time-polymerase chain reaction
SQ	<i>o</i> -semichinonový anion radikál
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TRIS	trihydroxymethylaminomethan
XRE	xenobiontics response elements
β-ME	B-merkптоethanol

9. LITERATURA

1. Palackal, N. T., Burczynski, M. E., Harvey, R. G., Penning, T. M.: **Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbon *trans*-dihydrodiols by ubiquitously expressed aldehyde reductase (AKR1A1)**, *Chem.-Biol. Interact.* 130-132 (2001), str. 815-824
2. Penning, T. M.: **Dihydrodiol dehydrogenase and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism**, *Chem.-Biol. Interact.* 89 (1993), str. 1-34
3. Penning, T. M., Burczynski, M. E., Hung, C. F., McCoull, K. D. Palackal, N. T. and Tsuruda, L. S.: **Dihydrodiol Dehydrogenases and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Activation: Generation of Reactive and Redox Active o-Quinones**, *Chem. Res. Toxicol*, Vol. 12, No. 1, 1999, str 1-18
4. Palackal, N. T., Lee, S. H., Harvey, R. G., Blair, I. A. and Penning, T. M.: **Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon *trans*-Dihydrodiol Proximate Carcinogens by Human Aldo-keto Reduktase (AKR1C) Enzymes and Their Functional Overexpression in Human Lung Carcinoma (A549) Cells**, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 227, No. 27, 2002, str.24799-24806
5. Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: **Základy buněčné biologie**, *Ústí nad Labem 1998*, str. 211-346, 580-581
6. Flowers, L., Ohnishi, S. T, Penning, T. M.: **DNA strand scission by polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones: role of reactive oxygen species, Cu(II)/Cu(I) redox cycling, and o-semiquinone anion radicals**, *Biochemistry* 1997 Jul 15; 36(28): 8640-8648
7. Burczynski, M. E., Lin, H. K. and Penning, T. M.: **Isoform-specific Induction of a Human Aldo-Keto Reduktase by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Electrophiles, and Oxidative Stress: Implications for the Alternative Pathway of Activation Catalyzed by Human Dihydrodiol Dehydrogenase**, *Cancer Research* 59, 1999, str.607-614
8. Burczynski, M. E., Sridhar, G. R., Palackal, N. T. and Penning, T. M.: **The Reactive Oxygen Species- and Michael Acceptor-inducible Human Aldo-Keto Reduktase AKR1C1 Reduces the α,β -Unsaturated Aldehyde 4-Hydroxy-2-nonenal to 1,4-Dihydroxy-2-nonene**, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, No. 4, 2001, str. 2890-2897
9. Hyndman, D., Bauman, D. R., Heredia, V. V., Penning, T.M.: **The aldo-keto reductase superfamily homepage**, *Chem Biol Interact* 2003 Feb 1; 143-144: str. 621-631
10. Nožinová, E.: **Aktivity redukčních biotransformačních enzymů v játrech hospodářských a laboratorních zvířat (rigorózní práce)**, *Hradec Králové, 2003*
11. Burczynski, M. E., Penning, T. M.: **Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor**, *Cancer Res* 2000 Feb 15;60 (4): str.908-915
12. Wsól, V., Szotáková, B., Skálová, L., Maser, E.: **The novel anticancer drug oracin: different stereospecificity and cooperativity for carbonyl reduction by purified human liver 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1**, *Toxicology* 197 (2004), str. 253-261

13. Holasová, Š., Radilová, H.: **Praktická cvičení z molekulární genetiky**, Hradec Králové, 2005, str. 43-48
14. **QuantiTect™ Probe RT-PCR Handbook**, Aug 2003
15. Ohara et al. 1995, Kawamura et al. 1999, Felsted et al. 1979, Penning et al. 1984
16. Wsól, V., Szotáková, B., Skálová, L., Maser, E.: **Contribution of aldo-keto reductases to the metabolism of the novel anticancer drug oracin in man**, *Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism 12*, (eds) Weiner H., Plapp B., Lindahl R., Maser E., Purdue University Press, West Lafayette, Indiana (2005), str. 249-255