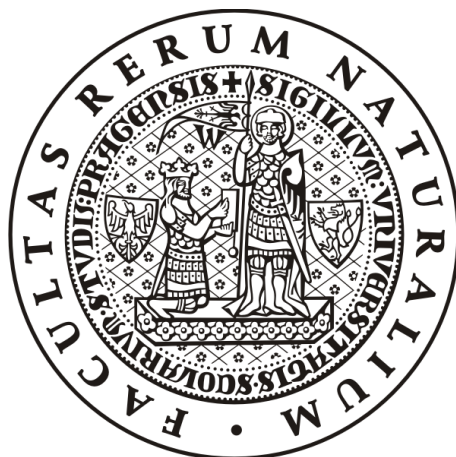


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



# Vliv chemopreventivních látek na cytochromy P450

Autoreferát dizertační práce

RNDr. Jitka Křížková

Školitel: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2010



## Úvod

Podle statistických údajů Světové zdravotnické organizace je rakovina již 50 let celosvětově jednou z hlavních příčin úmrtí v lidské populaci. Rakovina tlustého střeva a konečníku a rakovina gastrointestinálního traktu patří mezi hlavní typy rakovin přispívající k celkové úmrtnosti na rakovinu. Prevence založená na zdravém životním stylu včetně vhodné stravy jsou považovány za jeden z hlavních přístupů, jak dosáhnout snížení rizika rakoviny. V uplynulých letech se významně zvýšila spotřeba a užití potravinových doplňků s obsahem koncentrovaných chemopreventivních fytochemikálií. Flavonoidy, jako nejpopulárnější zástupci této skupiny, jsou přítomny v potravinách (ovoce, zelenina, byliny, nápoje) a v potravinových doplňcích. Je poměrně neznámým faktem, že tyto sloučeniny mohou modulovat aktivitu enzymů metabolizujících cizorodé látky (xenobiotika) [Hodek a kol., 2002].

Z celé řady proteinů reagujících s flavonoidy hrají nejvýznamnější roli právě cytochromy P450 (CYP), monooxygenázy metabolizující xenobiotika (např. léčiva a karcinogeny). Členové podrodiny CYP1A, CYP1A1 a CYP1A2, se účastní aktivace prokarcinogenu, jako jsou například polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy a heterocyklické aminy [Eaton a kol., 1995; Rendic a Di Carlo, 1997]. Vyšší exprese a aktivita CYP1A1 bývá spojována s rizikem rakoviny plic, tlustého střeva a konečníku. CYP1A2 je navíc odpovědný za metabolismus řady často užívaných léčiv, jako jsou fenacetin, kofein, imipramin, a také se účastní aktivace prokarcinogenů. Enzymy podrodiny CYP1A mohou být indukovány aromatickými uhlovodíky. Aktivace se účastní specifický receptor nazývaný Ah receptor. Po navázání indukující látky na tento receptor se tvoří heterodimer s AhR jaderným translokátorem, který se poté váže na „xenobiotický responzivní element“, a tak působí jako zesilovač transkripce příslušných genů [Ortiz de Montellano, 2005].

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) a heterocyklické aminy (HCA) představují dvě skupiny potenciálních karcinogenů aktivovaných podrodinou CYP1A. PAU vznikají během nedokonalého spalování nebo pyrolýzy organických látek a během některých výrobních procesů. Lidé jsou vystavováni PAU různými způsoby. Primární cestou expozice je inhalace znečištěného vzduchu, kouře v důsledku spalování dřeva a cigaretového kouře, a také požití kontaminované vody a potravin, které běžně obsahují mikrogramová množství PAU.

Expozice heterocyklickým aminům v potravě je považována za možnou příčinu vzniku rakoviny u lidí. Tyto látky vznikají celkem běžně během tepelné úpravy červeného masa, drůbeže a ryb [Sinha a kol., 2000]. HCA se tvoří v poměrně vysokých koncentracích kondenzací kreatininu s aminokyselinami. Intenzivně je studována úloha 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridinu (PhIP) a dalších HCA jako možných příčin vzniku rakoviny u lidí, konkrétně rakoviny tlustého střeva a prsu [Snyderwine, 1994; Nagao a kol., 1994]. Molekulární podstata aktivace těchto karcinogenů v organismu však dosud nebyla zcela objasněna, zejména v kontextu jejich interakcí s dalšími xenobiotiky.

## **Cíl dizertační práce**

Cílem předkládané práce je rozšířit současné znalosti o úloze chemopreventivních látek v procesu karcinogeneze. Rostoucí spotřeba potravinových doplňků, které obsahují tyto látky (např. flavonoidy), vyvolává obavy týkající se jejich vedlejších účinků, které nejsou dostatečně známy. Práce se zaměřuje na výzkum účinků chemopreventivních látek, nikoli jako inhibitorů enzymů aktivujících karcinogeny, ale jako induktorů. Mezi jejich opomíjené a málo sledované účinky patří například opakované nebo jednorázové perorální podání, přetrvávání indukce nebo sekvenční expozice organismu chemopreventivním látkám a karcinogenům. Při řešení uvedené problematiky bylo nutné splnit následující úkoly:

- Optimalizovat imunochemickou detekci CYP1A v mikrosomálních vzorcích (játra, tenké střevo) s využitím slepičích protilátek proti CYP1A1 a CYP1A2, a rovněž stanovit specifické aktivity CYP1A1 a CYP1A2 pomocí „markerových“ substrátů.
- Posoudit schopnost zástupců různých skupin chemopreventivních látek po perorálním podání indukovat CYP1A1 a CYP1A2 v játrech a tenkém střevu potkana, což jsou dva hlavní orgány odpovědné za metabolismus xenobiotik, které se podílejí na aktivaci karcinogenů.
- Vyhodnotit příslušné účinky chemopreventivních látek na expresi a specifické aktivity cytochromů P450 v různých časových a dávkovacích režimech.
- Provést sekvenční studii, v rámci které je potkanům nejprve podána indukující chemopreventivní látka a s určitým časovým odstupem indukující nebo neindukující karcinogen, a metodou <sup>32</sup>P-postlabelling vyhodnotit aktivaci karcinogenu na základě tvorby aduktů s DNA.

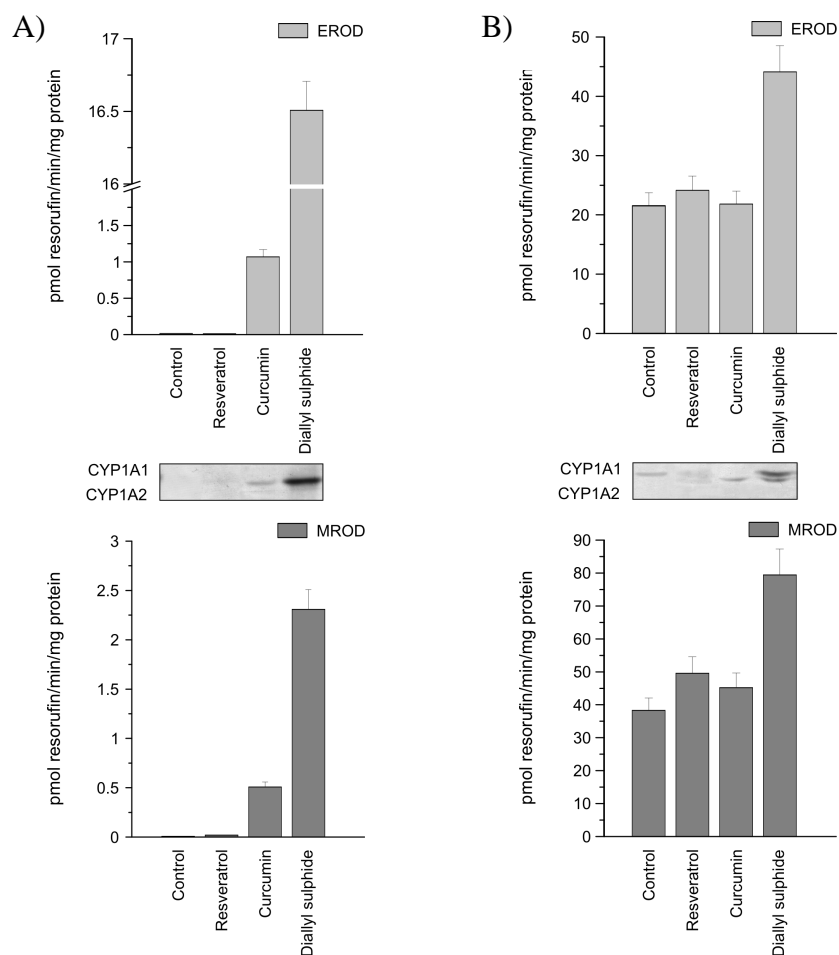
## Výsledky a diskuze

Výzkum byl prováděn z několika pohledů, aby bylo možné co nejdůkladněji posoudit indukční účinky chemopreventivních látek na cytochromy P450 podrodiny 1A. Nejprve byla testována široká škála chemopreventivních látek, jmenovitě kurkuminy, stilbeny, organo-sířičité sloučeniny a flavonoidy. Byla stanovena proteinová exprese a aktivita CYP1A1 a CYP1A2 k posouzení schopnosti chemopreventivních látek, perorálně podávaných potkanům, indukovat CYP1A v játrech a tenkém střevě potkana. Tyto dva orgány jsou hlavními místy metabolismu xenobiotik. Indukční účinky na CYP1A1 a CYP1A2 byly zkoumány v různých časových a dávkovacích režimech pomocí optimalizované metody „Western blotting“ s využitím primárních slepičích protilátek, které byly ošetřeny tak, aby se zabránilo nežádoucím interferencím vlivem keratinového znečištění preparátů, a dále pomocí měření aktivit za použití specifických substrátů 7-ethoxyresorufinu pro CYP1A1 a 7-methoxyresorufinu pro CYP1A2.

$\beta$ -Naftoflavon (BNF), známý induktor podrodiny CYP1A, byl v celé studii použit jako referenční látka. V obou tkáních, v játrech i v tenkém střevě, byla prokázána jeho silná indukční schopnost.  $\beta$ -Naftoflavon proto v celé studii sloužil jako pozitivní kontrola.

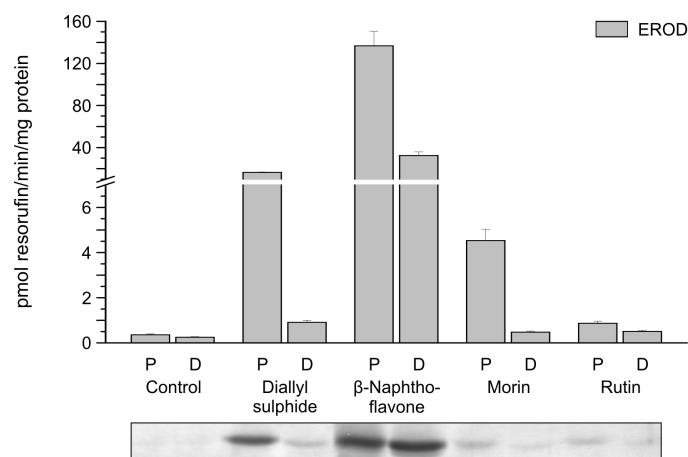
### Režim I

Byly posuzovány indukční účinky široké škály chemopreventivních látek na CYP1A1 a CYP1A2 po pětidenní aplikaci látek gaváží do žaludku. Jak vyplývá z *obrázku 1*, neúčinnějším neflavonoidním induktorem CYP1A1 byl v obou tkáních diallyl sulfid, jenž rovněž indukoval CYP1A2 v játrech. Neúčinnějšími flavonoidními induktory aktivit EROD a MROD a exprese CYP1A byly aglykony flavonoidů:  $\beta$ -naftoflavon, flavon, flavanon, morin.



**Obrázek 1** Vliv podání neflavonoidních látek v tenkém střevě (A) a játrech (B). Aktivita EROD (CYP1A1) a MROD (CYP1A2) byly stanoveny v mikrosomech izolovaných z potkaních jater a proximální části tenkého střeva po vystavení neflavonoidním chemopreventivním látkám (60 mg/kg tělesné hmotnosti) po dobu 5 dní. Imunodetekce CYP1A1/2 byla provedena v játrech a v proximální části tenkého střeva potkana.

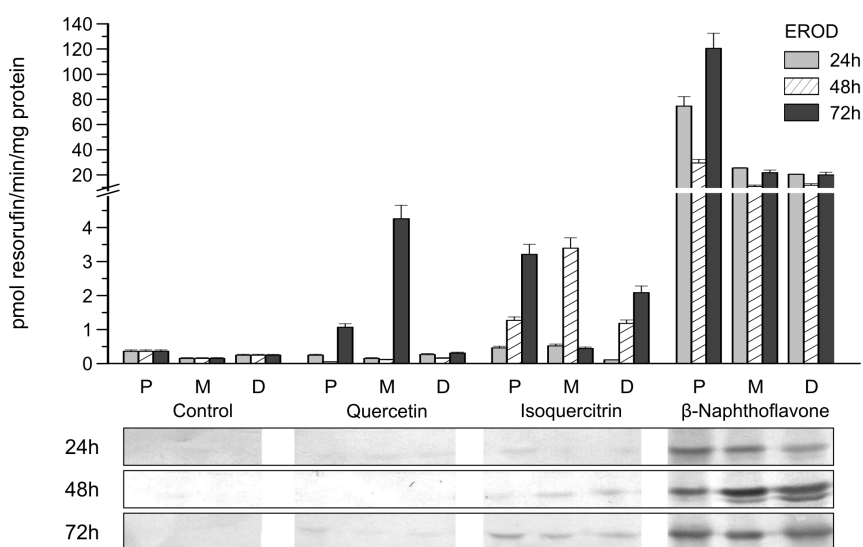
Tenké střevo, jako orgán vysoce exponovaný cizorodým látkám, bylo dále rozděleno na dvě případně tři části. **Obrázek 2** ukazuje, že vyšší exprese a aktivita CYP1A1 byla vždy zjištěna v proximální části tenkého střeva v porovnání s distální částí po podání  $\beta$ -naftoflavonu, morinu a rutinu. Avšak podání quercetinu a isoquercitrinu vedlo k nejvyššímu nárůstu ve střední části tenkého střeva (data neuvedena).



**Obrázek 2** Vliv podání chemopreventivních látek v tenkém střevě. Aktivita EROD (CYP1A1) byla stanovena v proximální (P) a distální (D) části tenkého střeva potkana po vystavení chemopreventivním látkám (60 mg/kg tělesné hmotnosti) po dobu 5 dní. Imunodetekce CYP1A1 byla provedena v proximální a distální části tenkého střeva potkana.

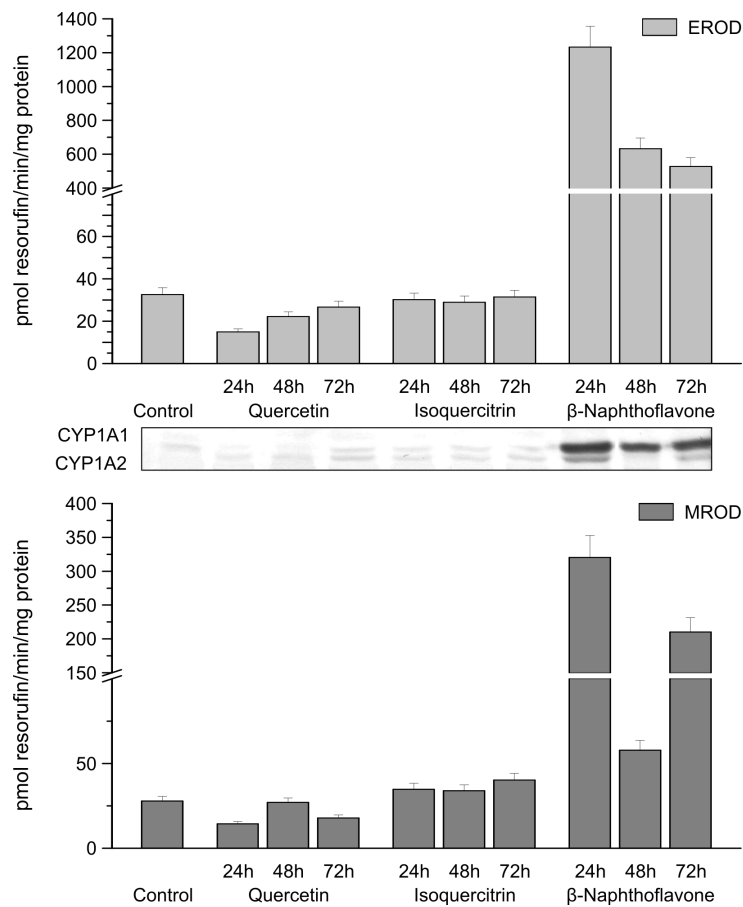
## Režim II

Další část studie byla založena na jednorázovém podání chemopreventivních látek za účelem stanovení jejich indukční schopnosti v nízkých dávkách. Rovněž bylo sledováno přetrvávání zvýšené exprese CYP. Příslušné účinky na expresi a specifické aktivity CYP byly opět hodnoceny v tenkém střevě a játrech potkana 24, 48 a 72 hodin od perorálního podání vybraných látek (*Obr. 3 a Obr. 4*).



**Obrázek 3** Vliv flavonoidů v tenkém střevě v různých intervalech od podání. Aktivita EROD (CYP1A1) byla stanovena v proximální (P), střední (M) a distální (D) části tenkého střeva potkana 24, 48 a 72 hodin od jednorázového podání flavonoidů (60 mg/kg tělesné hmotnosti). Imunodetekce CYP1A1 byla provedena v proximální, střední a distální části tenkého střeva potkana.





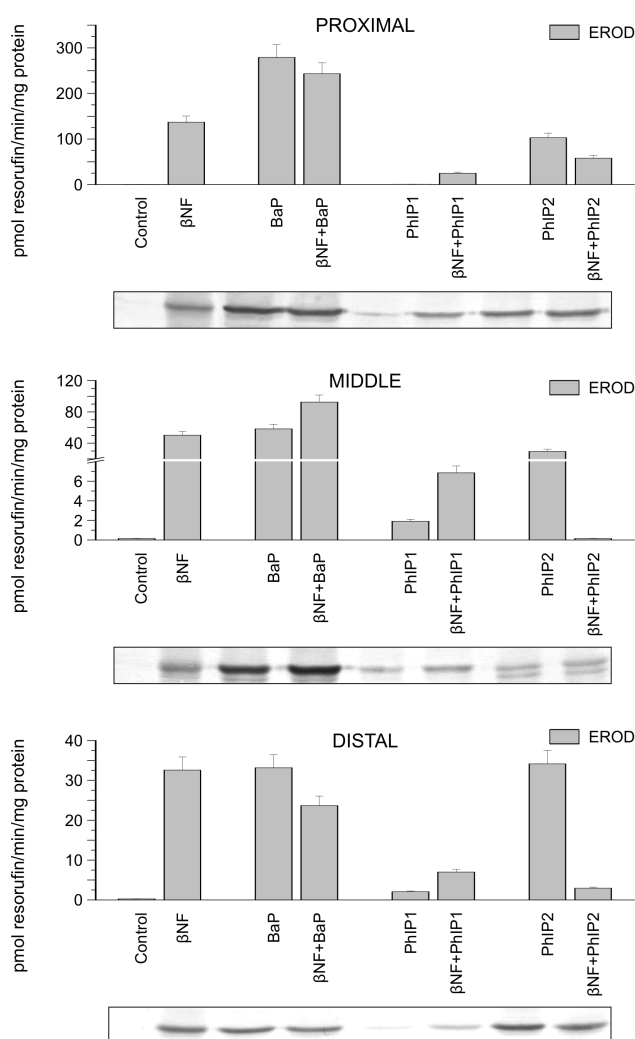
**Obrázek 4** Vliv flavonoidů v játrech v různých intervalech od podání. Aktivita EROD (CYP1A1) byla stanovena v jaterních mikrosomech z potkana 24, 48 a 72 hodin od jednorázového podání flavonoidů (60 mg/kg tělesné hmotnosti). Imunodetekce CYP1A1 byla provedena v jaterních mikrosomech potkana.

Výsledky získané se střevními částmi naznačují významnou roli struktury látky a jejího metabolismu v procesu dostupnosti v organizmu.

### Režim III

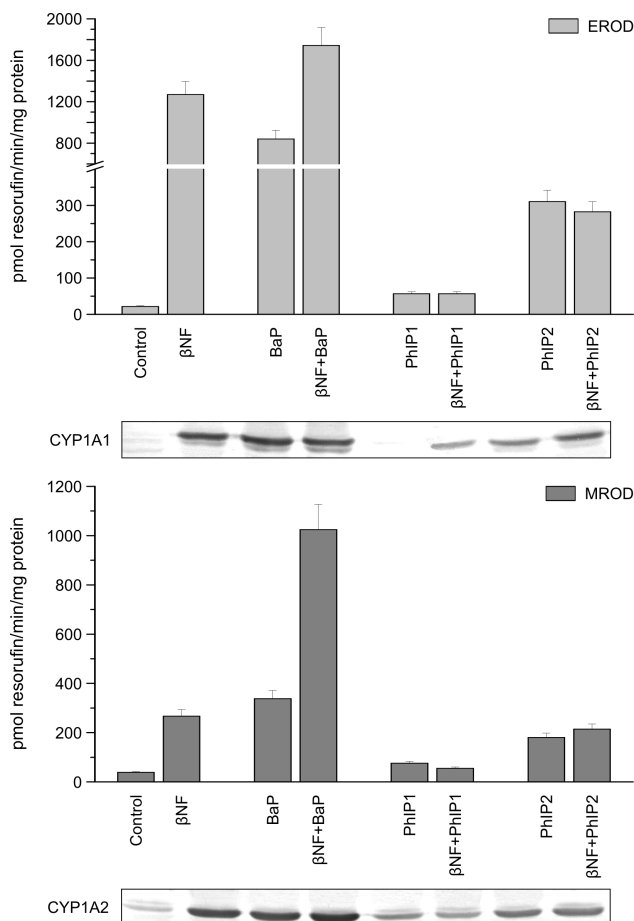
V dalších experimentech byl induktor ( $\beta$ -naftoflavon) a běžně dostupné karcinogeny (benzo[a]pyren nebo PhIP) podávány postupně. Na základě výsledků s  $\beta$ -naftoflavonem ve výše uvedených experimentech byl vybrán interval 72 hodin mezi jednotlivými podáními. Časový odstup byl zvolen tak, aby se zabránilo možné inhibici aktivačních enzymů způsobené přítomností chemopreventivních látek, a zároveň aby indukční efekt stále přetrvával.

Z **obrázku 5** je patrné, že v tenkém střevě vedlo podání  $\beta$ -naftoflavonu ke zvýšení aktivity EROD, a také exprese CYP1A1 ve všech částech tenkého střeva při nízké dávce PhIP (PhIP1, 50 mg/kg). Naopak vysoká dávka PhIP (PhIP2, 150 mg/kg) vedla ke ztrátě aktivity EROD u potkanů premedikovaných  $\beta$ -naftoflavonem, zatímco exprese CYP1A1 se výrazně nezměnila. Podobně jako v případě podání obou látek BNF i PhIP2, kombinace  $\beta$ -naftoflavonu a benzo[a]pyrenu nezvýšila aditivně expresi a aktivitu CYP1A1 ve srovnání s jednotlivě podanými látkami.



**Obrázek 5** Aktivita EROD (CYP1A1) v tenkém střevě. Mikrosomy byly izolovány z proximální, střední a distální části tenkého střeva potkana po vystavení  $\beta$ -naftoflavonu a/nebo karcinogenům. Imunodetekce CYP1A1 byla provedena v proximální, střední a distální části tenkého střeva potkana.

V játrech (**Obr. 6**) kombinace  $\beta$ -naftoflavonu a benzo[a]pyrenu vedla k značnému zvýšení aktivity EROD a MROD ve srovnání s jednotlivě podanými látkami, zejména u CYP1A2. Toto naznačuje potenciální synergický efekt obou těchto látek. Podobně, jako v případě tenkého střeva, nebyl pozorován žádný výrazný efekt po podání  $\beta$ -naftoflavonu v kombinaci s PhIP.



**Obrázek 6** Aktivita EROD (CYP1A1) a aktivita MROD (CYP1A2) v játrech. Mikrosomy byly izolovány z jater potkana po vystavení  $\beta$ -naftoflavonu a/nebo karcinogenům. Imunodetekce CYP1A1 a CYP1A2 byla provedena v jaterních mikrosomech potkana.

Tvorba aduktů karcinogenů s DNA se obecně považuje za důležitý genotoxický krok v procesu iniciace karcinogeneze. Proto je množství aduktů karcinogenů s DNA dalším markerem pro posuzování rizika vzniku rakoviny. Oba karcinogeny, benzo[a]pyren a PhIP, jsou přeměňovány *in vivo*, což vede k jejich aktivaci a/nebo detoxikaci. Množství aduktů BaP s DNA se podařilo stanovit metodou  $^{32}\text{P}$ -postlabelling v proximální a distální části tenkého střeva (**Tab. 1**). Premedikace  $\beta$ -naftoflavonu výrazně zvýšila množství aduktu 1 BaP

s DNA (adukt tvořený z 9-hydroxy-BaP) v proximální části tenkého střeva. Celkové množství aduktů BaP s DNA v proximální části je téměř dvakrát vyšší než v distální části. Toto zjištění je v souladu s vyšší expresí CYP v proximální části tenkého střeva ve srovnání s distální částí, která byla zjištěna jak imunochemicky, tak měřením aktivity příslušných CYP.

**Tabulka 1** Množství aduktů benzo[a]pyrenu s DNA.

| Vzorek DNA          | RAL/10 <sup>8</sup> nukleotidů |          |          |        |
|---------------------|--------------------------------|----------|----------|--------|
|                     | Skvrna 1                       | Skvrna 2 | Skvrna 3 | Celkem |
| část tenkého střeva |                                |          |          |        |
| BaP proximalní      | 3,85                           | 2,82     | 4,39     | 11,06  |
| βNF+BaP proximalní  | 5,15                           | 2,97     | 3,96     | 12,08  |
| BaP distální        | 4,40                           | 1,56     | 1,64     | 7,60   |
| βNF+BaP distální    | 4,02                           | 1,85     | 2,46     | 8,33   |

β-Naftoflavin a/nebo benzo[a]pyren byly podány potkanům a v proximální a distální části tenkého střeva byly stanoveny adukty s DNA. RAL, „relative adduct labelling“

*Skvrna 1 – adukt tvořený z 9-hydroxy-BaP*

*Skvrna 2 - hlavní dGp adukt (dG-N<sup>2</sup>-BPDE)*

*Skvrna 3 – neidentifikovaný adukt*

Hodnoty získané metodou <sup>32</sup>P-postlabelling velmi dobře odpovídají výsledkům imunodetekce a měřením specifických aktivit, kdy premedikace β-naftoflavonem nezvýšila významně žádné sledované hodnoty oproti samotnému podání BaP. Benzo[a]pyren je známý jako silný induktor podrodiny CYP1A, proto je možné, že již po podání samotného BaP nebo BNF bylo dosaženo maximální hladiny indukce.

Adukty PhIP s DNA budou v nejbližší době stanoveny nově vyvíjenou technikou kapalinové chromatografie s přepínáním kolon ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií [Singh a kol., 2010].

*Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (305/09/H008), Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MSM 0021620808) a dále Grantové agentury Univerzity Karlovy (4909).*

## Použitá literatura

Eaton D. L., Gallagher E. P., Bammler T. K., Kunze K. L. (1995): Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity, *Pharmacogenetics*, 5, 259-274.

Hodek P., Trefil P., Stiborová M. (2002): Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450, *Chem Biol Interact*, 139, 1-21.

Nagao M., Ushijima T., Wakabayashi K., Ochiai M., Kushida H., Sugimura T., Hasegawa R., Shirai T., Ito N. (1994): Dietary carcinogens and mammary carcinogenesis. Induction of rat mammary carcinomas by administration of heterocyclic amines in cooked foods, *Cancer*, 74, 1063-1069.

Ortiz de Montellano P. R. (ed.) (2005): Cytochrome P-450: Structure, Mechanism and Biochemistry. Third edition, Plenum Publishers, New York

Rendic S., Di Carlo F. J. (1997): Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors, *Drug Metab Rev*, 29, 413-580.

Singh R., Arlt V. M., Henderson C. J., Phillips D. H., Farmer P. B., Gamboa da Costa G. (2010): Detection and quantitation of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine adducts in DNA using online column-switching liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 878, 2155-2162.

Sinha R., Gustafson D. R., Kulldorff M., Wen W. Q., Cerhan J. R., Zheng W. (2000): 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, a carcinogen in high-temperature-cooked meat, and breast cancer risk, *J Natl Cancer Inst*, 92, 1352-1354.

Snyderwine E. G. (1994): Some perspectives on the nutritional aspects of breast cancer research. Food-derived heterocyclic amines as etiologic agents in human mammary cancer, *Cancer*, 74, 1070-1077.

## **Seznam publikací**

### *Původní práce*

Petr Hodek, Pavel Hanuštiak, **Jitka Křížková**, Radka Mikelová, Soňa Křížková, Marie Stiborová, Libuše Trnková, Aleš Horna, Miroslava Beklová, René Kizek (2006): Toxicological aspects of flavonoid interaction with biomacromolecules, *Neuroendocrinol Lett*, 27, 14-17. **IF = 0.924**

**Jitka Křížková**, Kamila Burdová, Petr Hodek, René Kizek, Marie Stiborová (2007): Effects of a flavonoid structure on cytochromes P450 induction, *Chem Listy*, 101, 206-208. **IF = 0.683**

**Jitka Křížková**, Kamila Burdová, Jiří Hudeček, Marie Stiborová, Petr Hodek (2008): Induction of cytochromes P450 in small intestine by chemopreventive compounds, *Neuroendocrinol Lett*, 29, 717-721. **IF = 1.359**

Petr Hodek, **Jitka Křížková**, Kamila Burdová, Miroslav Šulc, René Kizek, Jiří Hudeček, Marie Stiborová (2009): Chemopreventive compounds—View from the other side, *Chem Biol Interact*, 180, 1-9. **IF = 2.457**

Petr Hodek, Martina Teplá, **Jitka Křížková**, Marie Stiborová (2009): Modulation of cytochrome P450 enzyme system by selected flavonoids, *Neuroendocrinol Lett*, 30, 67-71. **IF = 1.047**

**Jitka Křížková**, Kamila Burdová, Marie Stiborová, Vladimír Křen, Petr Hodek (2009): The effects of selected flavonoids on cytochromes P450 in rat liver and small intestine, *Interdisc Toxicol*, 2, 201-204. **Dosud bez IF**

### *Manuskript v přípravě*

**Jitka Křížková**, Petr Hodek, Miroslav Šulc: Chicken antibodies in Western blots: How to avoid potential keratin cross-reactivity