

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Bc. Petra Valášková

Studium metabolismu 17 α -ethinylestradiolu cytochromy P450

Study of the metabolism of 17 α -ethinylestradiol by cytochromes P450

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: **RNDr. Věra Černá, Ph.D.**

Konzultant: RNDr. Lucie Bořek-Dohalská, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením školitelky **RNDr. Věry Černé, Ph.D.** a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 08. 08. 2014

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce **RNDr. Věře Černé, Ph.D.** za zadání zajímavého tématu, za cenné odborné rady při sepisování této práce a za čas, který mi během spolupráce věnovala. Mé poděkování patří i **RNDr. Lucii Bořek-Dohalské, Ph.D.** za všestrannou pomoc při experimentální části práce, cenné připomínky a ochotu zodpovědět mé dotazy.

Děkuji RNDr. Tereze Vojtové (roz. Tylové), Ph.D. za možnost měření na UPLC/MS a RNDr. Kateřině Svobodové, Ph.D. za poskytnutí houbových kultur. Za provedení hmotnostní analýzy děkuji doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D.

Dále mé poděkování patří Prof. Dr. Joachimowi Wegenerovi z Univerzity v Regensburgu a všem ostatním, kteří mě během mého studia podporovali.

Obsah

OBSAH	4
ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1 ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY	11
1.1 ENDOKRINNĚ DISRUPTIVNÍ LÁTKY	11
1.1.1 <i>Estrogeny a sloučeniny s estrogením účinkem</i>	12
1.1.1.1 Účinky estrogenních EDC na lidský organismus	14
1.1.2 <i>Syntetický 17α-ethinylestradiol</i>	14
1.1.2.1 Možnosti přeměny 17 α -ethinyestradiolu	16
1.1.2.2 Metabolismus 17 α -ethinylestradiolu v lidském organismu	19
1.2 CYTOCHROMY P450.....	20
1.2.1 <i>Katalytický mechanismus cytochromů P450</i>	23
1.2.1.1 Modulace aktivity cytochromů P450	24
1.2.2 <i>Systém cytochromů P450 v buňkách hub</i>	24
1.2.3 <i>Cytochromy P450 a metabolismus 17α-ethinylestradiolu u savců</i>	26
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	28
3 MATERIÁL	29
3.1 MATERIÁL A CHEMIKÁLIE	29
3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	30
4 METODY	33
4.1 STUDIUM METABOLISMU 17A-ETHINYLESTRADIOLU MODELOVÝM ORGANISMEM <i>P. OSTREATUS</i>	33
4.1.1 <i>Příprava kultivačního média a inokula houby P. ostreatus</i>	33
4.1.2 <i>Degradace 17α-ethinylestradiolu houbou P. ostreatus in vivo</i>	33
4.1.3 <i>Extrakce kultivačního média P. ostreatus</i>	34
4.1.4 <i>Identifikace metabolitů</i>	35

4.2 STUDIUM DEGRADAČNÍHO POTENCIÁLU MIKROSOMÁLNÍ FRAKCE HOUBY <i>P. OSTREATUS</i>	35
4.2.1 Kultivace <i>P. ostreatus</i>	35
4.2.2 Izolace mikrosomální frakce	35
4.2.3 Stanovení koncentrace proteinů	36
4.2.4 Stanovení koncentrace cytochromu P450	37
4.2.5 Degradace 17 α -ethinylestradiolu mikrosomální frakcí houby <i>P. ostreatus</i>	37
4.2.5.1 Degradace 17 α -ethinylestradiolu mikrosomální frakcí <i>P. ostreatus</i> v přítomnosti kumen hydroperoxidu	38
4.3 STUDIUM METABOLISMU 17 α -ETHINYLESTRADIOLU MIKROSOMÁLNÍM SYSTÉMEM LABORATORNÍHO POTKANA	39
4.3.1 Identifikace metabolitů 17 α -ethinylestradiolu UPLC-MS	40
4.3.2 Určení isoform cytochromů P450 zodpovědných za metabolismus 17 α -ethinylestradiolu	41
4.3.3 Metabolismus 17 α -ethinylestradiolu potkaními rekombinantními cytochromy P450 v Supersomech TM	43
4.3.4 Separace metabolitů 17 α -ethinylestradiolu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)	44
4.4 STUDIUM VLIVU 17 α -ETHINYLESTRADIOLU NA METABOLISMUS VYBRANÝCH PŘIROZENÝCH HORMONŮ	44
4.4.1 Vliv 17 α -ethinylestradiolu na metabolismus testosteronu	44
4.4.2 Vliv 17 α -ethinylestradiolu na metabolismus progesteronu	45
4.4.3 Separace metabolitů testosteronu a progesteronu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)	46
5 VÝSLEDKY	48
5.1 STUDIUM METABOLISMU 17 α -ETHINYLESTRADIOLU MODELOVÝM ORGANISMEM <i>P. OSTREATUS</i>	48
5.1.1 Degradace 17 α -ethinylestradiolu <i>in vivo</i>	48
5.1.2 Identifikace metabolitu	50
5.1.3 Degradace 17 α -ethinylestradiolu <i>in vitro</i>	51
5.1.3.1 Degradace 17 α -ethinylestradiolu <i>in vitro</i> a vliv kumen hydroperoxidu	53

5.2 STUDIUM METABOLISMU 17A-ETHINYLESTRADIOLU MIKROSOMÁLNÍM SYSTÉMEM LABORATORNÍHO POTKANA	54
5.2.1 Identifikace metabolitů 17 α -ethinylestradiolu systémem UPLC-MS.....	56
5.2.2 Časová závislost přeměny 17 α -ethinylestradiolu cytochromy P450 potkaních mikrosomů.....	58
5.2.3 Určení Km přeměny 17 α -ethinylestradiolu	60
5.2.4 Identifikace isoform cytochromů P450 zodpovědných za metabolismus 17 α -ethinylestradiolu.....	61
5.2.4.1 Vliv induktorů cytochromů P450 na metabolismus 17 α -ethinylestradiolu .	61
5.2.4.2 Vliv inhibitorů cytochromů P450 na metabolismus 17 α -ethinylestradiolu .	62
5.2.4.3 Oxidace 17 α -ethinylestradiolu potkaními rekombinantními cytochromy P450 Supersomálního TM systému	65
5.3 STUDIUM VLIVU 17A-ETHINYLESTRADIOLU NA METABOLISMUS PŘIROZENÝCH HORMONŮ	66
5.3.1 Vliv 17 α -ethinylestradiolu na metabolismus testosteronu.....	66
5.3.2 Vliv 17 α -ethinylestradiolu na metabolismus progesteronu	67
6 DISKUZE	68
7 SOUHRN	74
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	75

Abstrakt

Syntetický estrogen 17 α -ethinylestradiol (EE2) je hlavní aktivní složkou hormonálních antikoncepčních přípravků. S rostoucí spotřebou hormonální antikoncepce ovšem stoupá riziko zpětného negativního působení EE2 na živé organismy. EE2 je velmi účinný tzv. endokrinní disruptor, což je látka, která svým účinkem napodobuje přirozené hormony. Detailní studium transformace této látky *in vivo* a *in vitro* může přispět k porozumění jeho negativních účinků. Předkládaná diplomová práce se proto zabývá studiem metabolismu EE2 u vybraných modelových organismů.

Ligninolýtická houba *Pleurotus ostreatus* patří mezi organismy mající slibné biodegradační schopnosti vůči mnoha polutantům. Proto byla studována degradace EE2 v souvislosti s možností odstranění této látky ze životního prostředí. EE2 byl degradován houbou *P. ostreatus in vivo* za vzniku jednoho hydroxylovaného metabolitu, jehož estrogenní aktivita je předmětem další studie. *In vitro* studie byly prováděny s mikrosomální frakcí izolovanou z mycelia této houby. Přeměna EE2 pomocí CYP závislých na NADPH nebyla prokázána, ovšem za použití KHP jako kofaktoru byl nalezen metabolit EE2, poukazující na možnou peroxidasovou aktivitu mikrosomálních enzymů. Druhý modelový organismus, laboratorní potkan, se jeví jako vhodný model pro studium metabolismu EE2 v lidském organismu. Předmětem této části práce bylo ověření zapojení cytochromů P450 do metabolismu EE2 a určení konkrétních isoformů zodpovědných za přeměnu EE2 použitím specifických induktorů/inhibitorů CYP a potkaních rekombinantních systémů. Metabolity EE2 byly separovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a identifikovány hmotnostní spektrometrií. CYP potkaních jaterních mikrosomů katalyzovaly oxidaci EE2 na dva hydroxylované deriváty. Mikrosomy premedikované induktory CYP podrodin 2B, 2C, 2E a 3A byly zapojeny do přeměny EE2. Inhibiční studie potvrdily roli CYP2E, 2B a 3A v metabolismu EE2 a potkaní rekombinantní systémy poukázaly i na zapojení CYP2A. Sledován byl dále i možný vliv EE2 na metabolismus dvou přirozených hormonů, testosteronu a progesteronu. Výsledky ukazují, že EE2 může působit jako inhibitor aktivity CYP3A a 2C *in vitro*, zatímco jeho metabolity mohou modulovat aktivitu CYP2C. Získané výsledky přispívají k poznání transformace EE2 *in vitro*.

Klíčová slova: 17 α -ethinylestradiol, Cytochromy P450, Endokrinní disruptor, *Pleurotus ostreatus*, Laboratorní potkan, Mikrosomální frakce, Metabolismus

Abstract

A synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol (EE2) is the main active component of the hormonal contraceptive pills. The rise of consumption of hormonal contraceptives has increased the risk of the back negative effects of EE2 to aquatic organisms. EE2 belongs to the endocrine disruptive compounds known for mimicking natural hormones. A more detailed examination of the transformation of this compound *in vivo* and *in vitro* can contribute to a better understanding of its negative effects. This master thesis is therefore devoted to the study of the metabolism of EE2 in two selected model organisms.

The ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* is the type of fungi with promising biodegradation ability to a lot of pollutants. These properties have led to numerous studies of the degradation potential of *P. ostreatus* towards EE2, with the possibility of removing this compound from the environment. EE2 has been degraded by the fungus *P. ostreatus in vivo* resulting in one hydroxylated metabolite, which estrogenic activity is in need for further study. *In vitro* studies were carried out with a microsomal fraction isolated from the mycelium of this fungus. The conversion of EE2 *in vitro* via CYPs dependent on NADPH has not been demonstrated, however using KHP as a cofactor, there was one metabolite of EE2 found, suggesting a possible peroxidase activity of microsomal enzymes.

The second approach uses laboratory rat as a model for EE2 metabolism in human body. The object of this part of thesis was to verify the involvement of CYP in the metabolism of EE2 and determine the specific isoforms using specific inducers/inhibitors of CYP and rat recombinant systems. Metabolites of EE2 were separated using high pressure-liquid chromatography and identified by mass spectrometry. Rat hepatic microsomes metabolized EE2 to two hydroxylated EE2 derivatives. Microsomes premedicated by inductors of CYP2B, 2C, 2E and 3A were efficient in the transformation of EE2. Studies with the inhibitors confirmed the role of CYP2E, 2B and 3A in the EE2 metabolism and rat recombinant CYPs showed on the role of CYP2A. Furthermore, a possible influence of EE2 on the metabolism of two natural hormones, progesterone and testosterone, was monitored. Results show that EE2 itself inhibits CYP3A and 2C activity, while its metabolites could modulate the activity of CYP2C. These obtained results are useful for understanding the transformation of EE2.

Keywords: 17 α -ethinylestradiol, Cytochrome P450, Endocrine disruptor, *Pleurotus ostreatus*, Laboratory rat, Metabolism (**In Czech**)

Seznam použitých zkratek

1-ABT	1-aminobenzotriazol
x-OH EE2	minoritní hydroxylovaný metabolit ethinylestradiolu
y-OH EE2	majoritní hydroxylovaný metabolit ethinylestradiolu
α -NF	α -naftoflavon
ACN	acetonitril
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	bovine serum albumin; hovězí sérový albumin
CYP	cytochromy P450
ČOV	čistička odpadních vod
DDTC	diethyldithiokarbamát
DHB	dihydroxy benzeová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
EDc	endocrine-disrupting compounds; endokrinně disruptivní látky
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
E2	17 β -estradiol
EE2	17 α -ethinylestradiol
ESI	ionizace elektrosprejem
EtOH	ethanol
ETDC	3-ethynil-3a,6,7-trimethyl-2,3,3a,4,5,5a,8,9,9a,9b-dekahydro-1H-cyklopentan[a]naftalen-3-ol
HPLC	high-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KHP	kumen hydroperoxid
KK	ketokonazol
MEG	malt-extrakt glukosa
Met 1	hydroxylovaný metabolit vytvořený <i>P. ostreatus in vivo</i>
Mx, My, Mz	metabolity vytvořené MF laboratorního potkana
MF	mikrosomální frakce
MF _{EE2}	mikrosomální frakce exponovaná EE2

MF _K	mikrosomální frakce kontrolní
MS	hmotnostní spektrometrie
NAD (H)	nikotinamid adenin dinukleotid (redukováná forma)
NADP(H)	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (redukováná forma)
NADPH-GS	NADPH generující systém
NALDI	Nanostructure Laser Desorption-Ionization, ionizace nanočásticemi
p.a.	pro analýzu
PA	fenacetin
PB	fenobarbital
PBi	piperonyl butoxid
PCN	pregnenolon-16 α -karbonitril
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
Prg	progesteron
RPM	rotations per minute; otáčky za minutu
ToF	Time of Flight, analyzátor doby letu
Tst	testosteron
UPLC	ultra-performance liquid chromatography, ultraúčinná kapalinová chromatografie
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem

1 Úvod a přehled literatury

Výzkum a dlouhodobý vývoj nových syntetických látek je v současné době prioritou mnoha laboratoří po celém světě. Uměle vytvořená léčiva jsou v dnešní klinické praxi hojně využívána a v poslední době rostou obavy ohledně důsledků této masivní spotřeby farmaceutických výrobků ¹. Po jejich vyloučení z lidského organismu dochází k hromadění v životním prostředí a tyto nahromaděné kontaminanty mohou následně ovlivňovat život dalších organismů. Z mnoha syntetických látek, které byly do životního prostředí uvolněny, se v posledních letech výzkumy zaměřují na sloučeniny, které napodobují účinky endogenních hormonů a tím mění funkci endokrinního systému ². Do této skupiny látek označovaných jako endokrinní disruptory (z angl. EDC) patří nonylfenol, bisfenol A, některé pesticidy, estrogeny a další sloučeniny s estrogení aktivitou ³.

1.1 Endokrinně disruptivní látky

Endokrinně disruptivní látky lze definovat jako látky, které ovlivňují syntézu, sekreci, transport, vazbu a účinek přirozených hormonů, které jsou v těle zodpovědné za udržování vnitřního prostředí, reprodukci, vývoj a/nebo chování živočichů ⁴⁻⁵. To má za následek napodobení nebo zastavení účinku přirozeného hormonu, změnu hladiny hormonu či přímou účast na jeho syntéze ⁶ i při velmi nízké koncentraci EDC v řádech ng. l⁻¹ ⁷⁻⁸. Tato extrémně nízká koncentrace, která je často nižší než koncentrace, která se projevuje toxicitou, je analogická s velmi nízkou koncentrací hormonů v krvi, vyvolávající minimální změnu postačující k regulaci orgánů ⁹.

Mezi negativní vlivy, které byly prokázány u organismů vystavených účinkům EDC, patří neplodnost, narušení činnosti endokrinních žláz s vnitřní sekrecí, zvýšené riziko rakoviny, ovlivnění vývoje plodu, feminizace samců aj. ¹⁰. Kromě toho dlouhodobá přítomnost EDC v prostředí má za následek zvýšené riziko hromadění v tělech vodních živočichů ¹¹. Poslední studie poukazují i na skutečnost, že EDC mohou působit toxicky na fytoplankton, což má negativní dopad na produkci kyslíku, koloběh a dostupnost živin pro vyšší organismy závislé na fytoplanktonu ¹². Jelikož i stopové koncentrace EDC v životním prostředí mohou mít významný dopad na živé organismy, je sledování výskytu, transportu a účinků EDC prioritou stále více environmentálních studií ⁵.

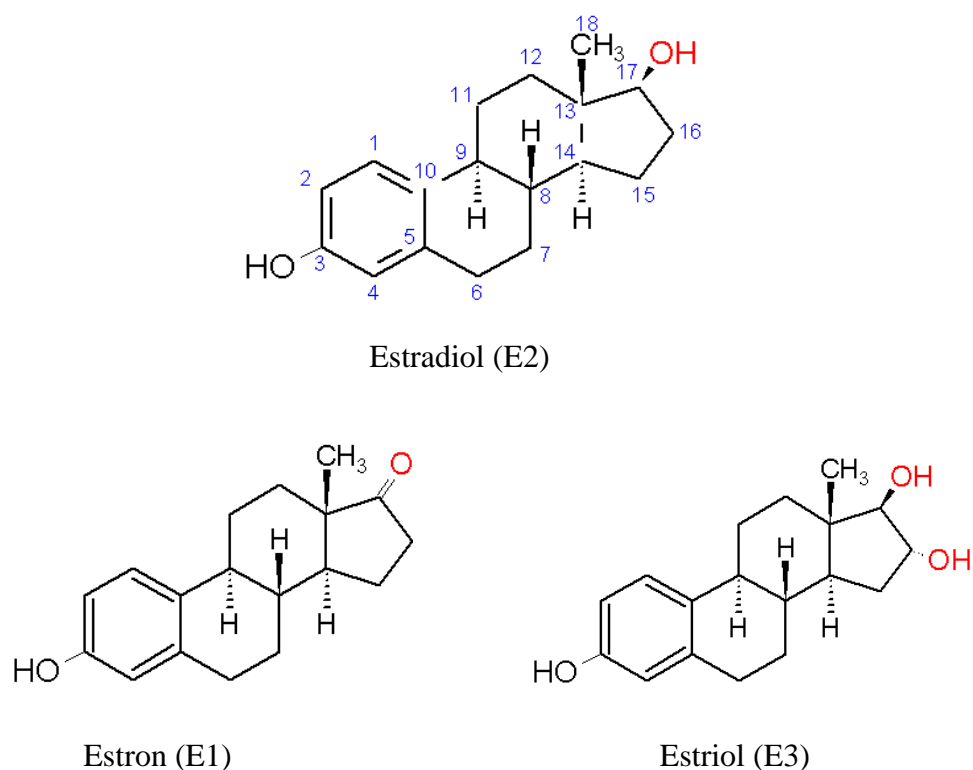
Edc můžeme rozdělit do dvou základních skupin, na přirozené a na syntetické. Detailněji je můžeme klasifikovat podle jejich původu na přirozené a exogenní hormony (např. fytoestrogeny, pohlavní hormony, 17 α -ethinylestradiol), léky s vedlejším hormonálním účinkem (naproxen, metoprolol aj.), průmyslové a běžné chemikálie (ftaláty, alkylované detergenty, změkčovadla, rozpouštědla, polychlorované bisfenoly) a vedlejší produkty průmyslových procesů (zejména dioxiny a polycyklické aromatické uhlovodíky). V současné době je zhruba 38 000 látek považováno za možné EDC a mnoho dalších je testováno^{10,13}. Velká pozornost je kladena studiu EDC s estrogením účinkem, které znečišťují vodní ekosystém. Do odpadní vody se tyto látky dostávají z lidské moči¹⁴, prostředků pro osobní hygienu, kosmetických přípravků aj. Významným zdrojem EDC s estrogením účinkem jsou též odpady z chovu hospodářských zvířat¹⁵⁻¹⁶.

1.1.1 Estrogeny a sloučeniny s estrogením účinkem

Estrogeny jsou zodpovědné za regulaci mnoha důležitých biologických funkcí napříč živočišnými druhy. Kromě toho, že se podílejí na reprodukci¹⁷⁻¹⁸, mají vliv i na prevenci před srdečními chorobami¹⁹, vznikem roztroušené sklerózy²⁰ a některými neurodegenerativními onemocněními²¹. Dále se podílí na metabolismu tuků²², ovlivňují chuť k jídlu²³ a hrají roli při autoimunitní reakci²⁴ či v procesu vzniku schizofrenie²⁵. Některé studie uvádějí jejich roli při vzniku osteoartrózy²⁶ a karcinomu prsu²⁷.

Ve své struktuře estrogeny obsahují aromatický kruh mající velkou afinitu k estrogením receptorům. Dále mají dva cyklohexanové kruhy a jeden kruh cyklopentanový²⁸. Mezi nejdůležitější zástupce přirozených estrogenů patří estron (E1), 17 β -estradiol (E2) a estriol (E3). Uvedené estrogeny jsou zobrazeny na Obr. 1, str. 13.

Mechanismus účinku estrogenů je dobře prostudován. Tyto látky se nejčastěji vážají na specifické intracelulární estrogení receptory, které jsou dvojího typu, označované jako α a β . Po jejich vazbě dochází k dimerizaci receptoru a následné translokaci do buněčného jádra. To má za následek modulaci transkripce klíčových genů, které mají ve svém promotoru oblasti specifické vůči působení receptoru. Z literatury jsou známé studie, které poukazují na to, že zmíněné receptory mohou ovlivňovat i expresi genů, které neobsahují tyto oblasti²⁹⁻³¹.



Obr. 1: Vybrané struktury estrogenů. U estradiolu je modře vyznačeno číslování skeletu, červeně jsou označeny funkční skupiny konkrétních estrogenů. Vytvořeno v programu ChemSketch.

Katabolismus estrogenů je předmětem mnoha studií zejména v souvislosti se znečištěním odpadních vod. Metabolismus zahrnuje zejména hydroxylaci na různých pozicích steroidního kruhu, nejčastěji v pozicích 2, 4 a 16³². Hydroxylová skupina pak může být sulfatována, methylována či konjugována s kyselinou glukuronovou³³. Konjugované estrogены nejsou již biologicky aktivní a jsou částečně rozpustné ve vodě³⁴. Tyto konjugáty však mohou být již během samotného procesu čištění odpadních vod a posléze při kontaktu s aktivovaným kalem zpětně převedeny na aktivní estrogény. Štěpení vazeb konjugátů je katalyzováno enzymy β -glukuronidasami bakterií přítomných v aktivovaném kalu (např. *Escherichia coli*). Tato reakce je nevratná a má za následek hromadění volných estrogenů, které znečišťují životní prostředí³⁵⁻³⁶.

1.1.1.1 Účinky estrogenních EDC na lidský organismus

Zvyšující se kontaminace životního prostředí EDC s estrogenním účinkem bývá dávána do souvislosti s narůstajícím výskytem vývojových poruch v lidském organismu³⁷⁻³⁸. Ohroženy jsou zejména cílové tkáně plodu, kdy může docházet ke vzniku různých abnormalit³⁸⁻³⁹. V literatuře lze nalézt i studie, které poukazují na skutečnost, že příčinnou postupného poklesu produkce spermií u lidské populace na různých místech světa je právě expozice estrogenním EDC⁴⁰⁻⁴¹. Při pokusech s potkany byla testikulární toxicita, která způsobuje narušení spermatogeneze, dokonce jednoznačně prokázána. Analogické účinky lze tedy očekávat i u člověka, nutno ale podotknout, že detailní znalosti vlivu EDC s estrogenním účinkem na lidské zdraví je zatím velice málo⁴⁰, jelikož obecný mechanismus účinku EDC na hormonální metabolismus nebyl zatím plně vysvětlen. Předpokládá se, že EDC se váží na estrogenní receptory, kde pak vyvolávají odezvu, která může být jiná, než při vazbě endogenního hormonu. Receptory mohou poté chemicky aktivovat nebo inaktivovat, měnit tedy svojí vazbou přirozený metabolismus⁴².

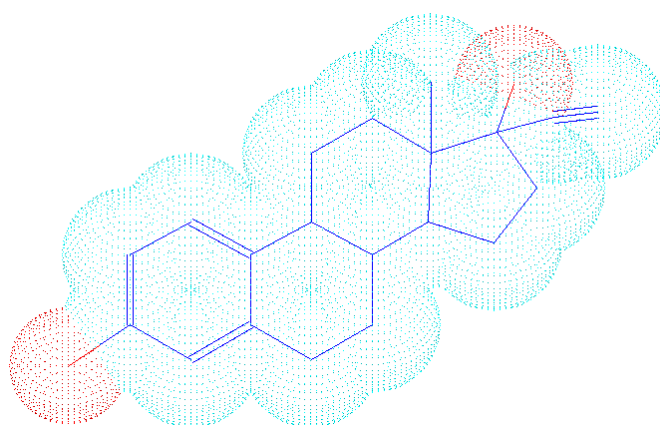
1.1.2 Syntetický 17 α -ethinylestradiol

V poslední době je kladena velká pozornost syntetickému estrogenu 17 α -ethinylestradiolu (EE2) v souvislosti právě s negativním vlivem na životní prostředí. EE2 je derivát přirozeného hormonu 17 β -estradiolu a je hlavní aktivní složkou hormonální antikoncepce (kombinovaná perorální antikoncepce), jehož přítomnost zajišťuje optimální stabilitu a funkčnost preparátu⁴³⁻⁴⁴. Tato forma antikoncepce je nejrozšířenější v Evropě a Severní Americe⁴⁵. Ve studii z roku 2010 byl EE2, jakožto aktivní farmaceutická složka, součástí pěti přípravků, které patřily mezi 200 nejprodávanějších léků v USA⁴⁶. Kromě antikoncepce je tento syntetický hormon používán i při hormonální substituční léčbě osteoporózy, menstruačních poruch a rakoviny prostaty⁴⁷.

EE2 jako účinný endokrinní disruptor může svým účinkem napodobovat endogenní hormony a tím měnit jejich metabolismus⁴⁸⁻⁴⁹. Nezávislé laboratoře a instituce po celém světě (např. Národní centrum pro toxikologický výzkum) označily EE2 jakožto nejúčinnější estrogenní disruptor⁴⁷.

Organismy jsou vystaveny působení EE2 v prostředí ve kterém žijí, či se s touto látkou setkají skrze potravní řetězec⁵⁰⁻⁵¹. Ve vodním ekosystému byl EE2 detekován v různých koncentracích (5,7–30,8 ng. l⁻¹) a jeho výskyt byl potvrzen nejen v odpadních, ale i v povrchových vodách, v některých řekách a dokonce i v pitné vodě. Nejvíce znečištěné oblasti se nacházejí v Číně, kde koncentrace EE2 ve vodních tocích dosahuje až 30,8 ng. l⁻¹⁵². V USA se můžeme setkat s hodnotami kolem 4,7 ng. l⁻¹⁵³. Nezanedbatelné koncentrace EE2 byly detekovány v odtocích čističek odpadních vod (ČOV) ve Švédsku (4,5 ng. l⁻¹) a ve Velké Británii (7 ng. l⁻¹)⁴⁴. Právě díky nedostatečnému čištění odpadních vod jsou tyto odtoky hlavním zdrojem EE2 a estrogenních sloučenin obecně⁵⁴⁻⁵⁵. Mnoho studií uvádí, že u některých vodních živočichů se může negativní vliv EE2 projevit už při koncentraci kolem 1 ng. l⁻¹^{44,56-57}. Jedním z těchto negativních vlivů je feminizace samců ryb, která může vést až k selhání reprodukčních schopností. Dalším důsledkem expozice této látky je změna chování vodních živočichů vedoucí k riziku zvýšené úmrtnosti, což může mít vliv na zhroucení celé populace ryb v rozmezí několika generací⁵⁸⁻⁵⁹. Dále bylo prokázáno, že u vodních živočichů EE2 ovlivňuje aktivitu dvou enzymů, acetylcholinesterasy a glutathion-S-transferasy⁶⁰. U některých druhů sladkovodních ryb EE2 narušuje rovnováhu mezi programovanou buněčnou smrtí (apoptosou) a buněčnou proliferací^{49,61}.

EE2, jehož struktura je zobrazena na Obr 2., má 11-17x vyšší estrogenní účinek ve srovnání s přirozeným E2⁶².



Obr. 2: Struktura EE2 včetně mapy elektronové hustoty. Červeně jsou vyznačeny hydroxylové skupiny. Vytvořeno v programu ChemSketch.

Z výše uvedeného vyplývá, že EE2 je velmi stabilní analog estrogenů působící negativně na životní prostředí, proto se poslední studie zaměřují na možnosti odstranění této sloučeniny z vodního ekosystému pomocí degradace různými systémy⁶²⁻⁶³.

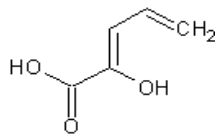
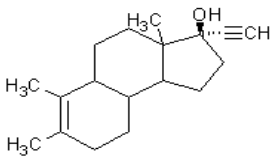
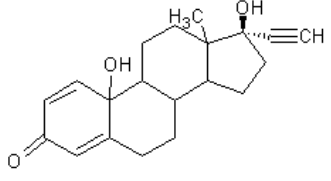
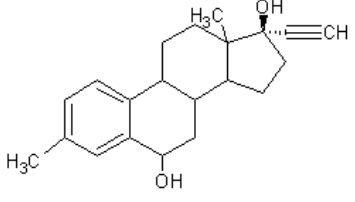
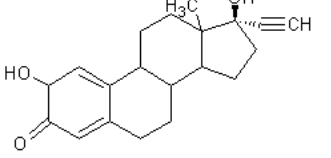
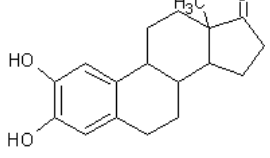
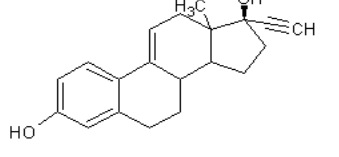
1.1.2.1 Možnosti přeměny 17 α -ethinyestradiolu

EE2 je velmi odolný vůči degradaci díky přítomnosti acetylinové skupiny ve své struktuře, která snižuje účinnost degradačních enzymů. V porovnání s ostatními estrogenními sloučeninami je navíc EE2 nejvíce hydrofobní sloučenina a tudíž dochází často k jeho sorpci v procesu čištění odpadních vod^{16,64}. V ČOV byla zjištěna různá míra eliminace EE2 pohybující se v rozmezí 0% - 90 %^{55,65}. Tento rozdíl je dán mnoha faktory, např. geologickým umístěním ČOV, provozními podmínkami či mírou znečištění přítoků.

Dosud převažují dva způsoby odstranění EE2 z odpadních vod a to sorpce na pevné nosiče a biodegradace působením mikroorganismů³².

Biodegradace EE2 probíhá díky mikroorganismům přítomným v aktivovaném kalu v ČOV. EE2 je degradován v malé míře⁶⁶, ovšem pokud jsou v aktivovaném kalu přítomny nitrifikační bakterie, dochází k úplné degradaci EE2 během šesti dnů za vzniku velmi polárních metabolitů, jejichž struktura však nebyla identifikována⁶⁷. Mikroorganismy metabolizující EE2 využívají steroidní skelet jako zdroj energie a/nebo uhlíku⁶⁸. Bakterie oxidující amoniak a heterotrofní bakterie jsou schopné degradovat EE2 i ostatní estrogeny⁶⁸⁻⁶⁹. V roce 2004 byla izolována z aktivovaného kalu ČOV bakterie *Rhodococcus equi* a *Rhodococcus zopfii*, které degradují EE2 s velmi vysokou účinností (odstranění 100 mg.l⁻¹ EE2 během 24 hodin)⁷⁰. V roce 2007 se podařilo navrhnout celou katabolickou dráhu degradace EE2 a to u izolované čisté kultury kmene *Sphingobacterium* JCR5. Od té doby lze v literatuře dohledat některé identifikované produkty této degradace EE2. Hayan a kol. objasnili strukturu dvou polárních organických kyselin, produktů katabolické dráhy EE2. Identifikace těchto produktů byla provedena metodou LC-IT-MS (měřeno v negativním módu ESI)⁷¹. *Nitromonas europia* patří k dalším mikroorganismům degradujícím EE2, u kterého byly identifikovány metabolity tohoto syntetického estrogenu. Struktury některých identifikovaných produktů degradace EE2 jsou uvedeny v Tab. 1, str. 17.

Tab. 1: Přehled transformace EE2 a jeho degradačních produktů, upraveno dle ⁷².

Transformace EE2		Struktura produktu
Bakteriální degradace EE2	<i>Spingobacterium</i> <i>sp.</i> JCRP	EE2 degradován na 2-hydroxy-2,4-dien valerovou kyselinu 
	Autotrofní bakterie oxidující amoniak	Modifikace EE2 odstraněním kruhu A za vzniku ETDC 
Degradace pomocí řas	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Transformace EE2 končí tvorbou 17 α -ethinyl-1,4 estradien-10,17 β -diol-3-onu 
	<i>Ankistrodesmus braunii</i>	Transformace EE2 za vzniku 6- α -hydroxyethinylestradiolu 
Fyzikálně - chemická degradace	Oxidace	EE2 může být oxidován, což vede k vytvoření semichinoidní formy 
	Ozonizace	Ozonizací vzniká např. produkt estra-1,3,5(10)-trien-17-on,2,3-bis[(trimethyloxy)] 
	Katalytická oxidace	Abiotická oxidace EE2 za využití iontů Mn ³⁺ dává vznik dehydrogenačnímu produktu 

Biotransformace EE2 byla také prokázána u několika druhů řas (struktura vybraných produktů je opět uvedena v Tab. 1, str. 17). V tomto případě dochází ke vzniku glykosidů, ketonů a hydroxyderivátů EE2. Greca a spol. identifikoval zmíněné degradační produkty za použití kombinace technik GC-MS, FT-IR a FT-NMR ⁷³.

Autooxidace a fotodegradace jsou dalšími možnostmi tentokrát fyzikálně-chemické přeměny EE2. Některé oxidační produkty již byly identifikovány za použití technik NMR a MS, a jsou též uvedeny v Tab. 1, str. 17 ⁷⁴.

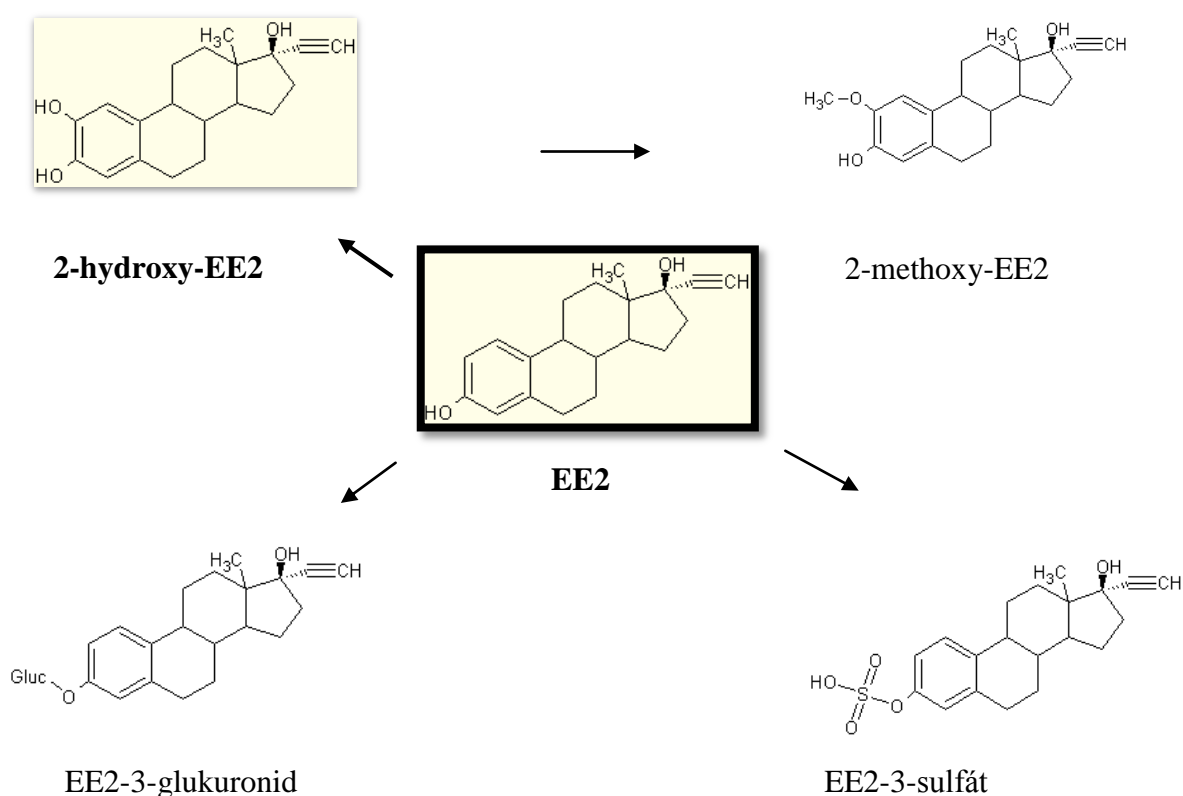
Za zmínku stojí i možnost využití ligninolytických hub pro biodegradační účely. Ligninolytické houby (též houby bílé hniloby) mají unikátní schopnost kompletně rozložit buněčnou stěnu. Jsou tedy schopné degradovat i velmi odolné polymery jako je celulóza, hemicelulóza a lignin ⁷⁵. Název houby bílé hniloby pochází právě ze skutečnosti, že po rozložení ligninu se zpřístupní bíle zbarvená celulóza, která pak slouží jako zdroj uhlíku pro houbové mycelium ⁷⁶. Kromě degradace těchto přírodních látek jsou ligninolytické houby schopné degradovat i syntetické polutanty. Kvůli možnosti odstranění vybraných EDC z prostředí jsou proto studované i v této práci ⁷⁷⁻⁷⁸.

Modelovým organismem ligninolytických hub je *Phanerochaete chrysosporium* a mezi další zástupce s degradačním potenciálem patří houby *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus* a *Pleurotus ostreatus* ⁷⁹⁻⁸⁰. *Pleurotus ostreatus* (hlíva ústříčná) nachází v poslední době své uplatnění právě jako alternativní model studia metabolismu cizorodých látek ⁸¹⁻⁸³.

Za účelem degradace EE2 byly studovány extracelulární enzymy uvedených vybraných ligninolytických hub (peroxidasy, oxidasy), které jsou zodpovědné za rozklad ligninu, jak je uvedeno výše. Z výsledků nezávislých studií vyplynulo, že pro úspěšnou přeměnu EE2 je potřeba zapojení jak extracelulárních, tak intracelulárních enzymových systémů, včetně cytochromů P450 ⁸⁴. Řada autorů se pokoušela stanovit degradační produkty a navrhnout mechanismus transformace EE2. Nicméně se dosud nepodařilo celý mechanismus dostatečně popsat a proto je biodegradace za použití ligninolytických enzymů či celých kultur hub stále ve fázi výzkumu ^{32,85-87}.

1.1.2.2 Metabolismus 17 α -ethinylestradiolu v lidském organismu

EE2 je metabolizován více způsoby a existují velké rozdíly v rychlosti a způsobu přeměny EE2. Hlavní oxidační metabolická cesta v lidském organismu probíhá zejména v játrech, kdy dochází k hydroxylaci na aromatickém kruhu. Majoritní primární oxidační produkt je 2-hydroxyethinylestradiol, který může být posléze methylován za vzniku sekundárního metabolitu 2-methoxyethinylestradiolu. Minoritními metabolity EE2 jsou hydroxyderiváty na pozicích 4, 6 a 16 v poloze α steroidního kruhu⁸⁸⁻⁸⁹. Hydroxylace EE2 na pozici C16 není tak častá z důvodu sterické zábrany ethinylové skupiny na uhlíku v pozici 17. Omezení 16-hydroxylace je příčinou rozdílného metabolismu syntetického 17 α -ethinylestradiolu oproti přirozenému hormonu 17 β -estradiolu^{45,64,90}. Na Obr. 3 je uvedené schéma převládajícího metabolismu EE2 v lidském organismu⁹¹.



Obr. 3: Majoritní lidská metabolická cesta EE2. Zvýrazněn je hlavní metabolický produkt 2-hydroxy-EE2, vytvořeno v programu ChemSketch dle⁹¹.

Další možností přeměny EE2 je přeskupení jedné ethynilové skupiny do D kruhu druhé steroidní molekuly (D-homoanulace) a následné odstranění v podobě CO₂⁹². *In vivo* může také docházet k odstranění ethynilové skupiny na pozici C17, ovšem tato metabolická cesta se uskutečňuje s velmi malou pravděpodobností⁹³.

Nepřeměněný EE2 a jeho majoritní hydroxylované metabolity jsou posléze v játrech konjugovány na biologicky neaktivní sulfatované (enzym sulfotransferasa 1E1⁹⁴) nebo glukuronidové (uridin difosfát glukuronosyltransferasa 1A1⁹⁵) sloučeniny. EE-3-glukuronid a EE-17-glukuronid jsou rychle vyloučeny ledvinami a nedochází k jejich cirkulaci. Oproti tomu sulfatované konjugáty jsou přítomny v mnohem vyšší koncentraci a při enterohepatálním oběhu mohou být částečně rozštěpeny, což poskytuje malé množství cirkulujícího nekonjugovaného 17 α -ethinylestradiolu. Vyloučení všech produktů metabolismu EE2 včetně zbytkového nepřeměněného množství EE2 pak probíhá močí a částečně i výkaly^{45,96}.

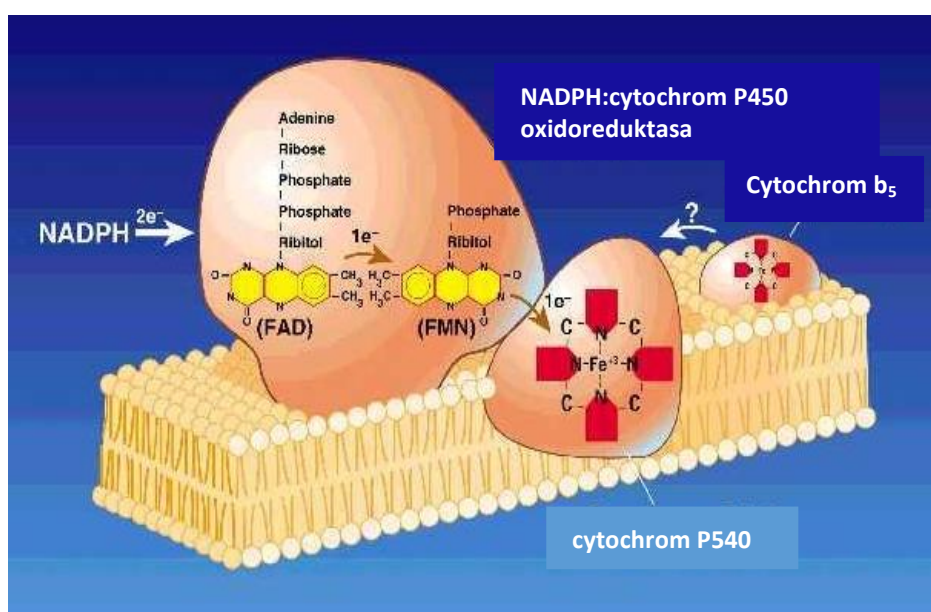
Hydroxylace je jednou z reakcí první fáze biotransformace. Mezi nejvýznamnější enzymy katalyzující tyto reakce patří cytochromy P450 (CYP), proto již prvotní studie předpokládaly zapojení cytochromů P450 při metabolismu syntetického EE2⁹⁷⁻⁹⁸.

1.2 Cytochromy P450

CYP (EC 1.14.14.1) jsou hemoproteiny široce rozšířené napříč všemi organismy. Jedná se o hlavní enzymy zapojené do metabolických procesů endogenních i exogenních látek. Jsou to mikrosomální monooxygenasy se smíšenou funkcí (z angl. „mixed function oxidases“, MFO), kde fungují jako terminální oxidasy. Smíšená funkce mikrosomálních monooxygenas zahrnuje (kromě aktivace) inkorporaci jednoho atomu kyslíku (O₂) do molekuly substrátu, zatímco druhý atom je redukován za vzniku molekuly vody. Enzymový aparát monooxygenas je vícesložkový, obsahující hydroxylasové komponenty a komponenty umožňující transport elektronů. Důležitou složkou MFO systému je též fosfolipidová membrána, ve které jsou výše uvedené komponenty zakotveny. Postupný přenos elektronů na CYP zprostředkovává enzym NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa⁹⁹⁻¹⁰⁰. Komponenty MFO systému jsou zobrazeny na Obr. 4, str. 21.

Název „cytochrom“ P450 není přesný, ovšem je používán (již od objevení tohoto enzymu v 60. letech minulého století) i přesto, že se nejedná o cytochrom v pravém slova

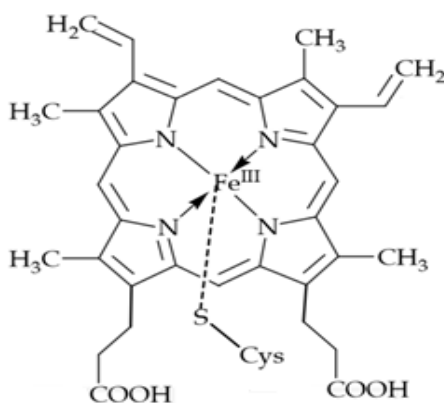
smyslu. V literatuře lze též nalézt označení hem-thiolátové proteiny, které je výstižnější¹⁰¹⁻¹⁰². Spojení P450 je používáno díky absorpčnímu maximu redukované formy CYP s navázaným oxidem uhelnatým při 450 nm. CYP se rozdělují do genetických rodin a podrodin podle shody primární struktury. Rodiny CYP se shodují přibližně ve 40 %, podrodiny v 55-60 %. Název konkrétního cytochromu P450 je tvořen číslem (příslušnost k rodině), následuje velké písmeno (podrodina) a další číslo označuje příslušný enzym 99,101.



Obr. 4 : *Uspořádání MFO v membráně endoplasmatického retikula, převzato a upraveno dle¹⁰³*

Systém cytochromů P450 vyskytující se u eukaryotických organismů je vázán na fosfolipidovou dvojvrstvu endoplasmatického retikula nebo se nachází v mitochondriích. Do membrány jsou zakotveny pomocí N-terminální hydrofobní domény, která je tvořena 20-30 aminokyselinami. Hydrofilní C-terminální doména, která je orientována do cytosolu, je zodpovědná za katalytickou funkci cytochromů P450¹⁰⁴. Dále CYP obsahují ve své struktuře neproteinovou složku a to porfyrinový skelet, Fe-protoporfyrin IX (hem *b*). Porfyrinový skelet je zde vázán částečně hydrofobními silami i prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny aminokyseliny cysteinu, který je přítomný v aktivním centru

enzymu jakožto pátý ligand protoporphyrinu IX¹⁰⁵ (Obr. 5). Šestá ligandem je pak molekula vody vázaná prostřednictvím jednoho atomu kyslíku. Toto neobvyklé uspořádání odlišuje CYP od ostatních hemoproteinů spektrálními (charakteristické spektrum) a katalytickými vlastnostmi⁹⁹.

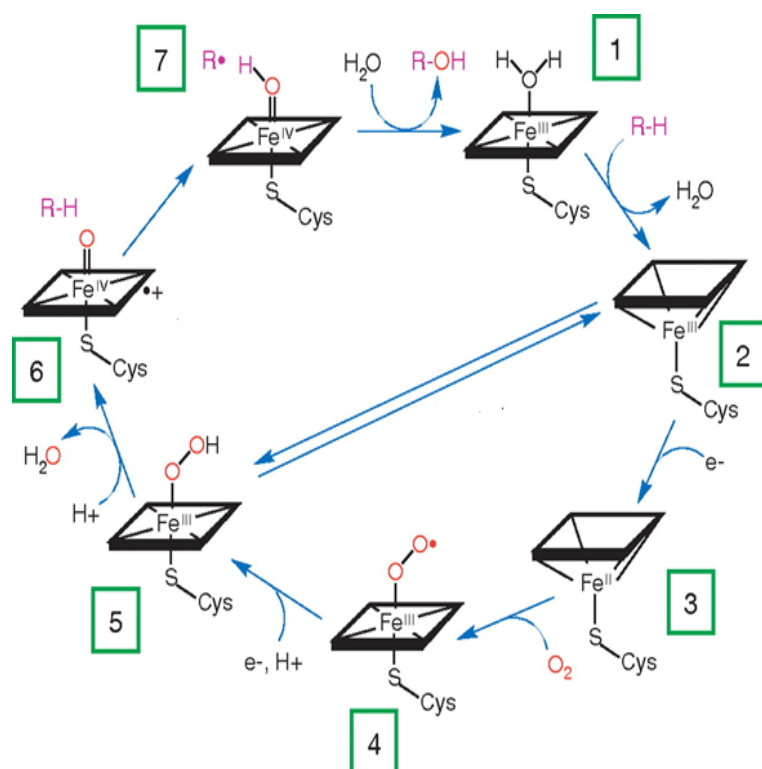


Obr. 5: Struktura části hemu b cytochromů P450. Ion železa je vázán dusíky pyrolových jader a prostřednictvím thiolátové síry cysteinu převzato z¹⁰⁶.

CYP katalyzují biotransformaci širokého spektra látek, zejména se účastní oxidačních, hydroxylačních, epoxidačních, dealkylačních a dechloračních reakcí¹⁰⁷. Substrátová specifita cytochromů P450 je velmi široká (organické sloučeniny jako jsou různé uhlovodíky, aminy, fenoly ale i léčiva a parafarmaceutika) ovšem existují i CYP které metabolizují jen malý počet substrátů (biosyntéza endogenních hormonů a steroidů). Kromě inaktivace cizorodých látek mohou tyto enzymy řadu nereaktivních látek přeměňovat na karcinogenní a mutagenní metabolity, proto je studiu cytochromů P450 kladena velká pozornost^{99,105}.

1.2.1 Katalytický mechanismus cytochromů P450

Obr. 6 znázorňuje celkové schéma reakčního cyklu cytochromů P450. V prvním kroku dochází k vazbě substrátu (RH) do aktivního místa v blízkosti Fe^{III} [1], kdy je šestý ligand železa (zde molekula vody) vytlačen a molekula enzymu je konformačně pozměněna [2]. V dalším kroku cytochrom P450 přijímá jeden elektron (který je poskytnut NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasou) a Fe^{III} je redukován na Fe^{II} [3]. V tomto stavu může dojít k vazbě molekuly O_2 (či molekuly CO) na iont železa [4] a vzniku nestabilního komplexu. Po přijetí dalšího elektronu (NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa či NADH: cytochrom b_5 oxidoreduktasa) je kyslík aktivován na peroxidový anion [5].



Obr. 6: Schéma reakčního cyklu cytochromů P450. R-H značí substrát, R-OH pak produkt monooxygenace. Oboustranná modrá šipka znázorňuje možnost vzniku plně aktivované formy přes alternativní cestu využívající peroxosloučeniny, převzato z ¹⁰⁸

Tato plně aktivovaná forma umožňuje rozštěpení vazby biatomické molekuly kyslíku, kdy je jeden atom kyslíku redukován za současného uvolnění molekuly vody [5-6]. Druhý atom kyslíku zůstává vázán na Fe za vzniku ferrioxenového komplexu. Vytvořený reaktivní kyslíkový radikál je schopen odštěpit atom vodíku z molekuly substrátu [7] a vzniká radikál substrátu a hydroxylový radikál vázaný na Fe hemu. Vzniklé radikály se rekombinují a tvoří se produkt (ROH) a nativní forma CYP [7-1]. Alternativní možností vzniku plně aktivované formy cytochromu P450 (šipka vedoucí ze stavu [2] do stavu [5]) je využití peroxidů či peroxokyselin jako zdrojů kyslíku i elektronů¹⁰⁹⁻¹¹¹.

1.2.1.1 Modulace aktivity cytochromů P450

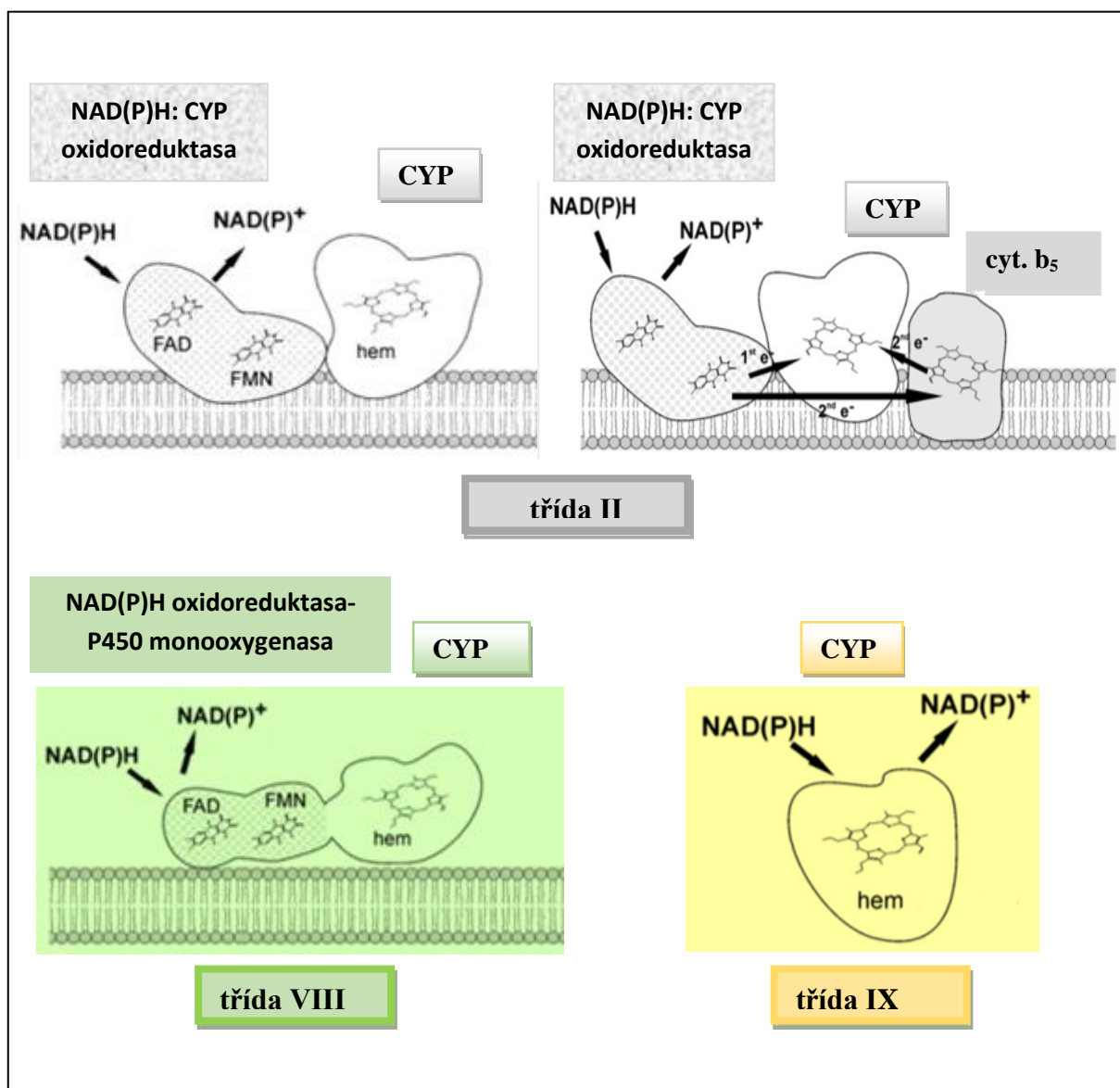
Některé CYP je možné indukovat, tj. zvýšit jejich expresi podáním induktoru. Induktory mohou být cizorodé látky, léčiva, steroidní látky, antibiotika aj. Proces indukce zahrnuje nejčastěji zvýšení translace, transkripce, stabilizaci mRNA a stabilizaci proteinu či ovlivnění jeho degradace¹¹². U cytochromů P450 byly popsány různé specifické induktory. Mezi nejznámější induktory vybraných lidských a potkaních forem cytochromů P450 patří β -naftoflavon (indukce CYP1A1 a 1A2 u potkanů), fenobarbital (CYP2B1 u potkanů), ethanol (CYP2E1 u potkanů a lidí) a pregnenolon-16 α -karbonitril (PCN) (CYP3A u potkanů i lidí)¹¹³⁻¹¹⁴.

Kromě indukce lze aktivitu cytochromů P450 také inhibovat. Některé inhibitory ireverzibilně poškozují hem, jiné inhibují reverzibilně mechanismem kompetitivní či nekompetitivní inhibice. Specifické inhibitory pro určité CYP lze využít ke studiu metabolismu různých substrátů. Jedná se o např. elipticin pro CYP1A1, sulfofenazol (CYP2C8-10), diethyldithiokarbamát (CYP2E1), diamantanové sloučeniny (CYP2B) či ketokonazol (CYP3A)¹¹⁵.

1.2.2 Systém cytochromů P450 v buňkách hub

CYP, nalezené v buňkách hub, reprezentují velkou skupinu enzymů s některými zajímavými katalytickými vlastnostmi¹¹⁶. Tyto enzymy katalyzují kromě základních buněčných procesů (přeměna hydrofobních intermediátů primárního a sekundárního metabolismu) také přeměnu mnoha polutantů¹¹⁷.

Systém cytochromů P450 je rozdělen do 10 tříd, z hlediska využití proteinů, které přenášejí elektron na CYP. V buňkách hub byly nalezeny tři třídy cytochromů P450, které jsou schematicky znázorněny na Obr. 7.



Obr. 7: Schematické znázornění tří základních uspořádání MFO systému nalezených v buňkách hub. Třída II je nejběžnější skupina eukaryotických cytochromů P450 využívající pro přenos elektronů NADPH:CYP oxidoreduktasu nebo NADH:cytochrom b₅ oxidoreduktasu. Fúzní proteiny patřící do třídy VIII jsou katalyticky soběstačné flavocytochromy spojené k redukované doméně. V případě třídy IX jsou elektrony z NAD(P)H přenášeny přímo na CYP bez přítomnosti dalšího redukčního partnera. Převzato a upraveno dle ¹¹⁶.

Oproti savčím cytochromům P450, kde jsou jejich biochemické vlastnosti dobře prozkoumány, je zatím studium houbových cytochromů P450 stále ve fázi výzkumu. Izolace aktivních cytochromů P450 z buněk hub je velice obtížný proces vzhledem k nízké stabilitě proteinu a vyžaduje optimalizovanou metodu izolace ¹¹⁸. Bližší prozkoumání těchto enzymů bylo tudíž provedeno metodami molekulární biologie (heterologní exprese a klonování). Těmito technikami byl genom hub detailně prozkoumán. Zatím bylo identifikováno 276 rodin cytochromů P450, kódovaných více než 6000 geny ¹¹⁹. Některé houbové CYP jsou často prvními členy nové rodiny.

Předpokládá se, že houbové cytochromy participují na oxidaci xenobiotik a účastní se degradace mnoha syntetických polutantů např. toluenu ¹²⁰⁻¹²¹, fenantrenu ⁸¹, benzo[*a*]pyrenu ¹²², kyseliny benzoové ¹²³ aj.

1.2.3 Cytochromy P450 a metabolismus 17 α -ethinylestradiolu u savců

Hydroxylační enzymy podílející se na metabolismu EE2 byly izolovány z králíčích, potkaních a lidských jater ¹²⁴⁻¹²⁵.

V prvotních studiích bylo zjištěno, že EE2 je v lidském organismu primárně metabolizován CYP3A4 ¹²⁶. Později bylo prokázáno také zapojení dalších forem cytochromů P450 do metabolismu EE2. Wang předpověděl, že na 2-hydroxylaci EE2 lidskými jaterními mikrosomy se podílí zejména CYP2C9 a CYP3A4, zatímco CYP2C8, 2C19, CYP1A2 a CYP1B1 se podílí na oxidaci EE2 v menší míře. Zapojení dalších forem cytochromů P450 (2A6, 2B6, 2D6 a 2E1) do metabolismu EE2 je oproti výše uvedeným zanedbatelné ¹²⁷. Z dalších studií, zabývajících se rekombinantními CYP, vyplynulo, že rekombinantní CYP1A1 vykazuje vyšší katalytickou aktivitu než rekombinantní CYP3A4 a 2C9 ¹²⁷. Oproti tomu imunoinhibiční studie jaterních potkaních enzymových systémů s protilátkami proti cytochromům P450 ukazují, že 2-hydroxylace EE2 je katalyzována především CYP2C a CYP2E a v tomto případě nebylo zjištěno zapojení CYP1A1 ⁹⁸.

Při oxidaci acetylenové části EE2 CYP může docházet ke vzniku nestabilního a reaktivního acetylovaného oxidu, který je silným nukleofilem. Tato látka se může zpětně kovalentně vázat na protein cytochromu P450 nebo alkylovat prosthetickou skupinu hemu a působí tedy jako sebevražedný substrát ¹²⁸. Bylo popsáno, že takto jsou inhibovány

CYP3A4, 2B1 a 2B6 lidského i potkaního jaterního mikrosomálního systému *in vitro*¹²⁹⁻¹³². Ireverzibilní inhibice CYP3A4 zahrnuje výše zmíněnou destrukci hemu a kovalentní vazbu na apoprotein. U CYP2B6 dochází pouze k modifikaci apoproteinu¹³⁰. Naopak CYP2C19¹³³⁻¹³⁴ a 2C8¹³⁵ EE2 inhibuje reverzibilně. Dosud nebyly publikovány výsledky, které by ukazovaly na působení EE2 jakožto induktoru lidských forem cytochromů P450. Zatím bylo zjištěno nepatrné zvýšení aktivity zprostředkované EE2 pouze u potkaních cytochromů P450¹³⁶⁻¹³⁷.

2 Cíl diplomové práce

Cílem předkládané diplomové práce je studium metabolismu 17 α -ethinylestradiolu *in vitro* mikrosomálním systémem vybraných modelových organismů (ligninolytické houby *Pleurotus ostreatus* a laboratorního potkana). V rámci této práce byly řešeny následující problematiky:

Studium metabolismu 17 α -ethinylestradiolu *in vivo* a *in vitro* mikrosomálním systémem houby *Pleurotus ostreatus*.

Studium metabolismu 17 α -ethinylestradiolu *in vitro* mikrosomálním systémem modelového organismu laboratorního potkana.

- ✓ Identifikace metabolitů 17 α -ethinylestradiolu.
- ✓ Určení konkrétních enzymů zapojených do metabolismu 17 α -ethinylestradiolu za použití specifických induktorů a inhibitorů cytochromů P450.
- ✓ Zjištění vlivu 17 α -ethinylestradiolu na metabolismus přirozených hormonů testosteronu a progesteronu.

3 Materiál

3.1 Materiál a chemikálie

Houbová kultura *Pleurotus ostreatus* 3004 ze sbírky CCBAS byla poskytnuta Mikrobiologickým ústavem AV ČR, v.v.i.

Jaterní mikrosomální systém laboratorních potkanů kontrolních i premedikovaných induktory CYP (ethanolem, fenobarbitalem, pregnenolon-16- α -karbonitrem a Sudanem I) byl izolován v laboratoři katedry biochemie PřF UK a poskytnut pro experimenty v rámci této diplomové práce. Premedikace potkanů a následná izolace potkaní mikrosomální frakce nebyla součástí této diplomové práce. Adamantan byl poskytnut Prof. Petrem Hodkem, Ph.D.

Použité chemikálie a rozpouštědla pocházejí z těchto zdrojů:

Cayma Chemical, USA: 6 β -hydroxytestosteron

Gentest BD Bioscience, USA: potkaní rekombinantní cytochromy P450 v Supersomech™

Fluka, Švýcarsko: testosteron, kumen hydroperoxid

J.T. Baker, USA: acetonitril (pro HPLC)

Lab-Scan, Polsko: methanol (pro HPLC)

Lach-ner, ČR: dichlormethan, ethylacetát, KH₂PO₄, sacharosa

Lachema, ČR: EDTA Na₂, Na₂S₂O₄, Na₂CO₃ · (H₂O), NaHCO₃, vínan sodno-draselný, MgCl₂

Linde, ČR: kapalný dusík

Merck, Německo: ethanol

Oxoid, USA: Malt-extract Broth

Penta, ČR: agar, ethylacetát, glycerol (bezvodý), KOH, Na₂HPO₄ · 12 H₂O, NaOH, methanol

Roche, Švýcarsko: inhibitory proteas (tablety Complete protease inhibitor, inhibice serinových, cysteinových a metalo proteas)

Serva, USA: dithiothreitol

Sevapharma a.s., ČR: hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma-Aldrich, USA: 1-aminobenzotriazol, 16 α -hydroxytestosteron, 16 α -hydroxyprogesteron, 17 α -ethinylestradiol, α -naftoflavon, diethyldithiokarbamát, dimethylsulfoxid, ketokonazol, glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, NADP⁺, phenacetin, progesteron, sulfafenazol

Thermo Scientific, USA: Microplate BCA Protein Assay Kit

Všechny chemikálie byly čistoty p.a., pokud není uvedeno jinak

3.2 Použité přístroje

Analytické váhy

40 SM-200 A

Pesa, Švýcarsko

AE 240

Mettler, Švýcarsko

Autokláv

Falcon

LTE Scientific, Velká Británie

Automatické pipety

Biohit, Finsko

Centrifugy

K-23, výkyvný rotor

Janetzki, Německo

K-24, úhlový rotor

Janetzki, Německo

Ultracentrifuga LE-80 K, úhlový rotor Ti 45

Beckman Coulter, USA

Centrifuga 5418, úhlový rotor

Eppendorf, Německo

Centrifuga EBA 270 Hettich, výkyvný rotor

Hettich, Německo

SpectrafugeTM Mini centrifuga

Labnet, Japonsko

Homogenizátory

dle Pottera a Elvehjema

Ultra-Turrax T18

IKA Labortechnik, Německo

Inkubátory

IR 1500

Flow Laboratories, Německo

Thermomixer Compact

Eppendorf, Německo

Orbi-safe TS NetWise

Gallenkamp, Velká Británie

Termostat PCH-2, Grant-bio

P-Lab, Česká republika

Termostat LS-1V

VLM, Německo

pH metr

ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou

HANNA instruments, USA

Třepačky

Yellow line os 2 basic

IKA, Německo

Mikroshaker MS 1

IKA Labortechnik, Německo

Minishaker

Schoeller Pharma, ČR

MS analýza

hmotnostní detektor Waters LCT, ESI, ToF

Waters MS, Velká Británie

hmotnostní detektor FLEX III, NALDI, ToF

Bruker-Daltonics, Německo

Předvážky

KERN EW 600-2M

Kern, Německo

Ultrazvuková lázeň

ELMAsonic E 30 H

P-Lab, Česká republika

Sonikátor UC 005AJ1

Tesla, Česká republika

Spektrofotometr

Specord M 40

Carl-Zeiss Jena, Německo

Systém HPLC

pumpa: Dionex pump P580

ASI-100 Automated Sample Injector

UV/VIS Detektor UVD 170S/340S

Degasys DG-1210 Dionex

termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101 ECOM, ČR

předkolona: Nukleosil 100-5 C18

kolona: Nukleosil 100-5 C18 HD; 4 x 250 mm Macherey-Nagel, Německo

program: Chromeleon™ 6.11 build 490

Systém UPLC

Waters, ČR

vysokotlakové čerpadlo: Acquity

Acquity UPLC dávkovač

Acquity UPLC DAD detektor diodového pole

kolona: Acquity UPLC BEH C18, 2,1 x 50 mm

program: MassLynx V4.1 Waters, USA

Vakuová odparka

SpeedVac DNA 110

Savant, USA

RVO 200 A

Ingos, ČR

4 Metody

4.1 Studium metabolismu 17 α -ethinylestradiolu modelovým organismem *P. ostreatus*

4.1.1 Příprava kultivačního média a inokula houby *P. ostreatus*

Kultivační medium MEG (1% glukosa (w/v), 0,5 % Malt-extrakt Broth (w/v), doplněno do 1 l deionizovanou vodou) bylo připraveno do Erlenmayerových baněk a sterilizováno vlhkou parou pod tlakem v autoklávu (121 °C, 25 minut, 0,15 kPa) Pro přípravu inokula houby *P. ostreatus* bylo použito 20 ml MEG media v 250 ml Erlenmayerových baňkách, do kterého byly aplikovány tři agarové disky o průměru 8 mm s myceliem houby *P. ostreatus*. Agarové disky byly vyříznuté z Petriho misek porostlých 7 denní houbovou kulturou. Baňky s takto připravenými kulturami rostly v temnu, stacionárně při 28 °C po dobu 7 dní. Po kultivaci byly kultury homogenizovány za sterilních podmínek a vzniklý homogenát byl použit při očkování kultur jako inokulum. Příprava inokula byla provedena RNDr. Kateřinou Svobodovou, Ph.D. na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v.v.i.

4.1.2 Degradace 17 α -ethinylestradiolu houbou *P. ostreatus in vivo*

Degradace EE2 *in vivo* byla popsána a pozorována v rámci experimentů provedených v bakalářské práci¹³⁸. Degradace byla v tomto případě stanovena z úbytku substrátu EE2. Pro potvrzení výše zmíněné degradace byl experiment konaný v rámci bakalářské práce zopakován a byla sledována tvorba metabolitů EE2.

Bylo připraveno osm Erlenmayerových baněk o objemu 250 ml s 20 ml MEG media. Do každé baňky bylo sterilně pipetováno inokulum *P. ostreatus* do výsledné koncentrace 5 % (v/v). Kultury rostly 7 dní v temnu, stacionárně za přístupu vzduchu při 28 °C. Po 7 dnech kultivace byla polovina kultur sterilizována vlhkou parou pod tlakem v autoklávu (121 °C, 25 minu,) a tato sada sloužila jako negativní kontrola degradace. Poté byl do všech baněk přidán roztok EE2 v DMSO do výsledné koncentrace 0,034 mM. Všechny baňky byly dále inkubovány za stejných podmínek a probíhající reakce byla

zastavena u poloviny kultur po 24 hodinách a u druhé poloviny po 48 hodinách přidáním ethylacetátu.

Kultury hub byly homogenizovány (*Ultra-Turrax T18*) a okyseleny 200 µl 1 M HCl. Homogenát byl převeden do uzavíratelné skleněné baňky a EE2 a jeho metabolity byly extrahovány ve třech krocích 20 ml ethylacetátu. Extrakce byla urychlena třepáním 15 minut (*Yellow line os 2 basic*). Baňky byly následně 15 minut sonikovány v ultrazvukové lázni (*sonikátor UC 005AJ1*) a ponechány stát při laboratorní teplotě do oddělení vodné a organické fáze. Organická fáze byla odebrána skleněnou stříkačkou do uzavíratelné srdcovité baňky. Spojené extrakty byly zahuštěny na finální objem 2 ml (*vakuová odparka RVO 200 A*) při teplotě lázně 40 °C. Zahuštěný extrakt byl přesušen přes kolonku s bezvodým Na₂SO₄ a eluován 3 x 3 ml ethylacetátu. Tento extrakt byl analyzován HPLC (kap. 4.3.4).

4.1.3 Extrakce kultivačního média *P. ostreatus*

Pro zjištění úspěšnosti přeměny EE2 během kultivace s houbou *P. ostreatus* byl zjišťován zbytkový obsah EE2 v kultivačním médiu. Po 14 dnech růstu (kap. 4.2.1), kdy byly dva dny kultury vystavené působení EE2, bylo během filtrace houbového mycelia odebráno a spojeno 30 ml média ze třech různých baněk. K vzorku média (5 ml) bylo přidáno 2 ml ethylacetátu a extrakce byla urychlena intenzivním třepáním po dobu 10 minut (*Yellow line os 2 basic, rychlost 6*). Po extrakci byla směs 5 minut sonikována (*ELMAsonic E 30 H*). Pro lepší oddělení vodné a organické fáze byla následně směs centrifugována (*EBA 270 Hettich, 5min, 4000 RPM*). Horní organická fáze byla odebrána do čisté mikrozkušavky a ke zbylé vodné fázi bylo znovu přidáno 2 ml ethylacetátu a předchozí postup byl zopakován. Spojené odebrané extrakty byly odpařeny do sucha na vakuové odparce (*CentriVap Concentrator, Labconco, USA*). Takto připravené vzorky byly před analýzou HPLC rozpuštěny v 50 µl acetonitrilu, sonikovány 1 minutu a stočeny (*SpectrafugeTM Mini centrifuga*).

4.1.4 Identifikace metabolitů

Metabolity EE2 tvořené houbou *P. ostreatus in vivo* (kap 4.1.2) byly separovány pomocí HPLC (kap. 4.3.4) a identifikovány na hmotnostním spektrometru NALDI-ToF/ToF ultra FLEX III (*Bruker-Daltonics*) na AV ČR, v.v.i. doc. RNDr. Miroslavem Šulcem, Ph.D.

4.2 Studium degradačního potenciálu mikrosomální frakce houby *P. ostreatus*

4.2.1 Kultivace *P. ostreatus*

Kultury byly připraveny v Erlenmayerových baňkách (60 baněk) o objemu 500 ml. Do každé baňky s 90 ml MEG media (1% glukosa (w/v), 0,5 % Malt-extrakt Broth (w/v), doplněno do 1 l deionizovanou vodou) bylo sterilně pipetováno 5 ml inokula houby *P. ostreatus*, které bylo připraveno postupem uvedeným výše. Kultury rostly 14 dní v temnu, stacionárně za přítupu vzduchu při 28 °C. Pro zjištění případného vlivu EE2 na indukci exprese mikrosomálních enzymů byly připraveny kultury, do kterých bylo po 12 dnech růstu přidáno 100 µl 45 mM roztoku EE2 v DMSO pod narostlou kulturu houby *P. ostreatus*.

4.2.2 Izolace mikrosomální frakce

Izolace mikrosomální frakce houby *P. ostreatus* probíhala diferenční centrifugací dle postupu¹³⁹ s mírnou modifikací. Narostlé houbové mycelium *P. ostreatus* bylo po 14 dnech kultivace (kap 4.2.1) přefiltrováno přes nylonovou tkaninu. Mycelium bylo promyto dostatečným množstvím mixovacího pufru (pH 7,2: 100 mM KH_2PO_4 , 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 16 % (v/v) glycerol, 250 mM sacharosa, 1,5 mg/ml BSA, 0,77 mg/ml DTT (v dH_2O), 0,37 mg/ml EDTA, 0,04 mg/ml PMSF v CH_3OH) a po částech zmrazeno tekutým dusíkem. Zmražené mycelium bylo rozdrčeno na jemný prášek v třecí misce s tloučkem a takto rozdrčené mycelium bylo převedeno do 400 ml mixovacího pufru

s dvěma tabletami inhibitoru proteas (*Complete protease inhibitor*). Následně byla směs homogenizována homogenizátorem dle Pottera-Elvehjema. Homogenát byl 10 minut centrifugován (*Janetzki K-23, 3000 RPM*) ve výkyvném rotoru 4x 70 ml při 4 °C. Supernatant byl následně centrifugován 20 minut (*Janetzki K-24, 13 000 RPM*) v úhlovém rotoru 6 x 35 ml při 4 °C. Získaný supernatant byl z kyvety odlit bez kontaminace lehce sedlou vrstvou mitochondrií a dále centrifugován 75 minut (*ultracentrifuga Beckman, 45 000 RPM*) v úhlovém rotoru Ti 45 při 4 °C. Supernatant (cytosol) byl zmražen a uložen při -80 °C a peleta byla homogenizována s 40 ml uchovávacího pufru (*pH 7,2: 50 mM KH_2PO_4 , 50 mM $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 25 % (v/v) glycerol*). Následnou centrifugací trvající 75 minut (*ultracentrifuga Beckman, 60 000 RPM*) v úhlovém rotoru Ti 70 při 4 °C byla získána mikrosomální frakce, která byla resuspendována se v co nejmenším množství uchovávacího pufru a rehomogenizována. Finální mikrosomální preparát byl zmražen tekutým dusíkem a uložen při teplotě -80 °C.

Z izolované mikrosomální frakce kontrolní (MF_K) i frakce vystavené působení EE2 (MF_{EE2}) byl odebrán vzorek pro stanovení proteinů a stanovení koncentrace cytochromu P450.

4.2.3 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů v izolovaných mikrosomálních frakcích byla stanovena metodou BCA¹⁴⁰⁻¹⁴¹. Nejprve byly vzorky MF vhodně naředěny destilovanou vodou a následně zpracovány dle návodu komerčního setu Microplate BCA Protein Assay Kit. Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 9 µl slepého vzorku (destilovaná voda), standardu či vhodně naředěného vzorku dle přiloženého návodu. Do každé jamky bylo přidáno 260 µl činidla, které bylo připraveno vždy čerstvě naředěním bezprostředně před použitím. Tento roztok obsahoval 50 dílů činidla A (*pH 11,25: 2 % (w/v) $Na_2CO_3 \cdot H_2O$, 0,95 % (w/v) $NaHCO_3$, 0,4 % (w/v) $NaOH$, 0,16 % (w/v) vlnan sodno-draselný*), v němž byla rozpuštěna bicinchoninová kyselina tak, aby její výsledná koncentrace v 51 dílech byla 1% (w/v) a 1 díl činidla B (*4 % (w/v) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$*). Mikrotitrační destička byla následně 30 minut inkubována při 37 °C (*IR 1500*). Po temperování destičky na laboratorní teplotu byla změřena absorbance vzorků při 562 nm pomocí čtečky mikrotitračních

destiček a příslušná koncentrace proteinů byla automaticky vyhodnocena pomocí programu KIM 32.

4.2.4 Stanovení koncentrace cytochromu P450

Koncentrace cytochromu P450 v mikrosomálních preparátech byla stanovena metodou popsanou dříve¹⁴² za využití charakteristické absorpce komplexu cytochromu P450 s CO v redukovaném stavu při vlnové délce 450 nm. Mikrosomy byly vhodně naředěny pufrům (*pH 7,5: 100 mM KH₂PO₄, 2 % (v/v) glycerol*) na celkový objem 2 ml a ke vzorkům bylo přidáno 3 mg Na₂S₂O₄ k redukci cytochromu P450. Po 5 minutách stání při laboratorní teplotě byl vzorek rozdělen do dvou maskovaných semimikrokyvet po 1 ml a byla změřena základní linie. Poté byla vzorková kyveta 2 minuty probublávána oxidem uhelnatým a následně bylo změřeno diferenční spektrum v rozsahu 400–490 nm (*Specord M 40*). Měření bylo po 2 minutách a promíchání obou kyvet zopakováno. Ze získaných spekter byla vypočítána koncentrace cytochromu P450 podle vzorce:

$$c_{CYP450} = \frac{A_{450} - A_{490}}{\varepsilon_{450-490} \cdot l} \cdot \text{ředění} [\mu\text{M}]$$

c_{CYP450} : molární koncentrace cytochromu P450

$A_{450-490}$: absorbance cytochromu P450 a inaktivní formy 420

l : optická dráha kyvety [cm]

ε : molární extinkční koeficient [$0,091 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

4.2.5 Degradace 17 α -ethinylestradiolu mikrosomální frakcí houby *P. ostreatus*

Pro stanovení degradačního potenciálu izolované mikrosomální frakce houby *P. ostreatus* byly použity mikrosomy kontrolní i mikrosomy vystavené působení EE2. Tato část práce navazovala na experimenty prováděné v rámci bakalářské práce¹³⁸.

Inkubace probíhala ve skleněných zkumavkách kvůli eliminaci sorpce EE2 na jiné materiály vzhledem k jeho hydrofobnímu charakteru¹⁴³. Celkový objem inkubační směsi činil 500 μl a vzorky byly připraveny vždy paralelně.

Složení inkubační směsi bylo následující:

- ✓ 1,5 mg/ml proteinů mikrosomální frakce
- ✓ 20 μ M EE2 (4mM zásobní roztok v DMSO)
- ✓ 10 mM $MgCl_2$, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM $NADP^+$, 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-generující systém)
- ✓ 50 mM fosfátový pufr (*pH 7,2: 50 mM KH_2PO_4 , 50 mM $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$*)

Kontrolní inkubační směs neobsahovala NADPH-generující systém nebo obsahovala pouze EE2 a pufr. Negativní kontrolou byla směs, která obsahovala mikrosomy inaktivované povařením (*termostat LS-1, 2 hodiny, 100 °C*). Připraveny byly i směsi, které obsahovaly inhibitory houbových CYP (1-aminobenztriazol a piperonyl butoxid) a to v desetinásobném nadbytku vůči EE2.

Reakce byla zahájena přidáním 50 μ l NADPH-generujícího systému. Inkubace probíhala za mírného třepání při 400 RPM, 37 °C a za přístupu vzduchu 1 hodinu (*Thermomixer Compact, 450 RPM*). Následně byla reakce ukončena přidáním 1 ml ethylacetátu a intenzivně promíchána. Do všech směsí bylo přidáno 5 μ l 1 mM roztoku fenacetinu v methanolu, který slouží jako vnitřní standard pro následnou analýzu HPLC. Inkubační směs byla převedena do skleněných centrifugačních zkumavek a extrahována dvakrát intenzivním třepáním 5 minut (*Yellow line os 2 basic, rychlost 6*). Po extrakci byla směs 5 minut sonikována a centrifugována (*EBA 270, Hettich, 5min, 4000 RPM*). Horní organická fáze byla odebrána do čisté mikrozkušavky a odpařena do sucha na vakuové odparce (*CentriVap Concentrator, Labconco*). Takto připravené vzorky byly před HPLC analýzou rozpuštěny v 50 μ l acetonitrilu, sonikovány 1 minutu a stočeny (*SpectrafugeTM Mini centrifuga, 10 s*).

4.2.5.1 Degradace 17 α -ethinylestradiolu mikrosomální frakcí *P. ostreatus* v přítomnosti kumen hydroperoxidu

Pro posouzení degradace EE2 v přítomnosti peroxidu, který může sloužit v některých případech jako donor kyslíku a elektronů pro CYP, byl do inkubačních směsí, připravených podle podmínek uvedených v kap. 4.2.5, přidáván kumen hydroperoxid (KHP) místo NADPH-generujícího systému.

Složení inkubační směsi o celkovém objemu 500 μ l bylo následující:

- ✓ 1,5 mg/ml proteinů mikrosomální frakce
- ✓ 20 μ M EE2 (4mM zásobní roztok v DMSO)
- ✓ 10 mM nebo 100 mM roztok KHP v H₂O
- ✓ 50 mM fosfátový pufr (*pH 7,2: 50 mM KH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄.12H₂O*)

Kontrolní vzorky obsahovaly pouze KHP v pufru nebo mikrosomy bez přídavku KHP. Reakce byla zahájena přidáním 50 μ l (10 nebo 100 mM) KHP a probíhala 30 minut dle podmínek uvedených v kap. 4.2.5. Další postup byl totožný s postupem uvedeným v kap. 4.2.5.

4.3 Studium metabolismu 17 α -ethinylestradiolu mikrosomálním systémem laboratorního potkana

Pro prvotní studium metabolismu EE2 *in vitro* byly nejprve použity mikrosomy izolované z jater nepremedikovaného laboratorního potkana (kontrolní mikrosomy).

Inkubační směsi o celkovém objemu 500 μ l byly připraveny vždy ve dvou paralelních vzorcích ve skleněných zkumavkách. Složení inkubační směsi bylo následující:

- ✓ 0,5 μ M CYP
- ✓ 20 μ M EE2 (4mM zásobní roztok v DMSO)
- ✓ 10 mM MgCl₂, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP⁺, 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-generující systém)
- ✓ 100 mM fosfátový pufr (*pH 7,4: 100 mM KH₂PO₄*)

Množství rozpouštědla DMSO nepřesáhlo 0,5 % objemu inkubační směsi. Kontrolní inkubační směs neobsahovala NADPH-generující systém nebo obsahovala pouze EE2 a pufr. Reakce byla zahájena přidáním 50 μ l NADPH-generujícího systému. Inkubace probíhala v různých časových intervalech a to 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min a 60 min, za stálého třepání (*Thermomixer Compact, 450 RPM*) při 37°C a za přístupu vzduchu. Probíhající reakce byla následně zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a dále byla zpracována jako v kap. 4.2.5.

Pro optimalizaci dalších experimentů byla v rámci studia metabolismu EE2 stanovena Michaelisova konstanta K_m přeměny EE2 jaterními kontrolními mikrosomy potkana. Inkubační směsi byly připraveny analogicky, jak je uvedeno výše. Složení inkubační směsi bylo následující:

- ✓ 0,5 μM CYP
- ✓ 5; 10; 20; 50; 100; 200; 400 μM EE2
- ✓ 10 mM MgCl_2 , 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP^+ , 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-generující systém)
- ✓ 100 mM fosfátový pufr ($\text{pH } 7,4$; 100 mM KH_2PO_4)

Inkubace probíhala 15 min za stálého třepání (*Thermomixer Compact, 450 RPM*) při 37°C a za přístupu vzduchu. Následující postup je totožný s postupem uvedeným v kapitole 4.2.5. Spojené extrakty byly odpařeny do sucha. Vzorky byly následně rozpuštěny v 50 μl acetonitrilu a analyzovány pomocí HPLC.

4.3.1 Identifikace metabolitů 17α -ethinylestradiolu UPLC-MS

Pro kvalitativní stanovení a identifikaci metabolitů vzniklých přeměnou 17α -ethinylestradiolu byly použity vzorky připravené podle podmínek uvedených v kapitole 4.3. Koncentrace EE2 ve směsi byla 200 μM s cílem získat větší výtěžky metabolitů pro jejich identifikaci.

Odpařené vzorky byly rozpuštěny v 50 μl ACN, sonikovány 2 minuty v ultrazvukové lázni a centrifugovány 2 min při 13 000 RPM (*Centrifuga mini-spin, Eppendorf*). Pro separaci UPLC (*Waters Acquity UPLC system*) a následnou analýzu hmotnostním detektorem s elektrosprejem bylo odebráno 30 μl supernatantu. Nástřík vzorku na kolonu činil 3 μl a vzorky byly separovány na koloně Acquity UPLC BEH C 18 (50 mm x 2,1 mm, velikost částic kolony 1,7 μm) za použití gradientové eluce při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,4 ml. min^{-1} . Složení mobilní fáze bylo: (A) kyselina mravenčí:voda v poměru 0,1:99,9 (v/v) a (B) 100 % ACN. Gradient probíhal za následujících podmínek: 0 min 95 % (A), 12 min 50 % (A), 15 min 30 % (A) a následně 17 min 0% (A) při teplotě 25°C . Vzorky byly detekovány v oblasti 200-600 nm (*Acquity UPLC DAD detektor*).

Pro detekci a analýzu metabolitů byl použit hmotnostní detektor (*Waters LCT Premiex XE*) s elektrosprejem s ortogonálním uspořádáním analyzátozem doby letu (*ToF, Waters MS, UK*) s ionizací ESI+ i ESI-. Napětí na vstupním kuželu bylo 40 V a průtok plynu na vstupním kuželu 50 l.h⁻¹. Napětí na sprejové kapiláře bylo ± 2500 V. Použitá teplota bloku iontového zdroje byla 120 °C a teplota desolvatačního plynu, kterým byl dusík, byla 350 °C a průtok desolvatačního plynu činil 800 l.h⁻¹. Čas skenu byl 0,1 sekund a časová prodleva mezi skeny 0,01 s. Data byla zpracována za použití programu MassLynx V4.1 (*Waters, USA*) RNDr. Terezou Tylovou, Ph.D. na AV ČR, v.v.i.

4.3.2 Určení isoformů cytochromů P450 zodpovědných za metabolismus 17 α -ethinylestradiolu

Pro určení isoformů cytochromů P450 zodpovědných za metabolismus EE2 byly zvoleny experimenty s indukovanými mikrosomy a inhibiční studie.

V případě indukce bylo pracováno s mikrosomy izolovanými ze zvířat premedikovaných specifickými induktory jednotlivých forem CYP. Potkani byly premedikováni fenobarbitalem, Sudanem I, ethanolem a pregnenolon-16 α -karbonitrilem (PCN). Jako kontrola sloužily mikrosomy izolované z nepremedikovaných zvířat. Tyto mikrosomy byly poskytnuty laboratoří katedry Biochemie, Univerzity Karlovy v Praze. Koncentrace CYP v daných mikrosomálních preparátech a indukce formy konkrétního CYP je uvedena v Tab. 2.

Tab. 2: *Koncentrace indukovaných CYP v mikrosomálních preparátech.*

Mikrosomy	Koncentrace CYP [μ M]	Indukce CYP
kontrolní	16,4	-
Sudan I	33,1	1A
ethanol	16,7	2E1
PCN	62,0	3A
fenobarbital	20,9	2B, 2C

Složení inkubační směsi o výsledném objemu 500 μ l bylo následující:

- ✓ 0,5 μ M CYP
- ✓ 50 μ M EE2 (10 mM zásobní roztok v DMSO)
- ✓ 10 mM MgCl₂, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP⁺, 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-generující systém)
- ✓ 100 mM fosfátový pufr (pH 7,4: 100 mM KH₂PO₄)

Postup přípravy inkubační směsi je analogický postupu uvedenému v kap. 4.3. Kontrolní vzorky neobsahovaly NADPH-generující systém nebo obsahovaly pouze EE2 a pufr či mikrosomy inaktivované povařením (*termostat LS-1, 2 hodiny, 100 °C*). Reakce byla zahájena přidáním 50 μ l NADPH-generujícího systému. Následný postup je totožný s postupem uvedeným v kap. 4.2.5.

V případě inhibičních studií byly použity specifické inhibitory konkrétních forem CYP, které jsou uvedené v Tab. 3 včetně rozpouštědla, ve kterém byly rozpuštěny. Složení inkubační směsi o výsledném objemu 500 μ l bylo následující:

- ✓ 0,5 μ M CYP
- ✓ 50 μ M EE2 (10 mM zásobní roztok v DMSO)
- ✓ 50, 100, 500 μ M inhibitor^{Tab. 3}
- ✓ 10 mM MgCl₂, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP⁺, 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-generující systém)
- ✓ 100 mM fosfátový pufr (pH 7,4: 100 mM KH₂PO₄)

Tab. 3: Přehled použitých inhibitorů CYP včetně příslušného rozpouštědla a inhibované isoformy CYP.

Inhibitor	Rozpouštědlo	Inhibovaná isoforma CYP
α -naftoflavon	methanol:ethylacetát (2:3)	1A
adamantan	methanol	2B
sulfafenazol	ethanol	2C
diethyldithiokarbamát	voda	2A,2E1
ketokonazol	ethanol	3A

Postup přípravy inkubační směsi je analogický postupu uvedenému v kap. 4.3. Následný postup je totožný s postupem uvedeným v kap. 4.2.5

V další části práce byl podrobněji zkoumán mechanismus inhibice metabolismu EE2. Inkubační směsi připravené podle podmínek uvedených výše byly rozděleny na dvě sady. První sada, která obsahovala MF a inhibitor, byla 10 minut preinkubována s NADPH-GS a následně po přidání EE2 15 minut inkubována podle výše uvedených podmínek. Druhá sada vzorků byla nejprve preinkubována 10 minut (MF a inhibitor) bez NADPH-GS a po preinkubaci byl NADPH-GS přidán spolu s EE2 a směs byla 15 minut inkubována jako předchozí sada. Následný postup je totožný s postupem uvedeným v kap. 4.2.5.

4.3.3 Metabolismus 17 α -ethinylestradiolu potkaními rekombinantními cytochromy P450 v Supersomech™

Při studiu metabolismu EE2 Supersomy™ měly inkubační směsi objem 250 μ l a složení bylo následující:

- ✓ 50 pmol CYP
- ✓ 50 μ M EE2 (10 mM zásobní roztok v DMSO)
- ✓ 10 mM NADPH
- ✓ 100 mM fosfátový pufr (*pH 7,4: 100 mM KH₂PO₄*)

Vzorky byly inkubovány 30 min za stálého třepání (*Thermomixer Compact, 450 RPM*) při 37°C a za přístupu vzduchu. Reakce byla ukončena přidáním 1 ml ethylacetátu a intenzivním protřepáním. Do všech směsí bylo přidáno 5 μ l 1 mM roztoku fenacetinu v methanolu. Inkubační směs byla extrahována dvakrát intenzivním třepáním 5 minut (*Thermomixer Compact, 1400 RPM*). Po extrakci byla směs 2 minuty sonikována a centrifugována (*Centrifuga 5418, 12000 RPM*). Následný pracovní postup byl totožný s postupem uvedeným v kapitole 4.2.5.

4.3.4 Separace metabolitů 17 α -ethinylestradiolu vysokoučinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)

Metabolity EE2 (kapitoly 4.1, 4.2 a 4.3) byly separovány vysokoučinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na obrácené fázi s UV/VIS detekcí. Vzorky byly rozpuštěny v 50 μ l acetonitrilu, nástřik vzorku na kolonu činil 30 μ l a jednotlivé látky byly separovány na koloně Nucleosil C 18 HD (250 x 4,6 mm, velikost částic kolony 5 μ m, předkolonka C18) za použití gradientové eluce s měnící se průtokovou rychlostí mobilní fáze. Složení mobilní fáze odpovídalo (A) 20 % ACN a (B) 80 % ACN. Gradient probíhal následně: 0 min 10 % (B) průtok 0,8 ml. min⁻¹, 25 min 50 % (B) 1 ml. min⁻¹, 30 min 100 % (B) 1 ml. min⁻¹, 37 min 10 % (B) 0,8 ml. min⁻¹, 40 min 10 % (B) průtok 0,8 ml. min⁻¹. Analýza vzorku trvala 40 min a probíhala při teplotě 35 °C. Mobilní fáze byla připravena do skleněných lahví a před použitím byla sonikována v ultrazvukové lázni kvůli odstranění vzduchu. Látky obsažené v extraktech byly detekovány při vlnové délce 280 nm a jejich plocha byla vztažena k ploše píku vnitřního standardu fenacetinu jako korekce extrakce.

Standard EE2 a fenacetinu o objemu 50 μ l v ACN obsahoval 6,8 mM roztok EE2 v DMSO a 1 mM roztok fenacetinu v metanolu. Před analýzou byl standard promíchán a stočen.

4.4 Studium vlivu 17 α -ethinylestradiolu na metabolismus vybraných přirozených hormonů

4.4.1 Vliv 17 α -ethinylestradiolu na metabolismus testosteronu

Pro studium vlivu EE2 na metabolismus testosteronu byly použity jaterní mikrosomy z nepremedikovaných potkanů. Reakční směsi byly připraveny v paralelních vzorcích za podmínek uvedených v kapitole 4.3.

Složení reakčních směsí bylo následující:

- ✓ 0,5 μM CYP
- ✓ 50 μM EE2 (10 mM zásobní roztok v DMSO)
- ✓ 50 μM testosteron (10 mM zásobní roztok v CH_3OH)
- ✓ 10 mM MgCl_2 , 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP^+ , 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-generující systém)
- ✓ 100 mM fosfátový pufr (*pH 7,4: 100 mM KH_2PO_4*)

Kontrolní inkubační směs neobsahovala NADPH-generující systém nebo obsahovala pouze testosteron, EE2 a pufr. Připravena byla i směs bez přídavku EE2 a reakční směs, která obsahovala místo EE2 rozpouštědlo DMSO. Reakce byla zahájena přidáním 50 μl NADPH-generujícího systému do každé směsi. Inkubace probíhala 15 minut, za stálého třepání, při 37 °C za přístupu vzduchu (*Thermomixer compact, 450 RPM*). Pro stanovení vlivu EE2 na aktivitu CYP3A byly v dalších experimentech mikrosomy preinkubovány (10 min, 37 °C) s 50 μM EE2 v přítomnosti nebo bez NADPH-GS.

Probíhající reakce byla následně ukončena přidáním 100 μl vodného roztoku 1 M Na_2CO_3 -2 M NaCl a intenzivním protřepáním. Po přídavku 1 ml dichlormethanu bylo do všech směsí přidáno 5 μl 1 mM roztoku fenacetinu v methanolu. Inkubační směsi byly převedeny do skleněných centrifugačních zkumavek a extrahovány dvakrát 1 ml dichlormethanu a třepáním 5 minut (*Yellow line os 2 basic, rychlost 6*). Směs byla následně 1 minutu sonikována a centrifugována (*EBA 270, Hettich, 5min, 4000 RPM*). Dolní organická fáze byla odebrána do čisté mikrozkuhavky a odpařena do sucha na vakuové odparce. Vzorky byly před analýzou HPLC rozpuštěny v 30 μl methanolu, sonikovány 2 minuty a stočeny (*SpectrafugeTM Mini centrifuga, 10 s*).

4.4.2 Vliv 17 α -ethinylestradiolu na metabolismus progesteronu

Ke studiu vlivu EE2 na metabolismus progesteronu byly použity kontrolní potkaní mikrosomy. Postup přípravy inkubačních směsí byl analogický s postupem uvedeným v kapitole 4.4.1.

Složení inkubační směsi o výsledném objemu 500 μl bylo následující:

- ✓ 0,5 μM CYP
- ✓ 50 μM EE2 (10 mM zásobní roztok v DMSO)
- ✓ 50 μM progesteron (10 mM zásobní roztok v CH_3OH)
- ✓ 10 mM MgCl_2 , 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP^+ , 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-generující systém)
- ✓ 100 mM fosfátový pufr (pH 7,4: 100 mM KH_2PO_4)

Kromě výše uvedené směsi byla použita i kontrolní inkubační směs, která neobsahovala NADPH-generující systém a směs která obsahovala pouze progesteron a pufr. Další inkubační směs byla připravena bez přídavku EE2 a kontrolní reakční směs obsahovala místo EE2 rozpouštědlo DMSO. Reakce byla zahájena přidáním 50 μl NADPH-generujícího systému a postup inkubace, preinkubace, terminace reakce a následné extrakce je totožný s postupem uvedeným v kapitole 4.4.1.

4.4.3 Separace metabolitů testosteronu a progesteronu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)

Metabolity testosteronu a progesteronu obsažené v extraktech byly separovány a jejich obsah stanoven vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na obrácené fázi (*Dionex pump P580, ASI-100 Automated Sample Injector*). Nástřík vzorku na kolonu činil 20 μl a jednotlivé látky byly separovány na koloně Nucleosil C18 (250 x 4,6 mm, velikost částic kolony 5 μm , předkolonka C18) za použití izokratické eluce s konstantním průtokem mobilní fáze a to 0,7 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ pro testosteron a 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ pro progesteron. Složení mobilní fáze bylo následující: 75 % methanol a 25 % destilovaná voda. Analýza trvala 25 min a probíhala při teplotě 35 $^\circ\text{C}$. Mobilní fáze byla připravena do skleněných lahví a před použitím byla sonikována v ultrazvukové lázni. Látky obsažené v extraktech byly detekovány při vlnové délce 254 nm a jejich plocha byla vztažena k ploše píku vnitřního standardu fenacetinu.

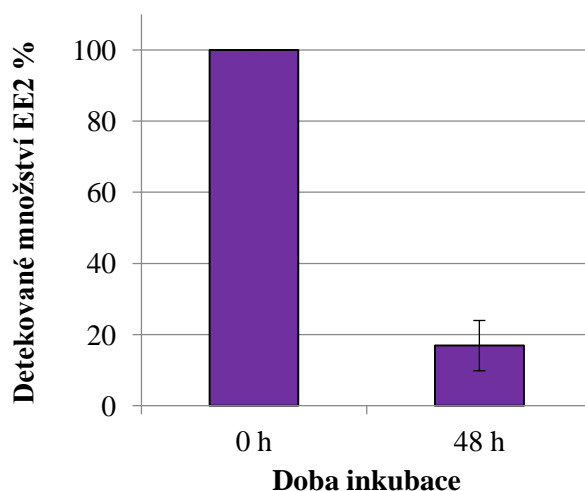
Standard EE2 a fenacetinu obsahoval 6,8 mM roztok EE2 v DMSO a 1 mM roztok fenacetinu v methanolu. Standard testosteronu/progesteronu obsahoval 10 mM roztok příslušného hormonu. Komerční standardy metabolitů testosteronu, 6 β -hydroxytestosteronu a 16 α -hydroxytestosteronu, byly připraveny z 2 mM zásobních roztoků a standard komerčního derivátu 16 α -hydroxyprogesteronu byl připraven z 1 mM zásobního roztoku. Před analýzou byl standard promíchán a stočen.

5 Výsledky

5.1 Studium metabolismu 17 α -ethinylestradiolu modelovým organismem *P. ostreatus*

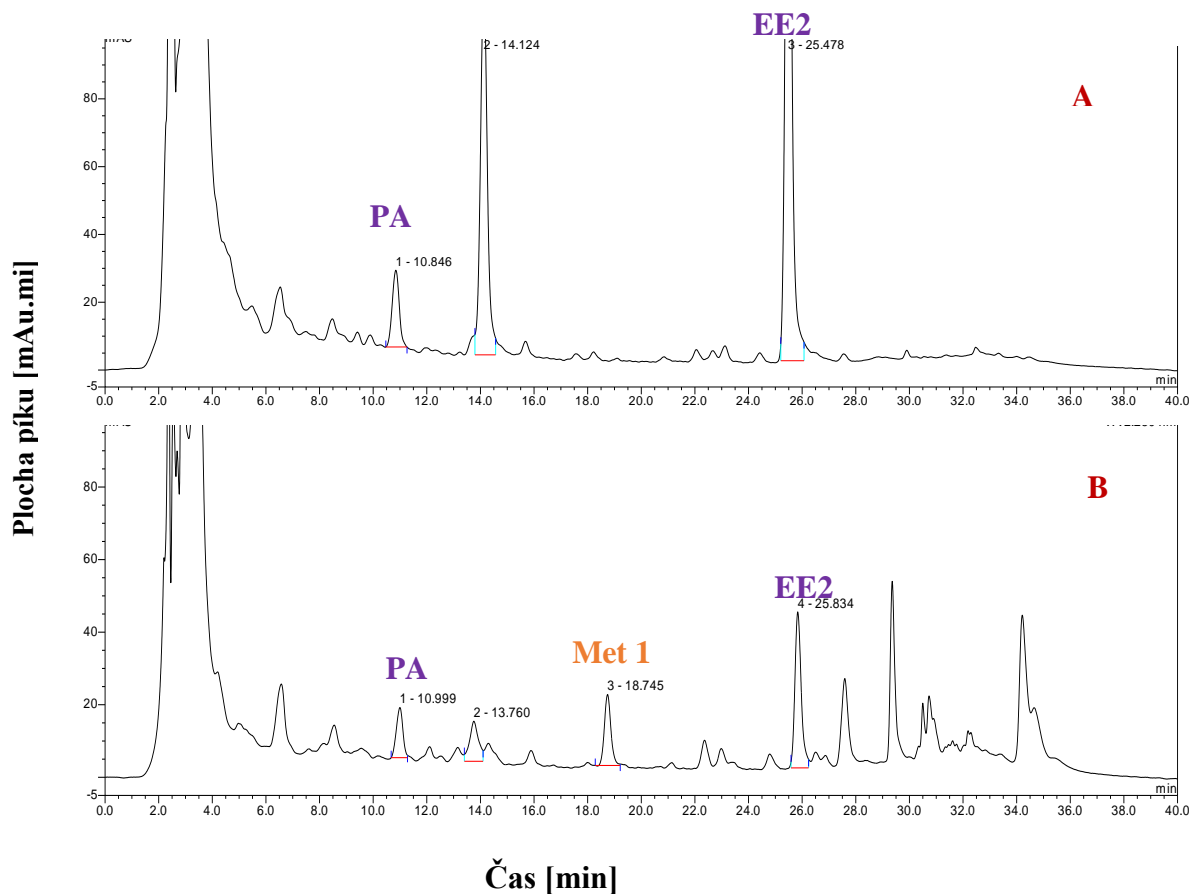
5.1.1 Degradace 17 α -ethinylestradiolu *in vivo*

Bylo zjištěno, že EE2 je houbou *P. ostreatus* degradován v podmínkách *in vivo*. Po 2 dnech inkubace bylo v kultivačním médiu (kap. 4.1.3) detekováno pouze 17 % EE2 jak ukazuje Obr. 8.



Obr. 8: Úbytek EE2 v kultivačním médiu po 48 hodinách inkubace.

Časová závislost degradace EE2 v podmínkách *in vivo* byla sledována v rámci bakalářské práce ¹³⁸, kde byl potvrzen úbytek EE2 v závislosti na čase inkubace. S cílem nalézt metabolity EE2, vznikající v podmínkách *in vivo*, byla v rámci diplomové práce zvolena 24 hodinová a 48 hodinová kultivace. Po separaci HPLC byl nalezen jeden metabolit EE2 (Obr. 9 str. 49). EE2 byl eluován v 25 minutě a PA v 11 minutě analýzy. Met 1, který se nevyskytoval v žádném kontrolním vzorku, měl retenční čas 18 min.

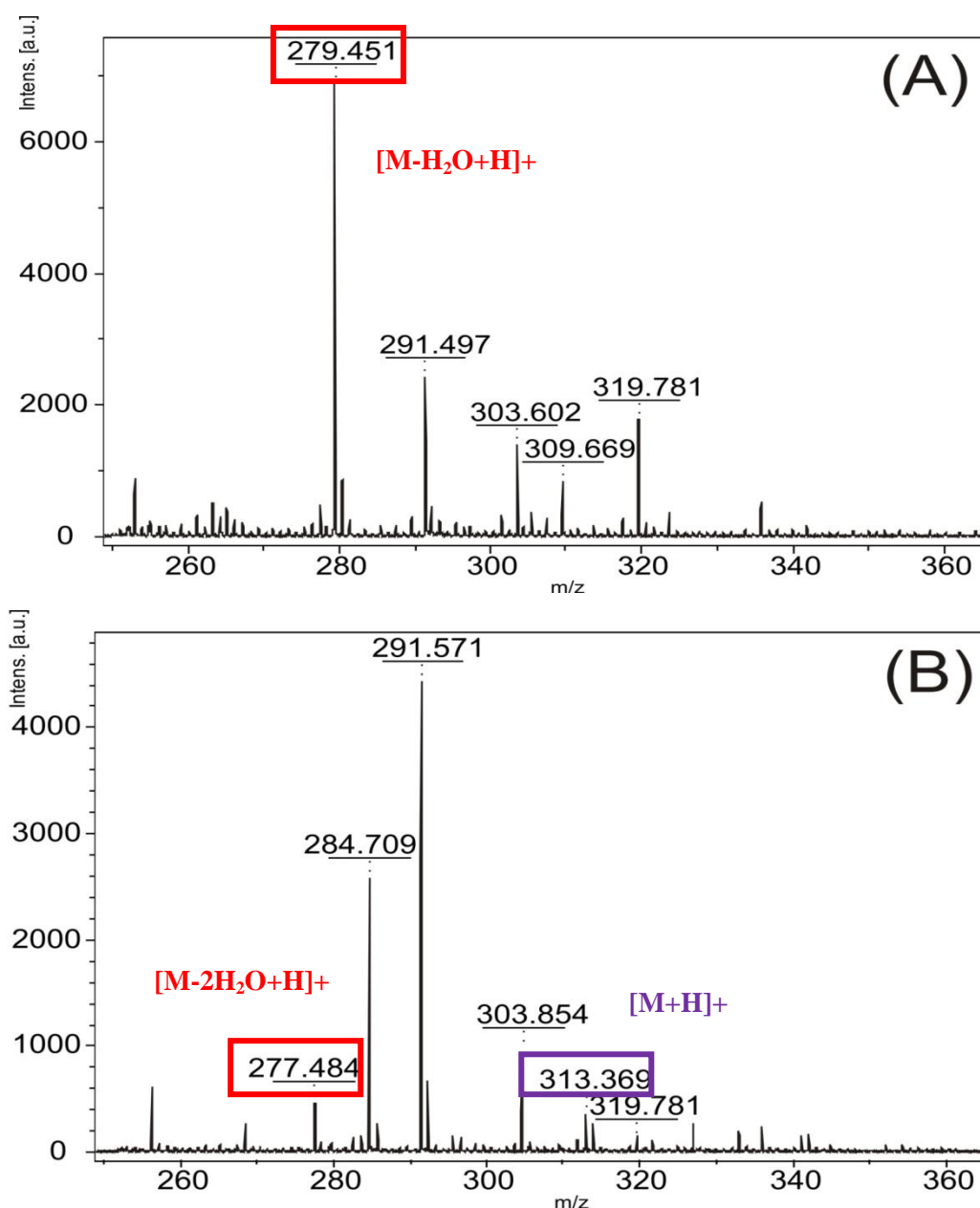


Obr 9: HPLC chromatogram kontrolního vzorku (A) a vzorku *in vivo* 24 hodinové inkubace EE2 s kulturou *P. ostreatus* (B). V grafu je patrná shoda píku odpovídající EE2 v 25 minutě a fenacetin (PA) v 11 minutě (A i B).

Jak ukazuje Obr. 9 ve vzorku *in vivo* 24 hodinové inkubace EE2 s kulturou *P. ostreatus* se objevují nové píky, z toho v 18 minutě Met 1. Pík 2 ve 14 minutě se vyskytoval u všech kontrolních vzorků a i u extraktů z kultivačního média (kap. 5.1.1). Jeho nízká tvorba u vzorku *in vivo* 24 hodinové inkubace EE2 s kulturou *P. ostreatus* může značit jeho přeměnu do některé z látek nacházející se za EE2. Ostatní píky se vyskytovaly v kontrolních vzorcích a jedná se nejspíše o části biologického materiálu.

5.1.2 Identifikace metabolitu

Identifikace metabolitu EE2, který byl získán z experimentu *in vivo* (kap. 5.1.1) byla provedena doc. RNDr. Miroslavem Šulcem, Ph.D. za použití hmotnostní spektrometrie NALDI-ToF/ToF. Met 1 byl identifikován jako hydroxylovaný EE2.



Obr. 10: Hmotnostní spektrum EE2 (A) a Met 1 OH-EE2 (B) vytvořeného houbou *P. ostreatus* *in vivo* a identifikováno NALDI-ToF-MS. Červeně jsou zobrazeny molekulové ionty s navázaným H⁺ a s odštěpenou molekulou H₂O. Fialově je vyznačen iont OH-EE2 s navázaným H⁺.

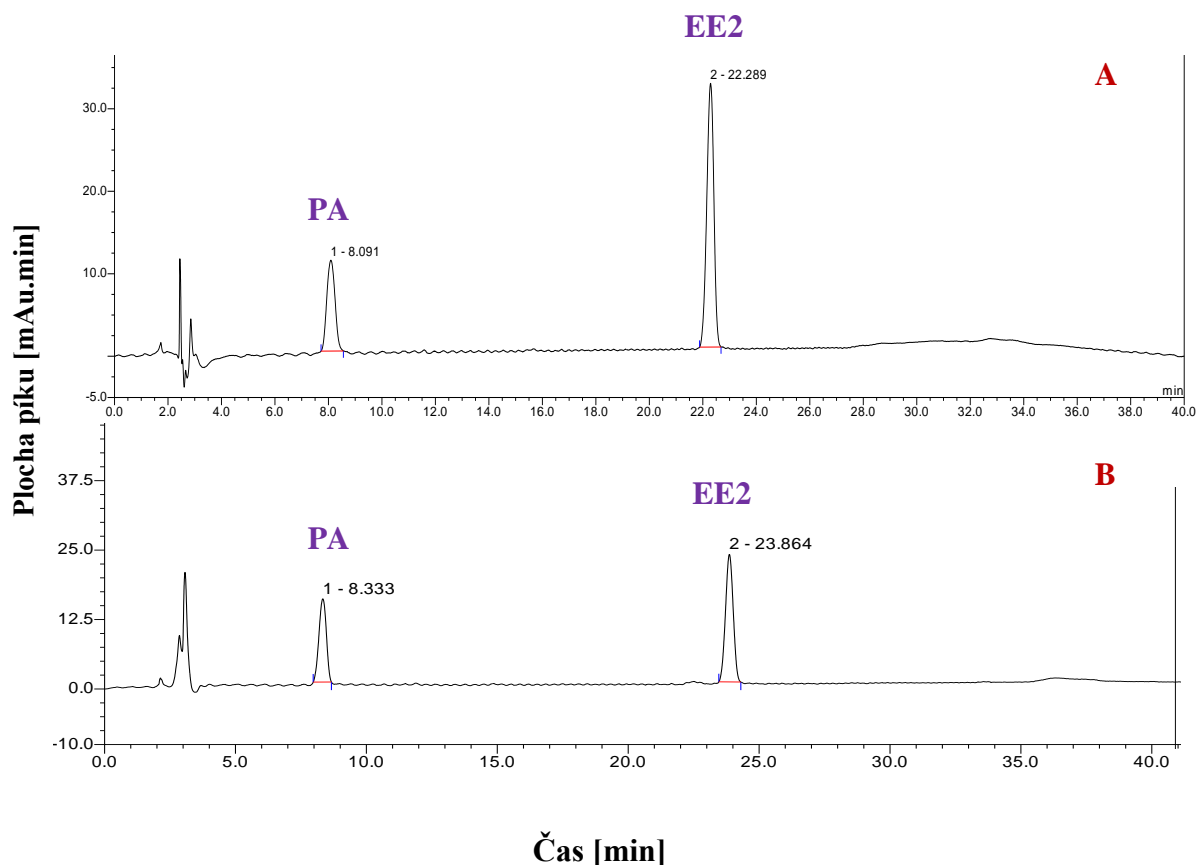
Obr 10, str. 50 zobrazuje hmotností spektrum standardu EE2 a jeho hydroxylovaného metabolitu. Na Obr. 10 (A) je vyznačen majoritní signál, který odpovídá molekulovému iontu 279,45 substrátu EE2 po fragmentaci molekuly vody $[M-H_2O+H]^+$. Ostatní píky odpovídají pozadí NALDI terčíku. Podobně jako v případě substrátu byl nalezen na Obr. 10, str. 50 (B) pík, který svojí hmotností 277,48 odpovídá molekulovému iontu OH EE2 s navázaným vodíkem po ztrátě dvou molekul vody $[M-2H_2O+H]^+$. Molekulový pík s hmotou 313,37 odpovídá OH EE2 s navázaným atomem vodíku $[M+H]^+$. Podobné výsledky poskytlo i kontrolní měření MS provedené s MALDI ionizací s DHB matricí provedené doc. RNDr. Miroslavem Šulcem, Ph.D. na AV, ČŘ, v.v.i.

5.1.3 Degradace 17 α -ethinylestradiolu *in vitro*

Při studiu metabolismu EE2 ligninolytickou houbou *P. ostreatus in vitro* bylo pracováno s MF izolovanou z mycelia, která byla/nebyla vystavena působení EE2 při kultivaci. Izolace MF byla provedena postupem optimalizovaným v rámci předchozí bakalářské práce¹³⁸. MF byla izolována ze 14 denní kultury houby *P. ostreatus*. Byla získána MF nevystavená působení EE2 (MF_K) a frakce exponovaná EE2 (MF_{EE2}). MF byla charakterizována stanovením koncentrace CYP a koncentrace proteinů.

Koncentrace cytochromu P450 v izolované MF_K byla $2,50 \pm 0,22 \mu\text{M}$ a u MF_{EE2} $1,92 \pm 0,22 \mu\text{M}$. Koncentrace proteinů byla $24,19 \pm 0,70 \text{ mg/ml}$ u MF_K a $25,48 \pm 0,93$ u MF_{EE2}.

Degradace EE2 mikrosomálním systémem houby *P. ostreatus* byla studována v předchozích experimentech v rámci bakalářské práce¹³⁸. Postup analýzy vzorku ale nezahrnoval extrakci ethylacetátem a nebyly nalezeny žádné metabolity EE2. Pozorován byl pouze úbytek EE2 v inkubačních směsích nezávisle na použité mikrosomální frakci. V rámci diplomové práce bylo přistoupeno k dalším degradačním experimentům s cílem ověřit přeměnu EE2 *in vitro* a blíže prozkoumat mechanismus přeměny EE2. Pro separaci EE2 byla vyvinuta HPLC metoda, popsána v kap. 4.3.4. HPLC chromatogram standardu je zobrazen na Obr. 11 (A), str. 52.



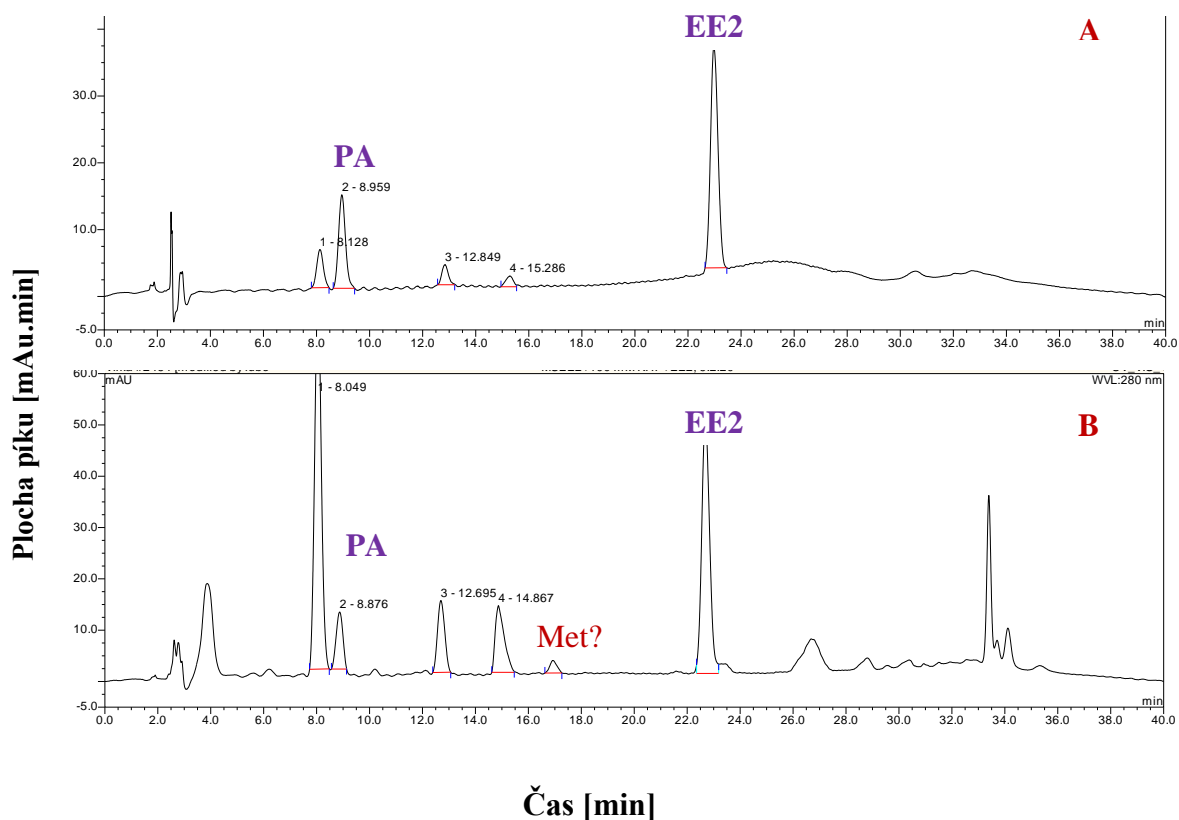
Obr. 11: HPLC chromatogram standardu EE2 a fenacetimu (PA) při použití metody uvedené v kap. 4.3.4, teplota 35°C, detekce 280 nm (A) a HPLC chromatogram vzorku MF houby *P. ostreatus* s EE2 a GS (B). Za daných experimentálních podmínek nebyla pozorována změna oproti kontrolním vzorkům.

Jako vnitřní standard byl použit PA. Detekce probíhala při vlnové délce 280 nm. EE2 byl eluován v retenčním čase 23 minut a PA v čase 8 minuty.

Za daných experimentálních podmínek enzymy mikrosomální frakce houby *P. ostreatus* nekatalyzovaly přeměnu EE2 za přítomnosti NADPH. Metabolity EE2 nebyly pozorovány (Obr. 11, B). Inhibitory houbových CYP 1-ABT a PBi neměly vliv na charakter spektra.

5.1.3.1 Degradace 17 α -ethinyloestradiolu *in vitro* a vliv kumen hydroperoxidu

Protože peroxidy mohou být alternativní donory kyslíku v katalytickém cyklu CYP (viz str. 24), byl do inkubačních směsí místo NADPH přidán KHP. Na Obr. 12 jsou uvedeny chromatogramy znázorňující analýzu kontrolního vzorku s kumen hydroxyperoxidem (KHP) a inkubační směsi obsahující MF_{EE2} v přítomnosti KHP. Pík, vyznačený na Obr. 12 B, který se v kontrolních vzorcích nevyskytoval, by mohl být metabolit EE2.



Obr. 12 : HPLC chromatogram kontroly s KHP (A) a vzorku obsahující MF_{EE2} houby *P. ostreatus* s KHP (B). Pravděpodobný metabolit EE2 je zvýrazněn červeně. Ostatní píky (1,3,4) A i B nepocházejí z metabolismu EE2 jedná se pravděpodobně o rozpadové látky KHP.

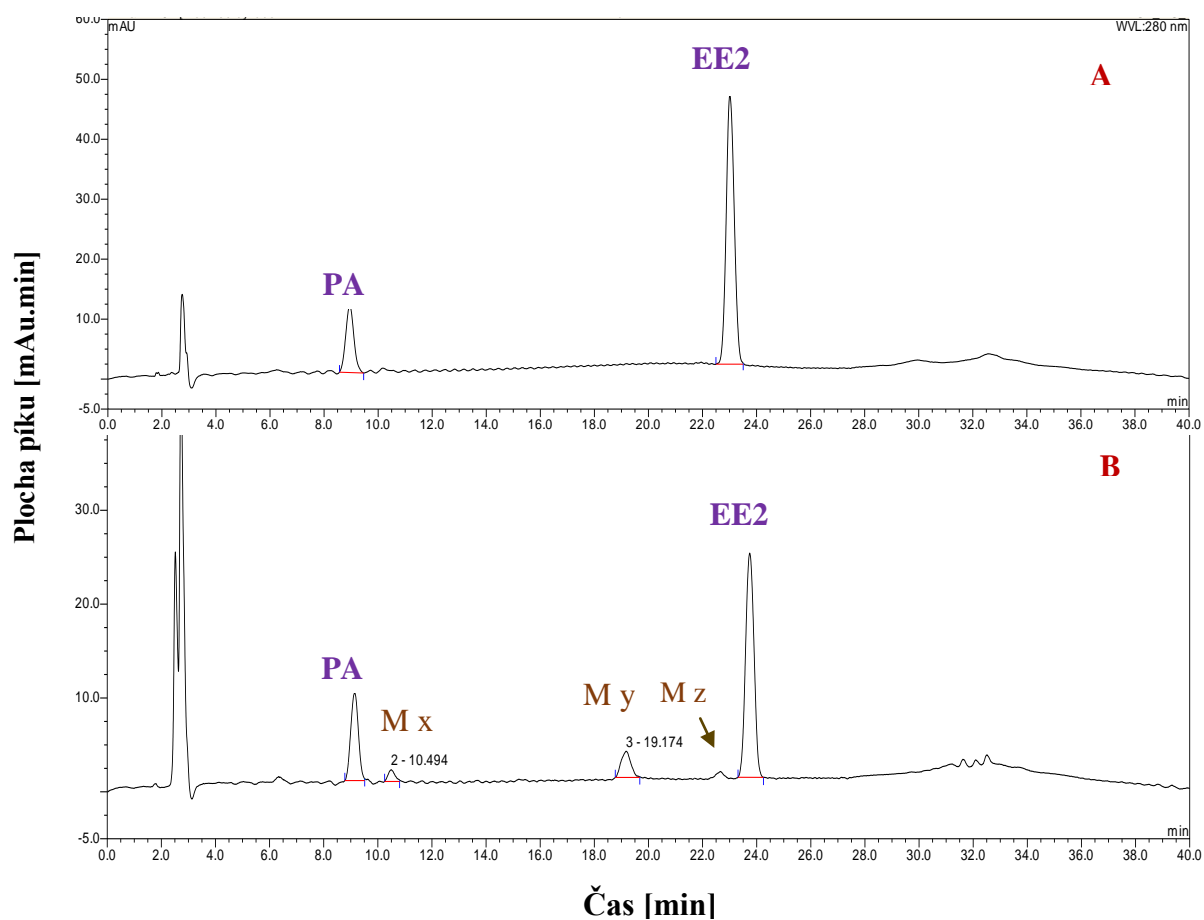
Potvrzení tohoto výsledku by mohla poskytnout analýza UPLC/MS, která v rámci předkládané práce vzhledem k nízké tvorbě tohoto metabolitu nebyla provedena, protože již nebyla k dispozici další izolovaná MF. Z časových důvodů už v rámci diplomové práce nemohlo být přistoupeno ke kultivaci nových houbových kultur houby *P. ostreatus* a k izolaci MF. KHP má tedy vliv na degradaci EE2, ovšem detailnější výsledky jsou předmětem dalšího studia.

5.2 Studium metabolismu 17 α -ethinylestradiolu mikrosomálním systémem laboratorního potkana

Druhým modelovým organismem pro studium metabolismu EE2 v rámci této diplomové práce byl laboratorní potkan. V experimentech bylo pracováno s mikrosomy, kde jsou CYP majoritně zastoupeny. Jako hlavní produkt přeměny EE2 v lidském a potkaním organismu je v literatuře uváděn 2-hydroxyderivát EE2 (viz str. 19). V rámci předkládané diplomové práce byly nalezeny tři metabolity EE2 po inkubaci této sloučeniny s MF v přítomnosti NADPH, které jsou zobrazeny na Obr. 13, str. 55.

Detekce probíhala při vlnové délce 280 nm a EE2 byl eluován za daných experimentálních podmínek ve 23 minutě HPLC analýzy.

Metabolity M_x a M_y měly retenční časy 10 minut a 19 minut (majoritní metabolit y), Obr. 13, str. 55. Majoritní metabolit y se tvořil téměř ve 2,5-krát větším množství, než metabolit x . Třetí metabolit (M_z) pravděpodobně nevzniká transformací CYP, ale neenzymatickou přeměnou EE2, jelikož byl nalezen i v kontrolních vzorcích s mikrosomy.

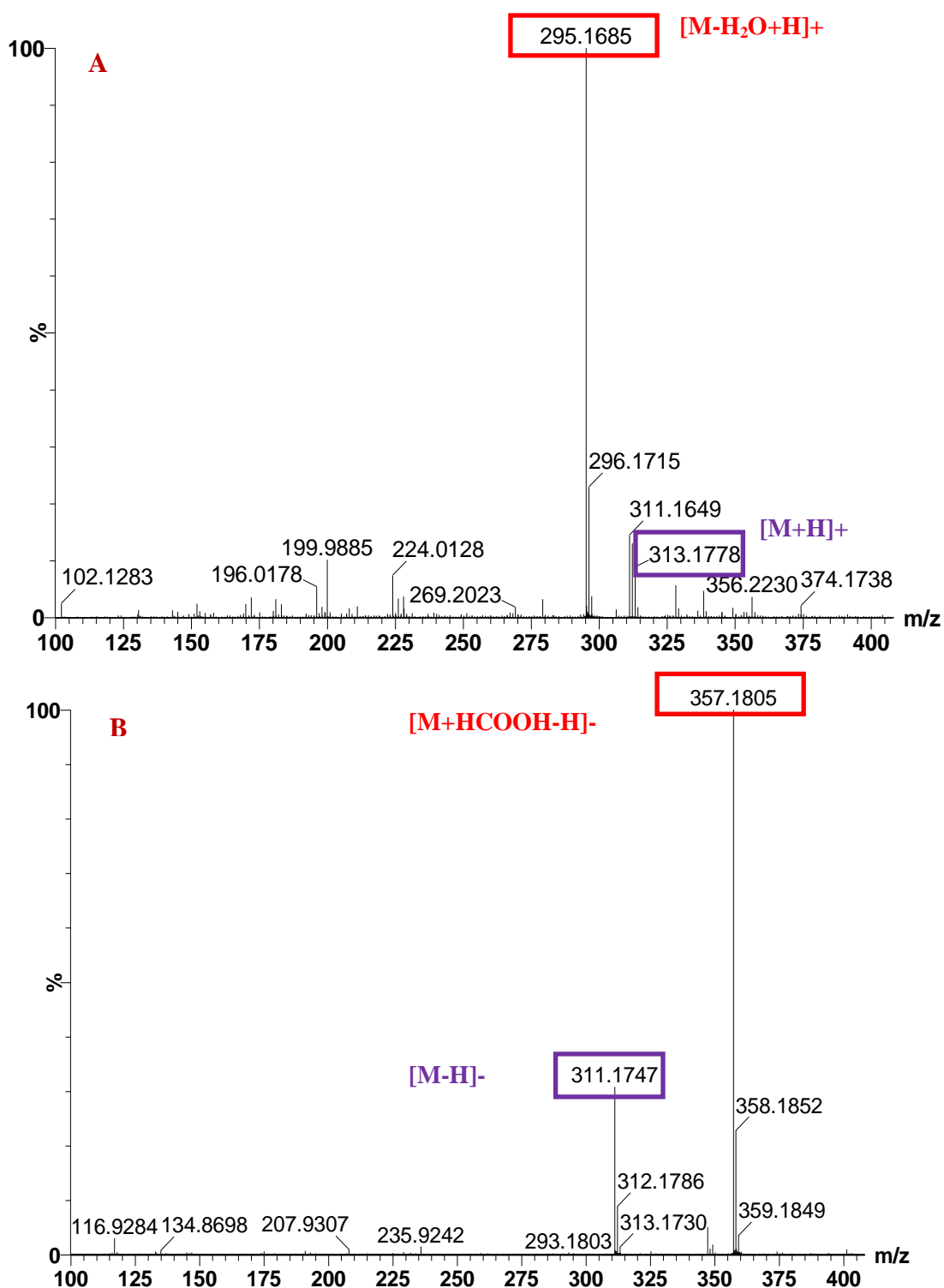


Obr. 13: HPLC chromatogram kontroly (A) a vzorku inkubační směsi obsahující EE2, MF nepremedikovaného laboratorního potkana a NADPH-GS (B). Píky označené M x, M y a M z jsou metabolity EE2. Ostatní píky nepocházejí z metabolismu EE2.

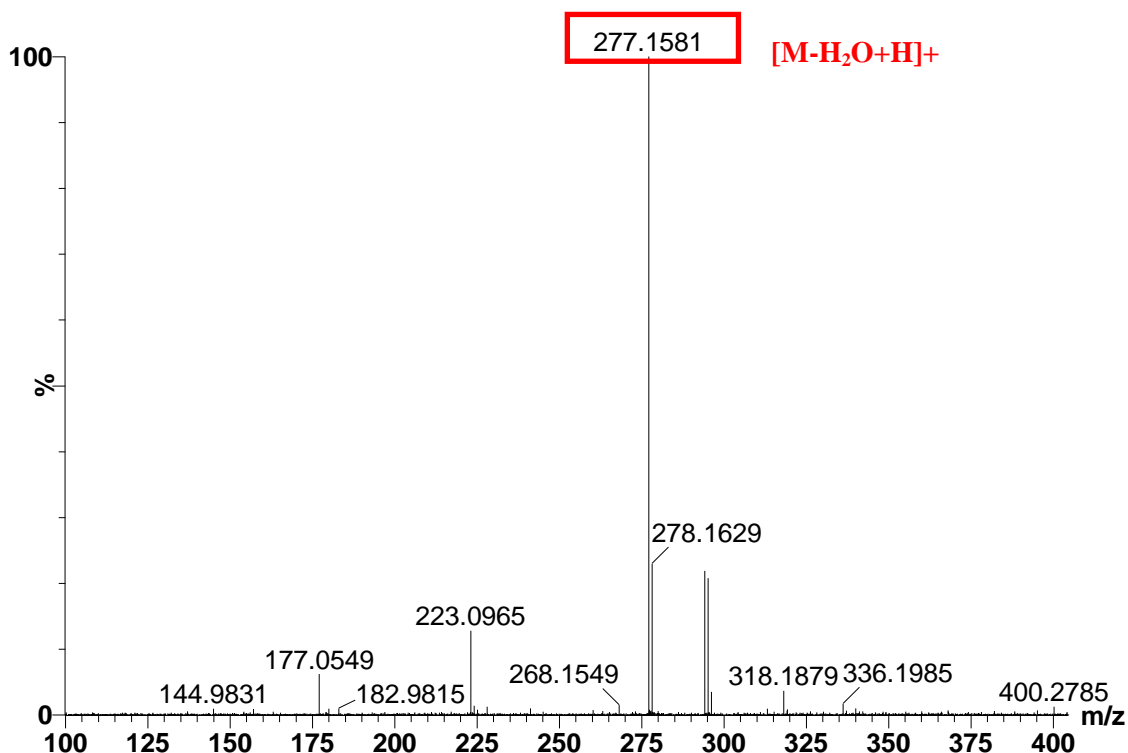
5.2.1 Identifikace metabolitů 17 α -ethinylestradiolu systémem UPLC-MS

Identifikace obou metabolitů EE2 (M_y a M_x) a jednoho transformačního produktu abiotické degradace (M_z) byla realizována metodou UPLC-MS. Měření bylo provedeno RNDr. Terezou Tylovou, Ph.D. na AV ČR, v.v.i. Na základě hmotnostní analýzy byly identifikovány oba metabolity EE2 jako jeho hydroxyderiváty (x -OH EE2) s tím, že se jedná o různé izomery (hmotnostní spektra jsou pro oba metabolity stejná). Obr 14, str. 57 zobrazuje hmotnostní spektrum metabolitu y s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu (ESI+) i v negativním módu (ESI-). Majoritní pík na ose m/z odpovídá svojí hmotností 295,17 molekulovému iontu y -OH EE2 s navázaným vodíkem po fragmentaci molekuly vody $[M-H_2O+H]^+$. Molekulový pík s hmotou 313,18 odpovídá y -OH EE2 s navázaným atomem vodíku $[M+H]^+$ (Obr 14, str. 57 A). Majoritní pík na ose m/z s hmotností 357,18 odpovídá molekulovému iontu y -OH EE2 s navázaným aduktem kyselinou mravenčí a s odštěpeným atomem vodíku $[M+HCOOH-H]^-$. Druhý označený molekulový iont svojí hmotou 311,17 je y -OH EE2 s odštěpeným atomem vodíku $[M-H]^-$ (Obr 14, str. 57 B).

Hmotnostní spektrum třetího transformačního produktu (M_z) s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu (ESI+), který byl nalezen i v kontrolních vzorcích, je zobrazeno na Obr. 15, str. 58. Majoritní pík na ose m/z odpovídá svojí hmotností 277,16 molekulovému iontu EE2-2H s navázaným vodíkem po fragmentaci molekuly vody $[M-H_2O+H]^+$. V negativním módu (ESI-) k ionizaci nedošlo. Tento metabolit byl identifikován jako dehydrogenovaný derivát EE2. Vzhledem k jeho nízké tvorbě, která byla blízko limitu detekce, nebyl tento metabolit dále studován.



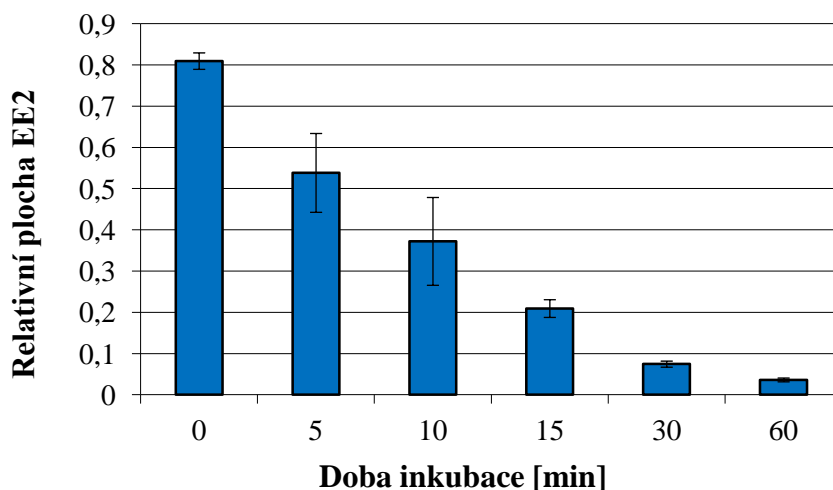
Obr. 14: Hmotnostní spektrum majoritního metabolitu γ -OH EE2 vytvořeného ve vzorku MF laboratorního potkana měřeno ESI+(A) a ESI-(B). Fialově je vyznačena hmota metabolitu s navázaným (A) a s odštěpeným (B) H^+ . Červeně jsou zobrazeny majoritní píky s odštěpenou molekulou H_2O (A) a s navázaným aduktem kyseliny mravenčí (B).



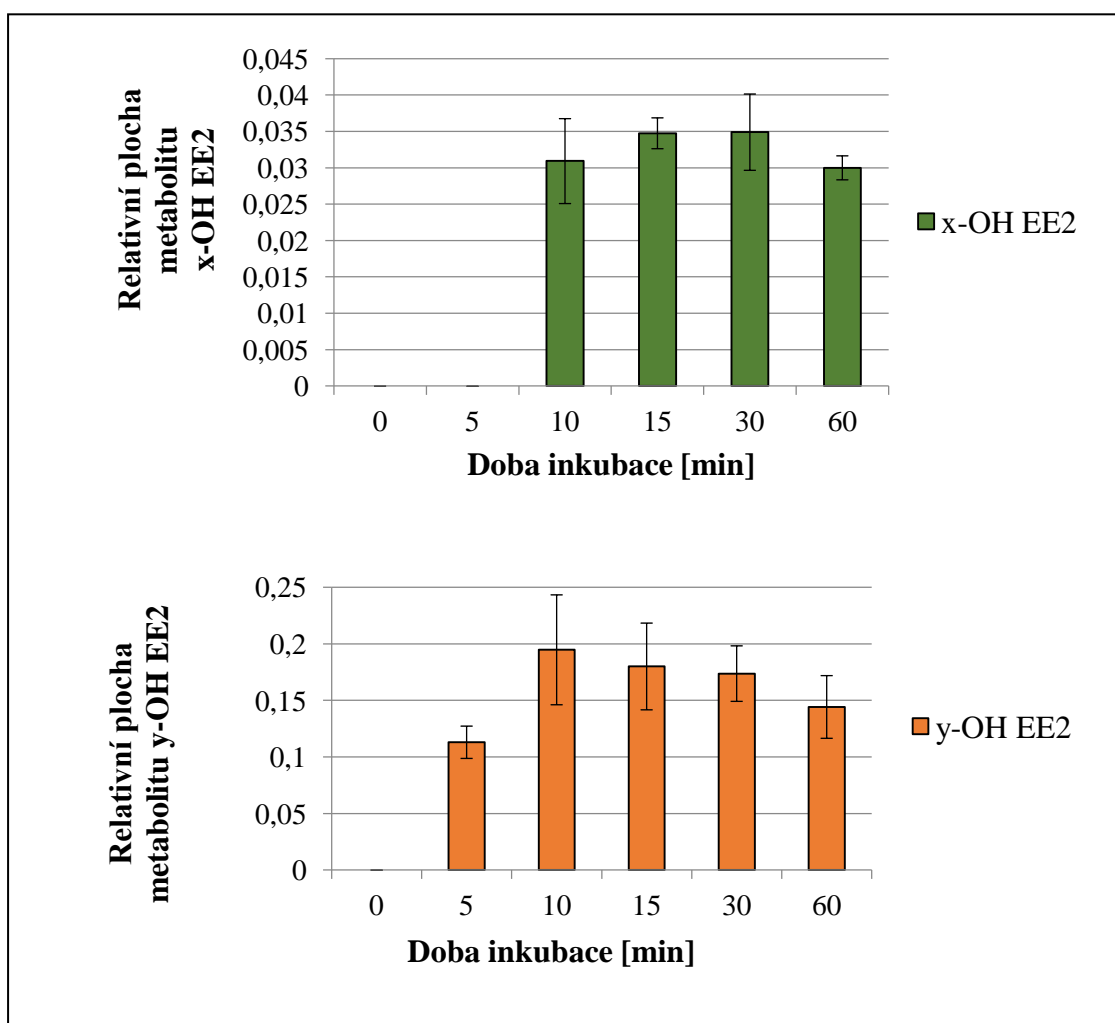
Obr. 15: Hmotnostní spektrum M z vytvořeného ve vzorku MF laboratorního potkana měřeno ESI^+ . Červeně je zobrazen majoritní s pik odštěpenou molekulou H_2O .

5.2.2 Časová závislost přeměny 17α -ethinylestradiolu cytochromy P450 potkaních mikrosomů

Byl sledován vliv doby inkubace na přeměnu EE_2 a tvorbu obou metabolitů (γ -OH EE_2 , α -OH EE_2) mikrosomy nepremedikovaných potkanů po dobu až 60 minut (Obr. 16, str. 59). Z grafu lze určit, že docházelo k lineárnímu úbytku množství EE_2 až do 15 minut inkubace. Na Obr. 17, str. 59 jsou zobrazeny výsledky znázorňující tvorbu obou metabolitů EE_2 v závislosti na době inkubace. Výsledky ukazují, že tvorba obou metabolitů lineárně vzrůstala po dobu 10-15 minut inkubace. Delší doba inkubace se jevila bez vlivu na přírůstek obou metabolitů. Pro další experimenty byla zvolena doba inkubace 15 minut.



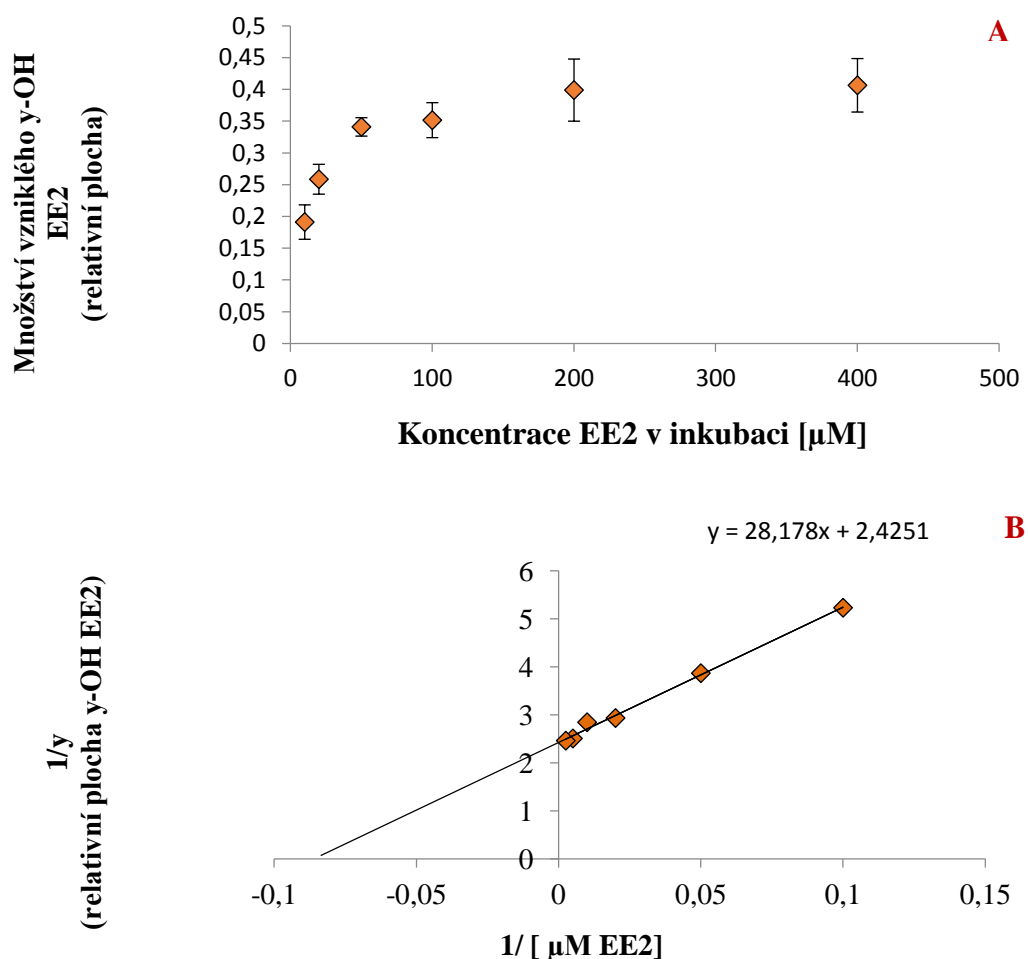
Obr. 16: Časová závislost přeměny EE2 katalyzována CYP potkaních mikrosomů.



Obr. 17: Závislost tvorby metabolitů EE2 (x-OH EE2 nahoře, y-OH EE2 dole) na době inkubace měřeno s mikrosomy nepremedikovaných potkanů.

5.2.3 Určení K_m přeměny 17 α -ethinylestradiolu

Kinetika přeměny EE2 byla studována s použitím mikrosomů nepremedikovaných potkanů za podmínek uvedených v kap. 4.3. Byl sledován přírůstek tvorby hlavního metabolitu γ -OH EE2, vzhledem k jeho vyšší tvorbě. Na Obr. 18 je uvedený graf kinetiky přeměny EE2 a reciprokový výnos daných hodnot. Z reciprokého výnosu dle Lineweavera a Burka byla stanovena Michaelisova konstanta K_m přeměny EE2 jaterními mikrosomy potkana 20 μ M. Pro další experimenty byla zvolena koncentrace substrátu 2,5 x vyšší než K_m (aby byl enzym substrátem nasycen a rychlost reakce udávala aktivitu enzymu) tedy 50 μ M EE2.



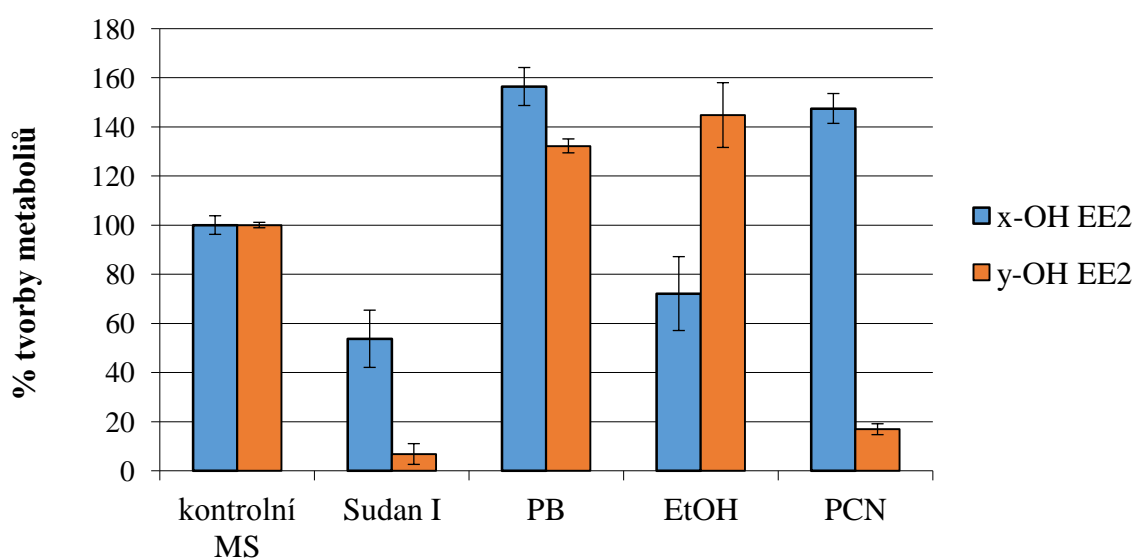
Obr. 18: Kinetika přeměny EE2 nepremedikovanými jaterními mikrosomy v závislosti na koncentraci substrátu 10, 20, 50, 100 200 a 400 μ M (A). Dole (B) je uveden reciprokový výnos daných hodnot, ze kterého byla vypočítána K_m .

5.2.4 Identifikace isoformů cytochromů P450 zodpovědných za metabolismus 17 α -ethinylestradiolu

5.2.4.1 Vliv induktorů cytochromů P450 na metabolismus 17 α -ethinylestradiolu

K identifikaci forem cytochromů P450 podílejících se na metabolismu EE2 byly využity specifické induktory konkrétních forem cytochromů P450. Byly použity mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitolem (indukce podrodiny CYP2B a 2C), Sudanem I (CYP1A), ethanolem (CYP2E1) a pregnenolon-16 α -karbonitrilem (CYP3A). Kontrolní mikrosomy pocházely z nepremedikovaných zvířat. Metabolity EE2 tvořené v inkubačních směsích byly separovány HPLC podle podmínek uvedených v kap. 4.3.4.

Na Obr. 19 je znázorněn vliv induktorů CYP vzhledem ke kontrolním mikrosomům.



Obr. 19: Vliv induktorů cytochromů P450 na tvorbu dvou metabolitů EE2 při použití mikrosomů nepremedikovaných potkanů a premedikovaných Sudanem I (CYP1A) fenobarbitalem (PB), (CYP2B,2C) ethanolem (EtOH) (CYP2E1) a pregnenolon-16 α -karbonitrilem (PCN) (CYP3A).

Jak je z grafu patrné (Obr. 19, str. 61), formace majoritního metabolitu γ -OH EE2 byla zvýšena při použití mikrosomů potkanů premedikovaných ethanolem (CYP2E1) a to o 45 % vzhledem ke kontrole. U mikrosomů premedikovaných PB (CYP2B/C) se jednalo o 32 % nárůst.

Zvýšená tvorba minoritního metabolitu α -OH EE2 byla pozorována při použití mikrosomů potkanů premedikovaných fenobarbitalem (CYP2B/C) a PCN (CYP3A). Nárůst oproti kontrolním mikrosomům je 56% u mikrosomů potkana premedikovaných fenobarbitalem a 47% u mikrosomů potkana premedikovaných PCN. Mikrosomy potkana indukovaného ethanolem a Sudanem I jsou méně účinné oproti kontrolním mikrosomům a tvorba metabolitu α -OH EE2 je zde nižší vzhledem ke kontrolním mikrosomům.

Z dosažených výsledků lze usuzovat, že na metabolismu EE2 se podílejí zejména cytochromy podrodiny 2B, 2C a 2E a částečně též CYP 3A.

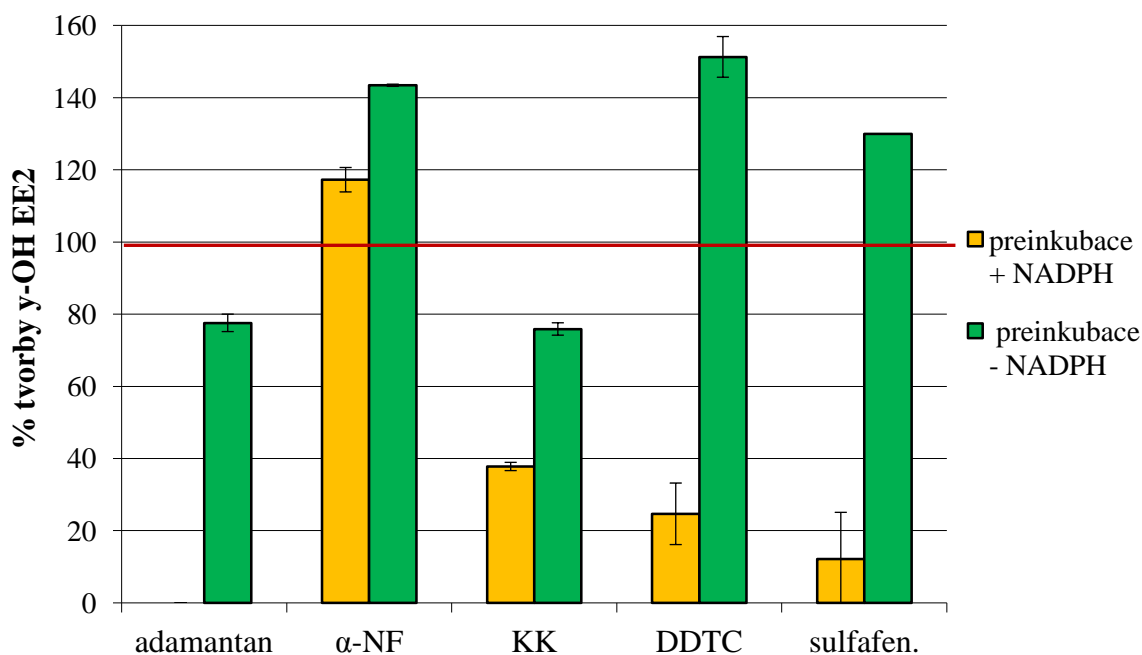
5.2.4.2 Vliv inhibitorů cytochromů P450 na metabolismus 17 α -ethinylestradiolu

Další metodou pro zjištění zapojení konkrétních isoformů CYP podílejících se na metabolismu EE2 bylo použití specifických inhibitorů CYP. Byly vybrány inhibitory CYP1A (α -naftoflavon), 2B (adamantan), 2C (sulfafenazol), 2A/2E1 (diethyldithiokarbamat) a 3A (ketokonazol). K odlišení typu inhibice byly zvoleny dva přístupy. V prvním případě byly inkubační směsi obsahující potkaní jaterní mikrosomy se specifickým inhibitorem 10 minut preinkubovány s NADPH podle podmínek uvedených v kap. 4.3.2. V druhém případě byly preinkubovány mikrosomy s inhibitorem za stejných podmínek jako v prvním případě, ovšem bez přítomnosti NADPH. V obou případech byl EE2 přidán do inkubační směsi po 10 minutové preinkubaci.

Výsledky ukazují (Obr. 20, str. 63), že tvorba majoritního γ -OH EE2 byla inhibována adamantanem a ketokonazolem při použití obou typů protokolů. Při preinkubaci s NADPH byl jejich inhibiční účinek prohlouben, adamantan inhiboval se 100 % účinností, ketokonazol s 63 % účinností vzhledem ke kontrole. Při absenci NADPH během preinkubace inhibovaly oba inhibitory ze 75 % vzhledem ke kontrolám. Ostatní inhibitory (α -naftoflavon, DDTC a sulfafenazol) neovlivnily přeměnu EE2 směrem k tvorbě γ -OH EE2 při preinkubaci mikrosomů bez NADPH, naopak slabě tvorbu tohoto

metabolitu stimulovaly. Po preinkubaci s NADPH inhibovaly DDTC (75 %) a sulfafenazol (82 %) vzhledem ke kontrolám.

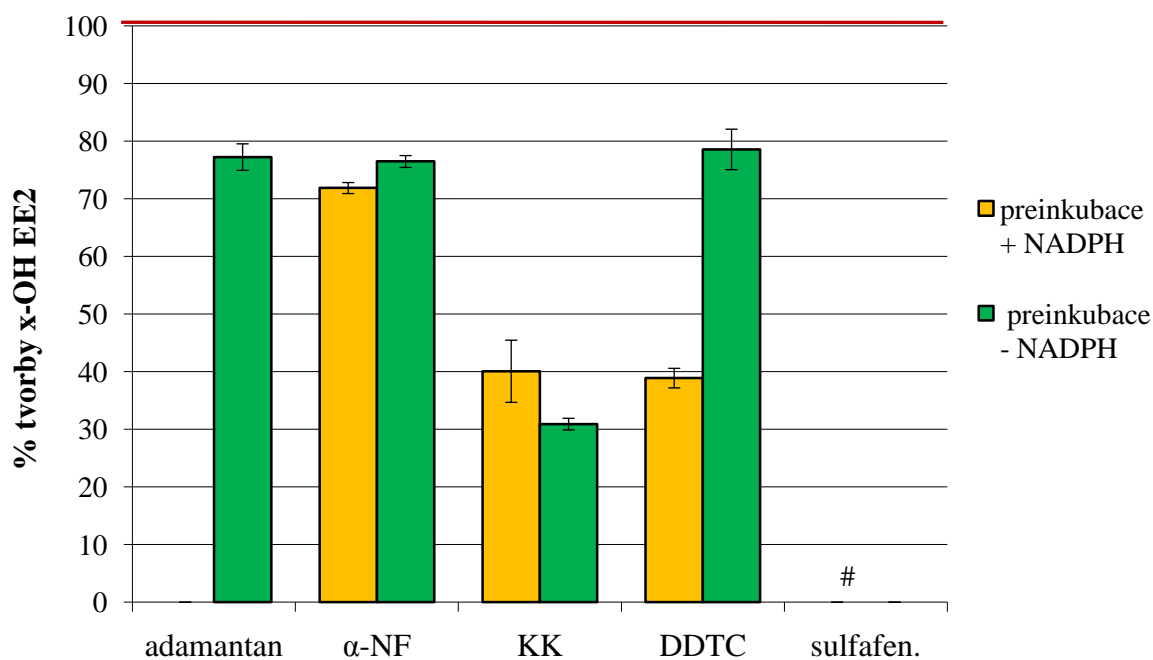
Získané výsledky v této studii ukazují, že CYP2B a 3A by mohly být zapojeny do tvorby metabolitu γ -OH EE2.



Obr. 20: Vliv inhibitorů CYP na tvorbu metabolitu γ -OH EE2 s preinkubací s nebo bez NADPH v potkaních jaterních mikrosomech. Použité inhibitory byly adamantan, α -naftoflavon (α -NF), ketokonazol (KK), diethyldithiokarbamát (DDTC) a sulfafenazol (sulfafen.).

Na obrázku 21, str. 64 jsou uvedeny výsledky ze stejného experimentu pro tvorbu metabolitu α -OH EE2. Všechny použité inhibitory snižovaly tvorbu tohoto metabolitu, avšak s různou účinností. Při preinkubaci v přítomnosti NADPH inhibovaly nejsilněji adamantan (inhibitor CYP2B) a to se 100 % účinností a DDTC (inhibitor CYP2E1) s 61 % účinností. Bez preinkubace s NADPH byla jejich inhibiční schopnost snížena. Toto zjištění je v souladu s možností, že během preinkubace se mohou tvořit reaktivnější metabolity těchto inhibitorů, které inhibují CYP 2B, 2A a 2E1. Ketokonazol (inhibitor CYP3A) a α -naftoflavon (inhibitor CYP1A1) vykazovaly inhibiční účinek při použití obou

typů protokolů. Ketokonazol inhiboval tvorbu x-OH EE2 v obou případech téměř s 60 % účinností, α -naftoflavon pouze s 20 % účinností. To poukazuje na zapojení CYP1A a 3A v procesu tvorby x-OH EE2. V případě použití inhibitoru sulfafenazolu (inhibitor 2C), nemohl být metabolit x-OH EE2 detekován, jelikož při HPLC analýze sulfafenazol a jeho metabolity byly eluovány ve stejném čase jako tento metabolit.



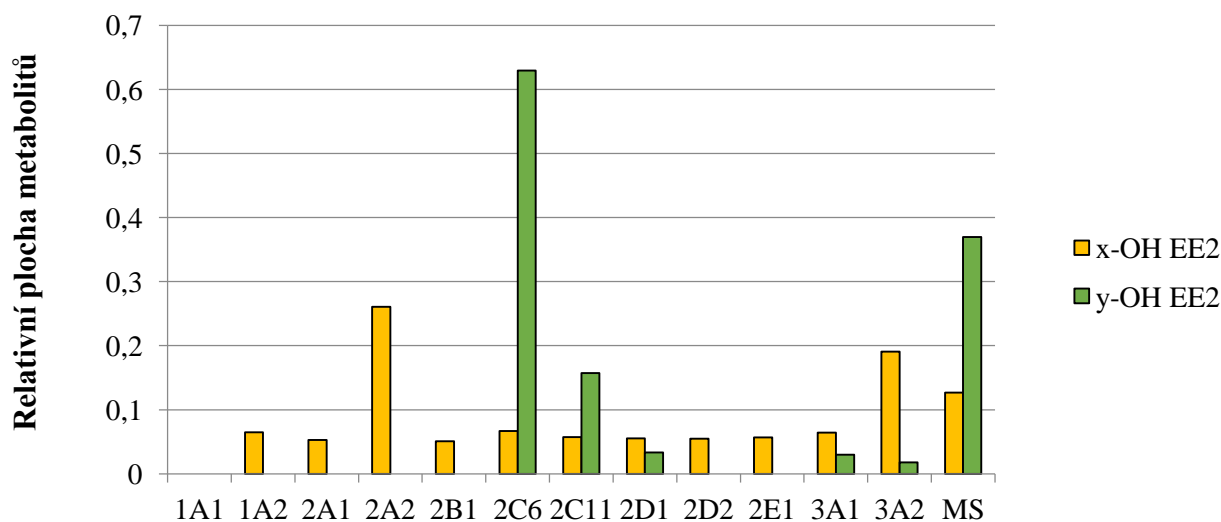
Obr. 21: Inhibice tvorby metabolitu x-OH EE2 vybranými inhibitory CYP při preinkubaci s nebo bez NADPH v potkaních jaterních mikrosomech. Sulfafenazol (#) interferoval s x-OH EE2, nemohla být tedy jeho plocha vyhodnocena.

Výsledky potvrdily roli CYP 3A a zároveň poukázaly i na možnou roli CYP 1A v tvorbě metabolitu x-OH EE2.

5.2.4.3 Oxidace 17 α -ethinylestradiolu potkaními rekombinantními cytochromy P450 Supersomálního™ systému

Dalším přístupem zvoleným pro ověření identifikace CYP participujících na oxidaci EE2 bylo použití potkaních rekombinantních CYP exprimovaných v Supersomech™. Konkrétně byly použity CYP1A1, 1A2, 2A1, 2A2, 2B1, 2C6, 2C11, 2D1, 2D2, 2E1, 3A1, 3A2. Inkubační směsi byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.3.3. V tomto případě probíhala oxidace EE2 s velmi malou účinností (Obr. 22). Efektivita přeměny byla nižší ve srovnání s kontrolními mikrosomy s výjimkou CYP 2A2 a 2C6. Kromě CYP1A1 katalyzovaly hydroxylaci EE2 na minoritní metabolit x-OH EE2 všechny formy cytochromů P450, kdy největší efektivitu vykazovaly formy CYP2A2 a 3A2. Přeměna EE2 na metabolit y-OH EE2 byla pozorována u 2C6/2C11 a částečně 2D1 a 3A1/2. Množství y-OH EE2, katalyzované CYP2C6, bylo téměř dvojnásobné oproti kontrolním mikrosomům.

Výsledky z této části práce ukázaly na roli CYP2C6 a CYP 2C11 v oxidaci EE2 na y-OH EE2 a potvrdily roli CYP3A. V případě metabolitu x-OH EE2 byla potvrzena role CYP2A2 a 3A2. Úloha CYP1A1 a 2B nebyla v tomto experimentu ověřena.



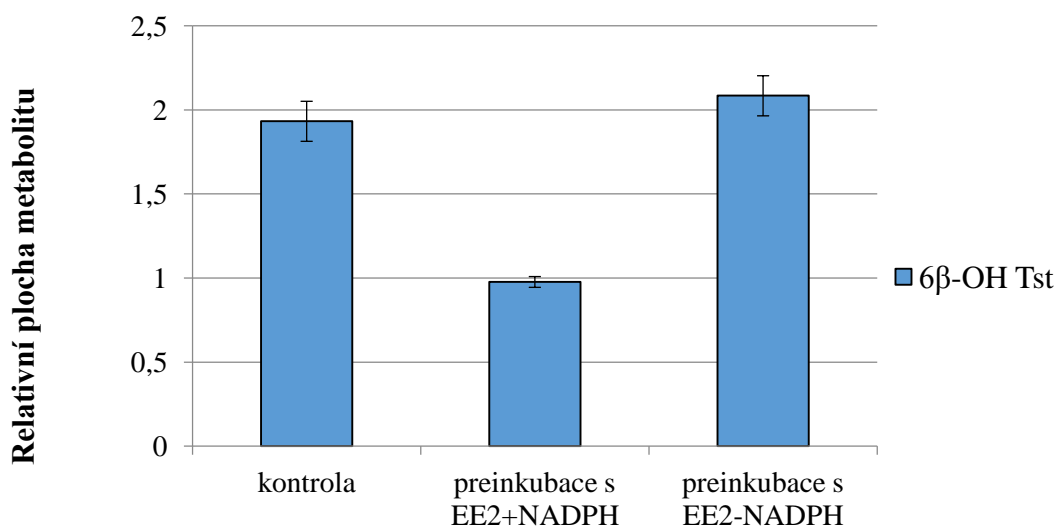
Obr. 22: Oxidace EE2 potkaními rekombinantními cytochromy P450 v Supersomech™ a mikrosomy nepremedikovaných potkanů (MS).

5.3 Studium vlivu 17 α -ethinylestradiolu na metabolismus přirozených hormonů

Dále byl sledován vliv syntetického EE2 na metabolismus dvou vybraných steroidních hormonů testosteronu a progesteronu. 6 β -hydroxylace progesteronu a testosteronu je specifická pro aktivitu CYP3A¹⁴⁴, zatímco 21 α - a 16 α -hydroxylace progesteronu je katalyzována CYP2C¹⁴⁵. Pro studium případné inhibice metabolismu testosteronu a progesteronu EE2 bylo opět využito dvou přístupů. V prvním případě byly mikrosomy preinkubovány s EE2 a NADPH, v druhém případě bez NADPH a testosteron či progesteron byl vždy přidán až po preinkubaci.

5.3.1 Vliv 17 α -ethinylestradiolu na metabolismus testosteronu

Nejprve byl sledován účinek EE2 na 6 β -hydroxylasovou aktivitu mikrosomů nepremedikovaných potkanů. Tato reakce je specifická pro CYP3A. Výsledky (Obr. 23) naznačují, že v případě postupu preinkubace s NADPH dochází k inhibici tvorby metabolitu 6 β -hydroxytestosteronu a to s 50 % účinností. Pokud byly vzorky inkubovány bez přítomnosti NADPH, nebyl shledán vliv EE2 na tuto reakci oproti kontrole.

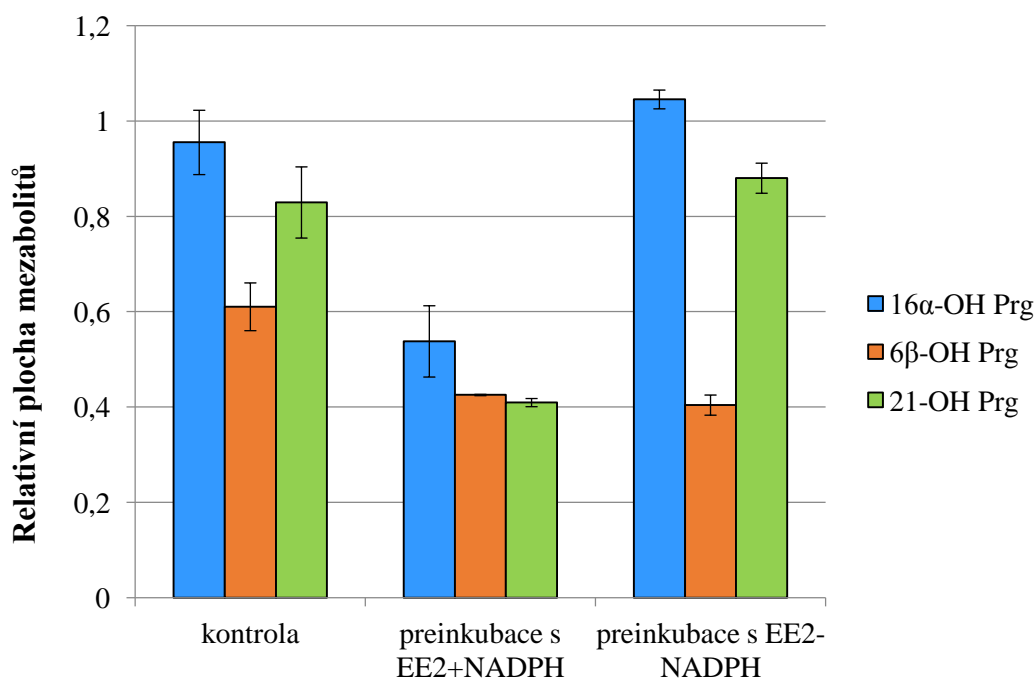


Obr. 23: Vliv přidavku EE2 na 6 β -hydroxylaci testosteronu u jaterních mikrosomů nepremedikovaných potkanů.

Získané výsledky ukazují na skutečnost, že 6 β -hydroxylaci testosteronu mohou inhibovat metabolity EE2, vytvořené při inkubaci EE2 s NADPH a mikrosomální frakcí.

5.3.2 Vliv 17 α -ethinylestradiolu na metabolismus progesteronu

Na Obr. 24 jsou uvedeny výsledky tvorby tří známých metabolitů progesteronu po inkubaci s různě preinkubovanými vzorky u kontrolních mikrosomů, které pocházely z nepremedikovaných zvířat. Tvorba metabolitů 16 α -hydroxyprogesteronu a 21 α -hydroxyprogesteronu je snížena při preinkubaci s EE2 a NADPH, bez preinkubace s NADPH nebyl inhibiční vliv pozorován. Oproti tomu inhibice tvorby metabolitu 6 β -hydroxyprogesteronu byla pozorována při použití obou postupů a to shodně s 67 % účinností.



Obr. 24: Vliv přídavku EE2 na tvorbu metabolitů progesteronu.

Z grafu lze vyčíst, že EE2 může působit jako reverzibilní inhibitor 6 β -hydroxylace progesteronu, jelikož tvorba metabolitu 6 β -hydroxyprogesteronu je lehce pozastavena oproti kontrole nezávisle na preinkubačním přístupu.

6 Diskuze

Syntetický estrogen 17 α -ethinylestradiol (EE2) je aktivní složkou hormonálních perorálních pilulek, které jsou v současnosti nejoblíbenější a nejrozšířenější formou antikoncepce⁴³⁻⁴⁵. EE2 je vylučován z organismu ve formě konjugátů (glukuronidové, sulfatované⁹⁴⁻⁹⁵), které jsou biologicky neaktivní¹⁴, a částečně i v nepřeměněné podobě^{45,96}. V procesu čištění odpadních vod dochází k nedokonalému odstranění těchto konjugátů, které mohou být následně přeměněny zpět na volný EE2. Zvyšující se koncentrace EE2 zejména v odpadních a povrchových vodách má silný negativní účinek na životní prostředí¹⁴⁶. EE2 působí jako EDC (endokrinně disruptivní látka), napodobuje přirozené hormony a narušuje přirozenou činnost hormonálních žláz¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Prokázané negativní účinky byly nalezeny u vodních organismů^{49,58-61,150} a předpokládá se, že EE2 může mít i negativní vliv na lidský organismus^{38,41,151}.

Nejenom v poslední době jsou proto zkoumány možnosti odstranění EE2 ze životního prostředí⁵. Rozšíření současných znalostí o transformaci EE2 je důležité pro sledování případných negativních účinků EE2 na lidský organismus. Proto bylo cílem této diplomové práce studium metabolismu EE2 u dvou vybraných modelových organismů. První modelový organismus, ligninolytická houba *P. ostreatus*, známá pod českým názvem hlíva ústřičná, patří mezi organismy mající slibné biodegradační schopnosti^{81-82,152}. Druhý modelový organismus, laboratorní potkan, sloužil jako model studia metabolismu EE2 v lidském organismu.

V první části předkládané diplomové práce bylo navázáno na předchozí studium degradačního potenciálu ligninolytických hub, který byl studován v rámci bakalářské práce¹³⁸. Ligninolytické houby produkují extracelulární ligninolytické enzymy (peroxidasy, oxidasy), které umožňují rozkládat lignin^{76,153}. Kromě toho degradují houby bílé hniloby i velkou škálu environmentálních polutantů¹⁵⁴⁻¹⁵⁷, jsou proto studované kvůli možnosti odstranění vybraných EDC z prostředí^{77,157}. Předpokládá se, že degradace EDC vyžaduje kromě výše zmíněných extracelulárních enzymů i zapojení intracelulárních enzymatických systémů⁸⁴. Ovšem některé studie uvádějí, že při degradaci polutantů nemusí být v počáteční fázi extracelulární ligninolytické enzymy vždy zapojeny, klíčovou roli by tedy hrály intracelulární enzymy, zejména CYP¹⁵⁸⁻¹⁵⁹. V rámci této práce byl proto studován degradační potenciál vůči EE2 jak *in vivo*, tak *in vitro*. Cajthaml a kol.¹⁶⁰ studovali

8 ligninolytických hub a jejich schopnost odstranit EE2 z kultivačního média, kdy největší efektivitu přeměny vykazovaly houby *Irpex lacteus*, *Pleurotus ostreatus* a *Pycnoporus cinnabarinus*. Jako vhodný modelový zástupce ligninolytických hub pro studium degradace EE2 byl proto vybrán *P. ostreatus*, který vykazoval degradační potenciál i v jiných studiích vypracovaných v laboratoři environmentální biotechnologie, na AV, ČR, v.v.i.¹⁶¹⁻¹⁶².

In vivo degradace EE2 houbovou kulturou byla pozorována v předchozí bakalářské práci. Po 24 hodinách inkubace bylo detekováno 48 % EE2 a po 48 hodinách pouze 5 % vůči kontrolám. Degradace byla ovšem v obou případech stanovena pouze z úbytku substrátu EE2. Ve směsi, kde teoreticky může docházet k sorpci EE2 na proteiny obsažené v inkubační směsi, byla nejprve v rámci předkládané práce potvrzena degradace *in vivo* a byly hledány produkty degradace. Byla ověřena schopnost ligninolytické houby *P. ostreatus* transformovat EE2 *in vivo*, a to stanovením úbytku EE2 v kultivačním médiu po 2 dnech, kdy byl tedy EE2 transformován velmi účinně. HPLC analýzou inkubační směsi obsahující EE2 a kulturu *P. ostreatus* byl nalezen a identifikován MS jeden metabolit. Nalezený metabolit byl hydroxylovaný EE2, kdy přesná pozice OH skupiny je předmětem další studie. Získaný výsledek je v souladu s výsledky v práci Křesinové¹⁶¹, kde autoři kromě jiných metabolitů identifikovaly v kultuře *in vivo* také hydroxylovaný EE2. *In vivo* pokusy potvrdili slibné biodegradační schopnosti *P. ostreatus* vůči EE2, jak již bylo zmíněno v jiných studiích^{160,163}.

Jelikož byla diskutována i možná role houbových cytochromů P450 při metabolismu EE2¹⁶¹, bylo v další části diplomové práce přistoupeno k izolaci mikrosomální frakce houby *P. ostreatus* a ke studiu degradačního potenciálu samotné MF. Izolována byla mikrosomální frakce kontrolní a frakce vystavená při kultivaci působení EE2, s cílem indukovat enzymy, které by mohly degradaci EE2 prohloubit, jak již bylo v literatuře popsáno i u jiných substrátů¹¹². Izolace houbových cytochromů P450 je velmi obtížný proces vzhledem k jejich nízké stabilitě a nízké úrovni exprese¹¹⁸, přesto byla v izolovaných mikrosomálních preparátech detekována aktivní forma cytochromu P450 i když jeho koncentrace byla velmi nízká. Indukce mikrosomálních enzymů, které by se mohly degradace zúčastnit, nebyla prokázána. V předchozích experimentech, v rámci bakalářské práce, nebyla transformace EE2 plně vysvětlena a interpretace výsledků nebyla

zcela jednoznačná¹³⁸, proto bylo v rámci předkládané práce navázáno na studium degradačního potenciálu MF houby *P. ostreatus*. V následných degradačních experimentech byly hledány metabolity EE2 a případně měly být porovnány s metabolitem nalezeným v *in vivo* pokusech. Za daných experimentálních podmínek, v inkubačních směsích obsahujících EE2, MF a NADPH, nebyly pozorovány degradační produkty ani nebyl shledán úbytek EE2. Inhibitory houbových CYP (1-ABT a PBi) neměly vliv na přeměnu EE2. V úvahu je ale nutno brát i samotnou účinnost houbových cytochromů P450 vzhledem k jejich nízké stabilitě a nízké úrovni exprese. Studie, které se zabývaly úlohou cytochromů P450 v buňkách hub při metabolismu EDC a které předpověděly klíčovou roli těchto enzymů, používaly nepřímé důkazy, zejména inhibovaly inkubační směsi specifickými inhibitory cytochromů P450 a to výše zmíněnými 1-ABT anebo PBi^{81,161,164}. Tento typ důkazu zapojení houbových cytochromů P450, který je často používán^{122-123,165-166} nemusí být ovšem vždy spolehlivým ukazatelem nezbytné role těchto enzymů. Konkrétně inhibitor PBi vykazuje inhibiční vlastnosti i vůči celé řadě peroxidas¹⁶⁷, může tedy inhibovat i ligninolytické enzymy, které jsou houbami bílé hniloby často sekretovány do media¹⁶⁸⁻¹⁶⁹. V poslední řadě je také nutné podotknout, že v literatuře zatím není známa studie, která by prokázala degradaci EE2 za použití izolované mikrosomální frakce ligninolytické houby, což bylo předmětem předkládané diplomové práce.

V degradačních experimentech byl do některých směsí přidáván koenzym NADPH. V případě absence koenzymu NADPH byly pozorovány změny při HPLC analýze v chromatogramu, ovšem interpretace výsledků je velmi obtížná vzhledem k nesymetrickému rozložení píku. V tomto případě je potřeba detailnější studie, ovšem pokud by byla potvrzena domněnka, že absence NADPH v degradačních experimentech by mohla vést k účinnější přeměně EE2 MF houby *P. ostreatus*, mohlo by to poukazovat na existenci neobvyklých forem houbových CYP, které mají NADPH, jakožto donor elektronů vázaný na jednu z proteionových domén, což je popsáno v práci Sona a kol.¹⁷⁰. V dalším experimentu byl místo koenzymu NADPH přidáván KHP, který slouží jako kofaktor při peroxidásové aktivitě CYP. V tomto případě byl nalezen možný transformační produkt EE2, jehož množství bylo ovšem velmi nízké a proto identifikace pomocí UPLC-MS nebyla vzhledem k nedostatku izolované MF a z časových důvodů provedena. Předmětem další studie proto může být právě vliv KHP na metabolismus EE2 katalyzovaný CYP houbou *P. ostreatus* a případně samotné mikrosomální frakce na

degradaci EE2 a jiných EDC. Role houbových CYP nebyla tedy v těchto experimentech plně objasněna, ovšem *P. ostreatus* se jeví jako vhodný kandidát studia biotransformace EE2 *in vivo* v praxi.

Druhým modelovým organismem pro studium metabolismu EE2 *in vitro* byly samci laboratorních potkanů kmene Wistar. Cílem této části předkládané práce bylo identifikovat konkrétní formy mikrosomálních CYP podílející se na transformaci EE2 a analyzovat metabolity EE2, přispět tedy k detailnějšímu prozkoumání metabolismu EE2 *in vitro* u savců.

Nejprve byla ověřena schopnost degradace EE2 MF laboratorního potkana. EE2 byl přeměňován na tři metabolity. Uvedené metabolity byly následně charakterizovány MS a z charakteru získaných spekter byly identifikované jako *y*-OH EE2 (majoritní metabolit), *x*-OH EE2 (minoritní metabolit), kdy se jednalo o různé izomery. Třetí metabolit, dehydrogenovaný EE2, vznikal neenzymovou přeměnou a jelikož jeho množství bylo blízko limitu detekce, nebyl dále vyhodnocován. Majoritní metabolit *y*-OH EE2 by s největší pravděpodobností mohl být 2-hydroxyethinylestradiol, hlavní produkt přeměny EE2¹⁶¹. Minoritní metabolit *x*-OH EE2 by dle jeho chromatografických vlastností mohl být 4-hydroxyethinylestradiol¹²⁷. Nicméně, identifikace přesné pozice hydroxylové skupiny (např. užitím techniky nukleární magnetické rezonance) by mohlo být také předmětem dalších studií.

CYP jsou enzymy inducibilní, lze tedy v mikrosomální frakci zvýšit zastoupení daných isoformů použitím specifických induktorů. Prvním zvoleným přístupem pro identifikaci konkrétních forem CYP bylo tedy použití mikrosomů potkanů premedikovaných fenobarbitalem (indukce podrodiny CYP2B a 2C¹⁷¹), Sudanem I (induktor CYP1A¹⁷²⁻¹⁷³), ethanolem (CYP2E1¹⁷⁴), pregnenolon-16 α -karbonitrilem (CYP 3A¹⁷⁵) a mikrosomy nepremedikované, tedy kontrolní. Stimulace tvorby obou metabolitů EE2 byla pozorována u mikrosomů premedikovaných PB. V případě mikrosomů potkanů premedikovaných EtOH byla zvýšena tvorba pouze *y*-OH EE2, *x*-OH byl nejučinněji přeměňován mikrosomy potkanů premedikovaných PCN. Z těchto výsledků vyplynulo zapojení CYP podrodin 2B, 2C, 2E a 3A do metabolismu EE2, což koresponduje s výsledky jiných autorů, kteří předpověděli zapojení především formy CYP3A, CYP2C a CYP 2E¹⁷⁶⁻¹⁷⁷.

Pro další upřesnění, které formy CYP se účastní metabolismu EE2, byl v další části práce sledován vliv specifických inhibitorů CYP. Použity byly inhibitory CYP1A (α -naftoflavon¹⁷⁸), 2B (adamantan¹⁷⁹), 2C (sulfafenazol¹⁸⁰), 2A/2E1 (diethyldithiokarbamát¹⁸¹) a 3A (ketokonazol¹⁸²). Zároveň byl studován i mechanismus inhibice, kdy byly mikrosomy s daným inhibitorem 10 minut preinkubovány s NADPH a výsledky porovnány s postupem, kdy byly mikrosomy preinkubovány s inhibitorem bez NADPH. Tento postup je využíván pro zjištění, zda je v procesu inhibice účinný samotný inhibitor či jeho metabolity, tedy zda může působit jako tzv. „sebevražedný substrát“. Inhibitor α -NF (inhibice CYP 1A), který stimuloval tvorbu metabolitu γ -OH EE2, má kromě inhibičního vlivu na CYP1A také stimulační vliv na jinou formu CYP, konkrétně působí jako aktivátor CYP3A. Výsledky naznačily důležitou roli CYP3A zejména při hydroxylaci na γ -OH EE2 (pravděpodobně 2-OH EE2), což se shoduje s výsledky jiných autorů^{98,126}, ale zároveň potvrzují i zapojení dalších forem CYP a to zejména CYP2E, 2B do metabolismu EE2¹⁸³⁻¹⁸⁵. Dále výsledky z inhibičních studií naznačili zapojení CYP1A a 3A v procesu tvorby minoritního metabolitu α -OH EE2, jelikož dané inhibitory (α -NF a ketokonazol) inhibovaly shodně při použití obou protokolů, kdy se pravděpodobně může jednat o mechanismus reverzibilní inhibice. Oproti tomu v průběhu preinkubace inhibitorů adamantanu a DDTC s NADPH by se mohly tvořit reaktivnější metabolity inhibitoru, které mají větší inhibiční vliv na metabolismus EE2 než samotný inhibitor, jelikož jejich inhibiční schopnost byla v tomto případě zvýšena.

Souhrnné výsledky z inhibičních a indukčních studií předpověděli roli CYP1A, 2A, 2B, 2E1 a 3A v procesu tvorby α -OH EE2 zatímco tvorba majoritního metabolitu γ -OH EE2 byla pozorována u CYP 2C, 3A a částečně CYP 2B a 2E1. Tato zjištění nejsou v rozporu s literaturou, nicméně je nutné podotknout, že interpretace výsledků z inhibičních studií může být někdy obtížná, jelikož u určitého substrátu jeden inhibitor může být efektivnější než druhý.

Dalším krokem pro potvrzení, které CYP se podílejí na metabolismu EE2, bylo využití potkaních rekombinantních CYP. Přeměna EE2 byla v tomto případě velmi malá. Uvedené výsledky potvrdily zapojení podrodiny CYP3A, 2A a zároveň ukazují i na roli CYP2C.

V poslední části práce byl sledován možný vliv EE2, exogenní EDc, na metabolismus dvou vybraných steroidních hormonů, které patří mezi endogenní EDc. Zatím je známo jen málo informací ohledně účinků EDc na metabolismus steroidních hormonů¹⁸⁶. Vliv EE2 na metabolismus testosteronu a progesteronu bylo sledováno prostřednictvím 6 β -hydroxylace progesteronu a testosteronu, což je reakce specifická pro aktivitu CYP3A¹⁴⁴ a 21 hydroxylace progesteronu, která je katalyzována CYP2C¹⁴⁵. Inhibice oxidace obou hormonů EE2 byla opět sledována dvěma přístupy. V prvním případě byla inkubační směs preinkubována s NADPH a EE2, v druhém případě bez NADPH, kdy byly oba hormony přidány až po následné preinkubaci. Tento zvolený přístup může objasnit, zda EE2 působí jako reverzibilní inhibitor nebo jako inaktivátor CYP¹³⁰⁻¹³¹.

EE2 za daných experimentálních podmínek inhiboval metabolismus testosteronu pouze v přítomnosti NADPH při preinkubaci. Pozorovaný inhibiční vliv může být způsoben tvorbou reaktivnějšího metabolitu EE2 vznikajícího pouze v přítomnosti substrátu (testosteronu), kdy se tento metabolit může kovalentně vázat na CYP3A. Podobný závěr lze najít i ve studii Lina¹²⁹, který zjistil, že EE2 inaktivuje 6 β -hydroxylaci testosteronu u lidského CYP3A4.

V případě progesteronu byla tvorba metabolitu 6 β -hydroxyprogesteronu inhibována oproti kontrole nezávisle na preinkubačním protokolu. Inhibice 21- a 16 α -hydroxylace progesteronu byla pozorována pouze při preinkubaci s NADPH. Tyto výsledky naznačují, že EE2 působí jako inhibitor aktivity CYP3A (6 β -hydroxylace progesteronu), zatímco jeho metabolity mohou ovlivňovat aktivitu CYP2C (21- a 16 α -hydroxylace progesteronu). Tyto výsledky se shodují s výsledky jiných autorů¹⁸⁶, kteří naznačili, že EE2 se může kovalentně vázat na CYP2C11.

Vzhledem k získaným poznatkům a díky klinickému významu této látky by měla být studiu metabolismu EE2 kladena velká pozornost.

7 Souhrn

Výsledky dosažené v této diplomové práci lze shrnout následovně:

- ✓ Ligninolytická houba *P. ostreatus* je schopna efektivně degradovat EE2 *in vivo*, kdy byl nalezen jeden hydroxylovaný metabolit EE2.
- ✓ *In vitro* degradace EE2 za použití samotné izolované mikrosomální frakce *P. ostreatus* nebyla pozorována. Úlohu CYP v mechanismu degradace se tedy nepodařilo objasnit. Pravděpodobně je nutná kooperace více enzymových systémů než samotných CYP.
- ✓ EE2 byl metabolizován potkaním mikrosomálním systémem na dva hydroxylované metabolity.
- ✓ Výsledky z indukčních a inhibičních studií předpověděly důležitou roli CYP3A, CYP 2A, 2B a 2C v metabolismu EE2 *in vitro*.
- ✓ Z metabolických studií s přirozenými hormony vyplynulo, že EE2 může působit jako inhibitor aktivity CYP3A *in vitro*, zatímco jeho metabolity mohou modulovat aktivitu CYP2C.

8 Seznam použité literatury

- (1) Kotyza, J., Soudek, P., Kafka, Z., Vaněk, T. *Chem Listy* **2009**, 103, 540.
- (2) Zuo, Y.; Zhang, K.; Zhou, S. *Environ Sci Process Impacts* **2013**, 15, 1529.
- (3) Cabana, H.; Jiwan, J. L.; Rozenberg, R.; Elisashvili, V.; Penninckx, M.; Agathos, S. N.; Jones, J. P. *Chemosphere* **2007**, 67, 770.
- (4) Caliman, F. A.; Gavrilescu, M. *Clean:Soil Air Water* **2009**, 37, 277.
- (5) Kujalová, H., Sýkora, V., Pitter, P. *Chem Listy* **2007**, 101, 706.
- (6) Wang, Y. Q.; Hu, W.; Cao, Z. H.; Fu, X. Q.; Zhu, T. *Anal Bioanal Chem* **2005**, 383, 857.
- (7) Carballa, M.; Omil, F.; Lema, J. M.; Llombart, M.; Garcia-Jares, C.; Rodriguez, I.; Gomez, M.; Ternes, T. *Water Res* **2004**, 38, 2918.
- (8) Wiegel, S.; Aulinger, A.; Brockmeyer, R.; Harms, H.; Löffler, J.; Reincke, H.; Schmidt, R.; Stachel, B.; von Tumpling, W.; Wanke, A. *Chemosphere* **2004**, 57, 107.
- (9) Bonfeld-Jorgensen, E. C. *Sci Total Environ* **2004**, 331, 215.
- (10) Vogel, J. M. *Policy Sci* **2004**, 37, 277.
- (11) Paterson, G.; Metcalfe, C. D. *Chemosphere* **2008**, 74, 125.
- (12) DeLorenzo, M. E.; Fleming, J. *Arch Environ Con Tox* **2008**, 54, 203.
- (13) Cao, Z. H.; Wang, Y. Q.; Ma, Y. M.; Xu, Z.; Shi, G. L.; Zhuang, Y. Y.; Zhu, T. *J Hazard Mater* **2005**, 122, 51.
- (14) D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Gentili, A.; Mancini, R.; Mastropasqua, R.; Nazzari, M.; Samperi, R. *Sci Total Environ* **2003**, 302, 199.
- (15) Svenson, A.; Allard, A. S.; Ek, M. *Water Res* **2003**, 37, 4433.
- (16) Hanselman, T. A.; Graetz, D. A.; Wilkie, A. C. *Environ Sci Technol* **2003**, 37, 5471.
- (17) Carreau, S.; Bouraima-Lelong, H.; Delalande, C. *Adv Med Sci* **2012**, 57, 31.

-
- (18) Silberstein, S. D.; Merriam, G. R. *Cephalalgia* **2000**, *20*, 148.
- (19) Hu, Q.; Yin, L.; Hartmann, R. W. *J Med Chem* **2012**, *55*, 7080.
- (20) Kipp, M.; Amor, S.; Krauth, R.; Beyer, C. *Front Neuroendocrinol* **2012**, *33*, 1.
- (21) van der Spuy, W. J.; Pretorius, E. *Rev Neurosci* **2012**, *23*, 269.
- (22) Oosthuysen, T.; Bosch, A. N. *Curr Opin Pharmacol* **2012**, *12*, 363.
- (23) Hirschberg, A. L. *Maturitas* **2012**, *71*, 248.
- (24) Lateef, A.; Petri, M. *J Autoimmun* **2012**, *38*, J170.
- (25) Kulkarni, J.; Gavrilidis, E.; Worsley, R.; Hayes, E. *Cns Drugs* **2012**, *26*, 549.
- (26) Linn, S.; Murtaugh, B.; Casey, E. *PM R* **2012**, *4*, 169.
- (27) Chang, M. *BMB Rep* **2011**, *44*, 423.
- (28) Combalbert, S.; Hernandez-Raquet, G. *Appl Microbiol Biotechnol* **2010**, *86*, 1671.
- (29) Marino, M.; Galluzzo, P.; Ascenzi, P. *Curr Genomics* **2006**, *7*, 497.
- (30) Safe, S.; Kim, K. *J Mol Endocrinol* **2008**, *41*, 263.
- (31) Thomas, M. P.; Potter, B. V. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2013**.
- (32) Yu, C. P.; Deeb, R. A.; Chu, K. H. *Chemosphere* **2013**, *91*, 1225.
- (33) Liu, Z. H.; Kanjo, Y.; Mizutani, S. *Sci Total Environ* **2009**, *407*, 4975.
- (34) Khanal, S. K.; Xie, B.; Thompson, M. L.; Sung, S.; Ong, S. K.; Van Leeuwen, J. *Environ Sci Technol* **2006**, *40*, 6537.
- (35) D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Gentili, A.; Mancini, R.; Mastropasqua, R.; Nazzari, M.; Samperi, R. *Sci Total Environ* **2003**, *302*, 199.
- (36) Ternes, T. A.; Stumpf, M.; Mueller, J.; Haberer, K.; Wilken, R. D.; Servos, M. *Sci Total Environ* **1999**, *225*, 81.
- (37) Cargouet, M.; Perdiz, D.; Mouatassim-Souali, A.; Tamisier-Karolak, S.; Levi, Y. *Sci Total Environ* **2004**, *324*, 55.

- (38) Sultan, C.; Balaguer, P.; Terouanne, B.; Georget, V.; Paris, F.; Jeandel, C.; Lumbroso, S.; Nicolas, J. *Mol Cell Endocrinol* **2001**, *178*, 99.
- (39) Holoubek, I. *Cent Eur J Public Health* **2000**, *8*, 4.
- (40) de Jager, C.; Bornman, M. S.; Oosthuizen, J. M. *Andrologia* **1999**, *31*, 107.
- (41) de Jager, C.; Bornman, M. S.; van der Horst, G. *Andrologia* **1999**, *31*, 99.
- (42) Gutendorf, B.; Westendorf, J. *Toxicology* **2001**, *166*, 79.
- (43) Hoffmann, H.; Moore, C.; Zimmermann, H.; Elger, W.; Schwarz, S.; Graser, T.; Oettel, M. *Exp Toxicol Pathol* **1998**, *50*, 458.
- (44) Doyle, M. A.; Bosker, T.; Martyniuk, C. J.; Maclatchy, D. L.; Munkittrick, K. R. *Aquat Toxicol* **2013**, *134-135*, 34.
- (45) Stanczyk, F. Z.; Archer, D. F.; Bhavnani, B. R. *Contraception* **2013**, *87*, 706.
- (46) Lindsley, C. W. *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, *2*, 276.
- (47) Han, J.; Qiu, W.; Cao, Z.; Hu, J.; Gao, W. *Water Res* **2013**, *47*, 2273.
- (48) Segner, H.; Carroll, K.; Fenske, M.; Janssen, C. R.; Maack, G.; Pascoe, D.; Schafers, C.; Vandenbergh, G. F.; Watts, M.; Wenzel, A. *Ecotoxicol Environ Saf* **2003**, *54*, 302.
- (49) Souza, M. S.; Hallgren, P.; Balseiro, E.; Hansson, L. A. *Environ Pollut* **2013**, *178*, 237.
- (50) Aravindakshan, J.; Gregory, M.; Marcogliese, D. J.; Fournier, M.; Cyr, D. G. *Toxicol Sci* **2004**, *81*, 179.
- (51) Larcher, S.; Delbes, G.; Robaire, B.; Yargeau, V. *Environ Int* **2012**, *39*, 66.
- (52) Shen, J. H.; Gutendorf, B.; Vahl, H. H.; Shen, L.; Westendorf, J. *Toxicology* **2001**, *166*, 71.
- (53) Zuo, Y.; Zhang, K.; Deng, Y. *Chemosphere* **2006**, *63*, 1583.
- (54) Braga, O.; Smythe, G. A.; Schafer, A. I.; Feitz, A. J. *Environ Sci Technol* **2005**, *39*, 3351.
- (55) Johnson, A. C.; Sumpter, J. P. *Environ Sci Technol* **2001**, *35*, 4697.
- (56) Parrott, J. L.; Blunt, B. R. *Environ Toxicol* **2005**, *20*, 131.

- (57) Weber, L. P.; Balch, G. C.; Metcalfe, C. D.; Janz, D. M. *Environ Toxicol Chem* **2004**, *23*, 792.
- (58) Nash, J. P.; Kime, D. E.; Van der Ven, L. T.; Wester, P. W.; Brion, F.; Maack, G.; Stahlschmidt-Allner, P.; Tyler, C. R. *Environ Health Perspect* **2004**, *112*, 1725.
- (59) Bell, A. M. *Horm Behav* **2004**, *45*, 108.
- (60) Greco, L.; Capri, E.; Rustad, T. *Chemosphere* **2007**, *68*, 564.
- (61) Nadzialek, S.; Kestemont, P. *Environ Toxicol Chem* **2010**, *29*, 881.
- (62) Sun, W.; Li, S.; Mai, J.; Ni, J. *Chemosphere* **2010**, *81*, 92.
- (63) Thorpe, K. L.; Cummings, R. I.; Hutchinson, T. H.; Scholze, M.; Brighty, G.; Sumpter, J. P.; Tyler, C. R. *Environ Sci Technol* **2003**, *37*, 1142.
- (64) Weber, S.; Leuschner, P.; Kampfer, P.; Dott, W.; Hollender, J. *Appl Microbiol Biotechnol* **2005**, *67*, 106.
- (65) Johnson, A. C.; Belfroid, A.; Di Corcia, A. D. *Sci Total Environ* **2000**, *256*, 163.
- (66) Ternes, T. A.; Kreckel, P.; Mueller, J. *Sci Total Environ* **1999**, *225*, 91.
- (67) Vader, J. S.; van Ginkel, C. G.; Sperling, F. M.; de Jong, J.; de Boer, W.; de Graaf, J. S.; van der Most, M.; Stokman, P. G. *Chemosphere* **2000**, *41*, 1239.
- (68) Yu, C. P.; Roh, H.; Chu, K. H. *Environ Sci Technol* **2007**, *41*, 486.
- (69) Shi, J.; Fujisawa, S.; Nakai, S.; Hosomi, M. *Water Res* **2004**, *38*, 2322.
- (70) Yoshimoto, T.; Nagai, F.; Fujimoto, J.; Watanabe, K.; Mizukoshi, H.; Makino, T.; Kimura, K.; Saino, H.; Sawada, H.; Omura, H. *Appl Environ Microbiol* **2004**, *70*, 5283.
- (71) Haiyan, R.; Shulan, J.; ud din Ahmad, N.; Dao, W.; Chengwu, C. *Chemosphere* **2007**, *66*, 340.
- (72) Skotnicka-Pitak, J.; Garcia, E. M.; Pitak, M.; Aga, D. S. *Trac:Trend Anal Chem* **2008**, *27*, 1036.
- (73) Della Greca, M.; Pinto, G.; Pistillo, P.; Pollio, A.; Previtiera, L.; Temussi, F. *Chemosphere* **2008**, *70*, 2047.

- (74) Hwang, S.; Lee, D. I.; Lee, C. H.; Ahn, I. S. *J Hazard Mater* **2008**, *155*, 334.
- (75) Wong, D. W. *Appl Biochem Biotechnol* **2009**, *157*, 174.
- (76) Pointing, S. B. *Appl Microbiol Biotechnol* **2001**, *57*, 20.
- (77) Barr, D. P.; Aust, S. D. *Rev Environ Contam Toxicol* **1994**, *138*, 49.
- (78) Cameron, M. D.; Timofeevski, S.; Aust, S. D. *Appl Microbiol Biotechnol* **2000**, *54*, 751.
- (79) Novotný, C.; Cajthaml, T.; Svobodová, K.; Šusla, M.; Šašek, V. *Folia Microbiol* **2009**, *54*, 375.
- (80) Baborová, P.; Moder, M.; Baldrian, P.; Cajthamlová, K.; Cajthaml, T. *Res Microbiol* **2006**, *157*, 248.
- (81) Bezalel, L.; Hadar, Y.; Fu, P. P.; Freeman, J. P.; Cerniglia, C. E. *Appl Environ Microbiol* **1996**, *62*, 2547.
- (82) Bezalel, L.; Hadar, Y.; Fu, P. P.; Freeman, J. P.; Cerniglia, C. E. *Appl Environ Microbiol* **1996**, *62*, 2554.
- (83) Baldrian, P.; in Der Wiesche, C.; Gabriel, J.; Nerud, F.; Zadražil, F. *Appl Environ Microbiol* **2000**, *66*, 2471.
- (84) Hirose, S.; Tazaki, M.; Hiratsuka, N.; Yanai, S.; Kabumoto, H.; Shinkyō, R.; Arisawa, A.; Sakaki, T.; Tsunekawa, H.; Johdo, O.; Ichinose, H.; Wariishi, H. *Biochem Biophys Res Commun* **2011**, *407*, 118.
- (85) Auriol, M.; Filali-Meknassi, Y.; Adams, C. D.; Tyagi, R. D.; Noguero, T. N.; Pina, B. *Chemosphere* **2008**, *70*, 445.
- (86) Syed, K.; Doddapaneni, H.; Subramanian, V.; Lam, Y. W.; Yadav, J. S. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *399*, 492.
- (87) Ichinose, H. *Biotechnol Appl Biochem* **2013**, *60*, 71.
- (88) Back, D. J.; Maggs, J. L.; Purba, H. S.; Newby, S.; Park, B. K. *Br J Clin Pharmacol* **1984**, *18*, 603.
- (89) Rogers, S. M.; Back, D. J.; Orme, M. L. *Br J Clin Pharmacol* **1987**, *23*, 727.
- (90) Guengerich, F. P. *Life Sci* **1990**, *47*, 1981.

- (91) Li, A. P.; Hartman, N. R.; Lu, C.; Collins, J. M.; Strong, J. M. *Br J Clin Pharmacol* **1999**, *48*, 733.
- (92) Schmid, S. E.; Au, W. Y.; Hill, D. E.; Kadlubar, F. F.; Slikker, W., Jr. *Drug Metab Dispos* **1983**, *11*, 531.
- (93) Helton, E. D.; Casciano, D. A.; Althaus, Z. R.; Plant, H. D. *J Toxicol Environ Health* **1977**, *3*, 953.
- (94) Forbes-Bamforth, K. J.; Coughtrie, M. W. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, *198*, 707.
- (95) Ebner, T.; Remmel, R. P.; Burchell, B. *Mol Pharmacol* **1993**, *43*, 649.
- (96) Goldzieher, J. W. *Am J Obstet Gynecol* **1989**, *160*, 1260.
- (97) Purba, H. S.; Maggs, J. L.; Orme, M. L.; Back, D. J.; Park, B. K. *Br J Clin Pharmacol* **1987**, *23*, 447.
- (98) Ball, S. E.; Forrester, L. M.; Wolf, C. R.; Back, D. J. *Biochem J* **1990**, *267*, 221.
- (99) Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. *Chem Listy* **1999**, *93*, 229.
- (100) Payne, J. F.; Fancey, L. L.; Rahimtula, A. D.; Porter, E. L. *Comp Biochem Physiol C* **1987**, *86*, 233.
- (101) Nelson, D. R.; Kamataki, T.; Waxman, D. J.; Guengerich, F. P.; Estabrook, R. W.; Feyereisen, R.; Gonzalez, F. J.; Coon, M. J.; Gunsalus, I. C.; Gotoh, O.; et al. *DNA Cell Biol* **1993**, *12*, 1.
- (102) Omura, T.; Sato, R. *J Biol Chem* **1964**, *239*, 2370.
- (103) Kotrbová, V. *Doktorská disertační práce PřF UK Praha, katedra biochemie* **2008**, str. 17.
- (104) Nelson, D. R.; Strobel, H. W. *J Biol Chem* **1988**, *263*, 6038.
- (105) Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, Jr., Martínek, V., Páca, J. *Chem Listy* **2004**, *98*, 876.
- (106) <http://www.intechopen.com/books/on-biomimetics/synthesis-of-metallo-deuteroporphyrin-derivatives-and-the-study-of-their-biomimetic-catalytic-proper.>, staženo dne 31.7.2014, v 15:13
- (107) Ding, X.; Kaminsky, L. S. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2003**, *43*, 149.

- (108) <http://www.pnas.org/content/107/44/18783.figures-only>, staženo dne 16.7.2014, v 10:35
- (109) Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M. *Chem Listy* **2001**, 95, 212.
- (110) Coon, M. J.; Ding, X. X.; Pernecky, S. J.; Vaz, A. D. *Faseb J* **1992**, 6, 669.
- (111) Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E. *Cell Mol Life Sci* **2001**, 58, 737.
- (112) Conney, A. H. *Life Sci* **1986**, 39, 2493.
- (113) Souček, P.; Gut, I. *Xenobiotica* **1992**, 22, 83.
- (114) Souček, P.; Gut, I. *Čas Lek Česk* **1993**, 132, 353.
- (115) Murray, M.; Reidy, G. F. *Pharmacol Rev* **1990**, 42, 85.
- (116) Črešnar, B.; Petrič, Š. *Biochim Biophys Acta* **2011**, 1814, 29.
- (117) Kullman, S. W.; Matsumura, F. *Appl Environ Microbiol* **1996**, 62, 593.
- (118) van den Brink, H. M.; van Gorcom, R. F.; van den Hondel, C. A.; Punt, P. J. *Fungal Genet Biol* **1998**, 23, 1.
- (119) <http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/1000fungalg genomes.jsf>, staženo dne 28.7.2014, v 23:52
- (120) Bezalel, L.; Hadar, Y.; Cerniglia, C. E. *Appl Environ Microbiol* **1997**, 63, 2495.
- (121) Maspahy, S.; Lamb, D. C.; Kelly, S. L. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, 266, 326.
- (122) Masaphy, S.; Levanon, D.; Henis, Y.; Venkateswarlu, K.; Kelly, S. L. *FEMS Microbiol Lett* **1996**, 135, 51.
- (123) Ning, D.; Wang, H.; Zhuang, Y. *Biodegradation* **2010**, 21, 297.
- (124) Han, Y. H.; Busler, D.; Hong, Y.; Tian, Y.; Chen, C.; Rodrigues, A. D. *Drug Metab Dispos* **2010**, 38, 1064.
- (125) Balogh, A.; Gessinger, S.; Svarovsky, U.; Hippus, M.; Mellinger, U.; Klinger, G.; Hoffmann, A.; Oettel, M. *Eur J Clin Pharmacol* **1998**, 54, 729.
- (126) Guengerich, F. P. *Mol Pharmacol* **1988**, 33, 500.

- (127) Wang, B.; Sanchez, R. I.; Franklin, R. B.; Evans, D. C.; Huskey, S. E. *Drug Metab Dispos* **2004**, *32*, 1209.
- (128) Ortiz de Montellano, P. R.; Komives, E. A. *J Biol Chem* **1985**, *260*, 3330.
- (129) Lin, H. L.; Kent, U. M.; Hollenberg, P. F. *J Pharmacol Exp Ther* **2002**, *301*, 160.
- (130) Kent, U. M.; Mills, D. E.; Rajnarayanan, R. V.; Alworth, W. L.; Hollenberg, P. F. *J Pharmacol Exp Ther* **2002**, *300*, 549.
- (131) Kent, U. M.; Sridar, C.; Spahlinger, G.; Hollenberg, P. F. *Chem Res Toxicol* **2008**, *21*, 1956.
- (132) Guengerich, F. P. *Am J Obstet Gynecol* **1990**, *163*, 2159.
- (133) Jurima, M.; Inaba, T.; Kalow, W. *Drug Metab Dispos* **1985**, *13*, 746.
- (134) Rodrigues, A. D.; Lu, P. *Drug Metab Dispos* **2004**, *32*, 364.
- (135) Walsky, R. L.; Gaman, E. A.; Obach, R. S. *J Clin Pharmacol* **2005**, *45*, 68.
- (136) Reilly, P. E.; Mason, S. R.; Hooper, W. D. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1991**, *39*, 741.
- (137) Jager, W.; Correia, M. A.; Bornheim, L. M.; Mahnke, A.; Hanstein, W. G.; Xue, L.; Benet, L. Z. *Drug Metab Dispos* **1999**, *27*, 1505.
- (138) Valášková, P. *Bakalářská práce PřF UK Praha, katedra biochemie* **2012**.
- (139) Cajthaml, T.; Erbanová, P.; Kollmann, A.; Novotný, C.; Šašek, V.; Mougín, C. *Folia Microbiol* **2008**, *53*, 289.
- (140) Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goetze, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. *Anal Biochem* **1985**, *150*, 76.
- (141) Wiechelman, K. J.; Braun, R. D.; Fitzpatrick, J. D. *Anal Biochem* **1988**, *175*, 231.
- (142) Omura, T.; Sato, R. *J Biol Chem* **1964**, *239*, 2379.
- (143) Zhang, S.; You, J.; Ning, S.; Song, C.; Suo, Y. R. *J Chromatogr A* **2013**, *1280*, 84.
- (144) Brian, W. R.; Sari, M. A.; Iwasaki, M.; Shimada, T.; Kaminsky, L. S.; Guengerich, F. P. *Biochemistry* **1990**, *29*, 11280.

- (145) Yamazaki, H.; Shimada, T. *Arch Biochem Biophys* **1997**, *346*, 161.
- (146) Ternes, T. A.; Stumpf, M.; Mueller, J.; Haberer, K.; Wilken, R. D.; Servos, M. *Sci Total Environ* **1999**, *225*, 81.
- (147) Colborn, T.; vom Saal, F. S.; Soto, A. M. *Environ Health Perspect* **1993**, *101*, 378.
- (148) Desbrow, C.; Routledge, E. J.; Brighty, G. C.; Sumpter, J. P.; Waldock, M. *Environ Sci Technol* **1998**, *32*, 1549.
- (149) Shved, N.; Berishvili, G.; Baroiller, J. F.; Segner, H.; Reinecke, M. *Toxicol Sci* **2008**, *106*, 93.
- (150) Irwin, L. K.; Gray, S.; Oberdorster, E. *Aquat Toxicol* **2001**, *55*, 49.
- (151) Soto, A. M.; Justicia, H.; Wray, J. W.; Sonnenschein, C. *Environ Health Persp* **1991**, *92*, 167.
- (152) Baldrian, P.; in Der Wiesche, C.; Gabriel, J.; Nerud, F.; Zadrazil, F. *Appl Environ Microbiol* **2000**, *66*, 2471.
- (153) Reese, E. T. *Appl Microbiol* **1956**, *4*, 39.
- (154) Bumpus, J. A.; Aust, S. D. *Appl Environ Microbiol* **1987**, *53*, 2001.
- (155) Bumpus, J. A.; Tien, M.; Wright, D.; Aust, S. D. *Science* **1985**, *228*, 1434.
- (156) Heinfling, A.; Bergbauer, M.; Szewzyk, U. *Appl Microbiol Biot* **1997**, *48*, 261.
- (157) Cameron, M. D.; Timofeevski, S.; Aust, S. D. *Appl Microbiol Biot* **2000**, *54*, 751.
- (158) Mougín, C.; Laugero, C.; Asther, M.; Chaplain, V. *Pestic Sci* **1997**, *49*, 169.
- (159) Syed, K.; Doddapaneni, H.; Subramanian, V.; Lam, Y. W.; Yadav, J. S. *Biochem Bioph Res Co* **2010**, *399*, 492.
- (160) Cajthaml, T.; Křesinová, Z.; Svobodová, K.; Moder, M. *Chemosphere* **2009**, *75*, 745.
- (161) Křesinová, Z.; Moeder, M.; Ezechiáš, M.; Svobodová, K.; Cajthaml, T. *Environ Sci Technol* **2012**, *46*, 13377.
- (162) Šušla, M.; Svobodová, K. *World J Microb Biot* **2008**, *24*, 225.

- (163) Cajthaml, T.; Křesinová, Z.; Svobodová, K.; Sigler, K.; Řezanka, T. *Environ Pollut* **2009**, *157*, 3325.
- (164) Subramanian, V.; Yadav, J. S. *Appl Environ Microbiol* **2009**, *75*, 5570.
- (165) Mori, T.; Nakamura, K.; Kondo, R. *Chemosphere* **2009**, *77*, 1230.
- (166) Marco-Urrea, E.; Perez-Trujillo, M.; Vicent, T.; Caminal, G. *Chemosphere* **2009**, *74*, 765.
- (167) Martínková, M.; Kubíčková, B.; Stiborová, M. *Neuro Endocrinol Lett* **2012**, *33 Suppl 3*, 33.
- (168) Vares, T.; Niemenmaa, O.; Hatakka, A. *Appl Environ Microbiol* **1994**, *60*, 569.
- (169) Datta, A.; Bettermann, A.; Kirk, T. K. *Appl Environ Microbiol* **1991**, *57*, 1453.
- (170) Sono, M.; Roach, M. P.; Coulter, E. D.; Dawson, J. H. *Chem Rev* **1996**, *96*, 2841.
- (171) Rice, J. M.; Diwan, B. A.; Hu, H.; Ward, J. M.; Nims, R. W.; Lubet, R. A. *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 395.
- (172) Stiborová, M.; Martínek, V.; Rýdlová, H.; Hodek, P.; Frei, E. *Cancer Res* **2002**, *62*, 5678.
- (173) Stiborová, M.; Dračínská, H.; Martínek, V.; Svášková, D.; Hodek, P.; Milichovský, J.; Hejduková, Z.; Brotánek, J.; Schmeiser, H. H.; Frei, E. *Chem Res Toxicol* **2013**, *26*, 290.
- (174) Wu, D.; Cederbaum, A. I. *J Pharmacol Exp Ther* **1993**, *267*, 560.
- (175) Surry, D. D.; Meneses-Lorente, G.; Heavens, R.; Jack, A.; Evans, D. C. *Xenobiotica* **2000**, *30*, 441.
- (176) Han, Y. H.; Busler, D.; Hong, Y.; Tian, Y.; Chen, C.; Rodrigues, A. D. *Drug Metab Dispos* **2010**, *38*, 1072.
- (177) Balogh, A.; Gessinger, S.; Svarovsky, U.; Hippus, M.; Mellinger, U.; Klingler, G.; Hoffmann, A.; Oettel, M. *Eur J Clin Pharmacol* **1998**, *54*, 729.
- (178) Rendic, S.; Di Carlo, F. J. *Drug Metab Rev* **1997**, *29*, 413.
- (179) Hodek, P.; Bořek-Dohalská, L.; Sopko, B.; Šulc, M.; Smrček, S.; Hudeček, J.; Janků, J.; Stiborová, M. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2005**, *20*, 25.

- (180) Brian, W. R.; Srivastava, P. K.; Umbenhauer, D. R.; Lloyd, R. S.; Guengerich, F. P. *Biochemistry* **1989**, *28*, 4993.
- (181) Guengerich, F. P.; Kim, D. H.; Iwasaki, M. *Chem Res Toxicol* **1991**, *4*, 168.
- (182) Hosea, N. A.; Guengerich, F. P. *Arch Biochem Biophys* **1998**, *353*, 365.
- (183) Ueng, Y. F.; Kuwabara, T.; Chun, Y. J.; Guengerich, F. P. *Biochemistry* **1997**, *36*, 370.
- (184) Huang, M. T.; Chang, R. L.; Fortner, J. G.; Conney, A. H. *J Biol Chem* **1981**, *256*, 6829.
- (185) Schwab, G. E.; Raucy, J. L.; Johnson, E. F. *Mol Pharmacol* **1988**, *33*, 493.
- (186) Laurenzana, E. M.; Weis, C. C.; Bryant, C. W.; Newbold, R.; Delclos, K. B. *Food Chem Toxicol* **2002**, *40*, 53.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo DP	Datum vypůjčení	Poznámka