

MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno 2017

Vít Dubec



MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta
Ústav experimentální biologie
Oddělení genetiky a molekulární
biologie



Regulace enzymů podílejících se na metabolismu xenobiotik v buněčných modelech odvozených od epitelu kolonu

Diplomová práce

Vít Dubec

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Jan Vondráček, Ph.D.

Brno 2017

Bibliografický záznam

Autor:	Bc. Vít Dubec Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie
Název práce:	Regulace enzymů podílejících se na metabolismu xenobiotik v buněčných modelech odvozených od epitelu kolonu
Studijní program:	Experimentální biologie
Studijní obor:	Molekulární biologie a genetika
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jan Vondráček, Ph.D.
Akademický rok:	2016
Počet stran:	73
Klíčová slova:	Xenobiotika, Xenobiotika metabolizující enzymy, Kolorektální karcinom, Polyaromatické uhlovodíky, Mastné kyseliny s krátkým řetězcem, PCR arrays

Bibliographic Entry

Author: Bc. Vít Dubec
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: The regulation of xenobiotic-metabolizing enzymes
in cell models derived from colon epithelium

Degree Programme: Experimental Biology

Field of Study: Molecular Biology and Genetics

Supervisor: doc. RNDr. Jan Vondráček, Ph.D.

Academic Year: 2016

Number of Pages: 73

Keywords: Xenobiotics, Xenobiotic metabolizing enzymes,
Colorectal carcinoma, Polyaromatic hydrocarbons, Short
chain fatty acids, PCR arrays

Abstrakt

Enzymy metabolizující xenobiotika (XME) jsou důležitou složkou obrany organismu před toxickými účinky cizorodých látek (xenobiotik). Jejich metabolickou aktivitou jsou xenobiotika upravována tak, aby mohla být snáze vyloučena z organismu. Při tomto procesu však může docházet také k jejich bioaktivaci a vzniku toxičtějších meziproduktů. Dietární karcinogeny, jako polyaromatické uhlovodíky, hrají důležitou roli při vzniku kolorektálního karcinomu. Spolu s nimi jsou ve střevě přítomny také látky s protektivními účinky, například mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které jsou produktem střevní mikroflóry. Spolupůsobení těchto látek může výrazně modulovat buněčnou odpověď, především expresi genů pro XME a s tím spojenou úroveň bioaktivace.

Tato práce se věnuje objasnění účinků působení butyrátu a benzo[a]pyrenu na expresi genů xenobiotika metabolizujících enzymů v buněčných modelech odvozených z buněk epitelu kolonu. Pomocí metod analýzy genové exprese byla sledována úroveň indukce palety vybraných XME po ovlivnění studovanými látkami v různých buněčných liniích. Podařilo se vybrat několik kandidátních enzymů pro další studium v této oblasti.

Abstract

Xenobiotic metabolizing enzymes (XME) are important part of defense of organism against toxic effects of xenobiotics. With metabolic activity of these enzymes xenobiotics are modified to be easily excluded from organism. During this process xenobiotics may also be bioactivated and become more toxic. Dietary carcinogens, such as polyaromatic hydrocarbons, play important role in development of colorectal carcinoma. Together with dietary carcinogens substances with protective effects, such as short chain fatty acids, products of intestinal microbiome, are also present in colon. Interactions of these substances may be of significant effect to cellular answer, especially expression of genes for XME and the associated levels of bioactivation.

This thesis sheds light on effects of interaction of butyrate and benzo[a]pyrene on expression of XME genes in cell models derived from colon epithelial cells. Levels of induction of XME palette were studied with gene expression analysis methods, after treatment with studied substances in different cell lines. Based on this work several candidate enzymes were chosen for further studies in this field.



Masarykova univerzita

Přírodovědecká fakulta



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Student: **Bc. Vít Dubec**
Studijní program: **Experimentální biologie**
Studijní obor: **Molekulární biologie a genetika**
Studijní směr: **Molekulární biologie a genetika**

Ředitel Ústavu experimentální biologie PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s tématem:

Regulace enzymů podílejících se na metabolismu xenobiotik v buněčných modelech odvozených od epitelu kolonu

The regulation of xenobiotic-metabolizing enzymes in cell models derived from colon epithelium

Oficiální zadání:

Epiteliální buňky kolonu představují populaci buněk vystavených řadě exogenních sloučenin, které mohou mít pro-karcinogenní účinky. Metabolismus těchto sloučenin může být v řadě případů zdrojem aktivních genotoxických a mutagenních látek. Cílem práce je analyzovat účinky chemopreventivních látek a úlohy Wnt/ β -kateninové signální dráhy v regulaci exprese enzymů podílejících se na biotransformaci xenobiotik v epiteliálních buňkách.

Literatura: Anzenbacher et Zanger, Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics, Wiley-VCH, 2012; primární literatura týkající se metabolismu xenobiotik a nádorů kolonu;

Jazyk závěrečné práce: český

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jan Vondráček, Ph.D.

Podpis vedoucího práce:

Konzultant: -

Datum zadání diplomové práce: 25. listopadu 2014

V Brně dne 25. listopadu 2014

prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.
ředitel Ústavu experimentální biologie

Zadání diplomové práce převzal dne: 25. listopadu 2014

Podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat především svému školiteli doc. RNDr. Janu Vondráčkovi, Ph.D. za trpělivost, odborné vedení této práce a cenné zkušenosti, které jsem pod jeho vedením získal. Dále bych rád poděkoval Mgr. Ondřeji Zapletalovi za pomoc při výzkumu, řešení praktických problémů a odborné konzultace. Dále děkuji i ostatním členům Oddělení cytokinetiky BFÚ AV ČR za rady a vytvoření příjemného a motivačního prostředí pro vypracování této práce. V neposlední řadě patří mé díky také mým rodičům, bez jejichž morální a materiální podpory by tato práce nemohla vzniknout a Ing. Matěji Míkovi za korekci textu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracoval samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 4. ledna 2017

.....

Vít Dubec

Obsah

1	Úvod.....	13
2	Kolorektální karcinom (CRC)	13
2.1	Genetické faktory přispívající ke vzniku CRC	14
2.1.1	Dědičné formy CRC.....	14
2.1.2	Sporadické CRC.....	15
3	Xenobiotika	16
3.1	Heterocyklické aromatické aminy (HAA)	17
3.2	Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)	18
3.2.1	Benzo[a]pyren (B[a]P).....	20
3.3	Enzymy metabolizující xenobiotika	21
3.3.1	Cytochromy P450 (CYP)	21
3.3.2	Aldo-keto reduktázy (AKR).....	23
3.3.3	Arylamin N-acetyltransferasy (NAT)	24
3.3.4	Glutathion S-transferasy (GST)	25
3.3.5	UDP-Glukuronosyl transferasy (UGT)	26
3.3.6	NAD(P)H:chinon oxidoreduktázy (NQO)	27
4	Mechanismy genotoxicity a karcinogenity PAU.....	28
4.1	receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR).....	28
4.2	Bioaktivace a genotoxicita PAU	29
4.2.1	Tvorba DNA aduktů.....	30
4.2.2	Poruchy replikace a dvouřetězcové zlomy DNA	30
5	Produkty střevní bakteriální mikroflory	31
5.1	Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA)	31
5.1.1	Butyrát.....	32
5.1.2	Mechanismy účinku butyrátu	32
6	Materiál a metody	35
6.1	Materiál	35
6.1.1	Buněčné linie HCT-116, HT-29 a Caco-2	35
6.2	Použité chemikálie	36
6.3	Metody	36
6.3.1	Experimentální design.....	36
6.3.2	Izolace RNA a qRT-PCR.....	36
6.3.3	PCR arrays	37

6.3.4	qRT-PCR.....	39
7	Výsledky	41
7.1	Verifikace indukce exprese enzymu CYP1A1 po ovlivnění B[a]P a NaBt v buněčné linii HCT-116	41
7.2	Detekce mRNA XME pomocí PCR arrays analýzy	42
7.3	Stanovení exprese vybraných XME u buněčné linie HCT-116 pomocí qRT PCR.....	44
7.4	Účinky butyrátu a B[a]P na indukci XME v buněčné linii HT-29	47
7.5	Účinky butyrátu a B[a]P na expresi XME v buněčné linii Caco-2.....	49
8	Diskuse.....	52
9	Závěr.....	56
10	Literatura:.....	57

Seznam zkratek

AhR	aryl hydrocarbon receptor
AKR	aldo-keto reductase
ALDH	aldehyde dehydrogenase
APC	adenomatous polyposis coli
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATCC	american type culture collection
B[a]P	benzo[a]pyrene
BPDE	benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid
CRC	colorectal cancer
CYP	cytochrome P450
DMSO	dimethyl sulfoxide
DRE	dioxine response elements
DSB	double strand breaks
ER	estrogen receptor
FAD	flavin adenine dinucleotide
FAP	familial adenomatous polyposis
FBS	fetal bovine serum
GSH	glutathione
GSSG	glutathione disulfide
GST	glutathione S-transferase
HAA	heterocyclic aromatic amines
HDAC	histone deacetylase
HIF	hypoxia inducible factor
HNPCC	hereditary non-polyposis colon cancer
HPLC	high performance liquid chromatography
HR	homologous recombination
HSP 90	heat shock protein 90
IFN	interferon

IQ	imidazochinolin
MAPK	mitogen activated protein kinase
MeIQ	methylimidazochinolin
MMR	mismatch repair
MS/MS	tandem mass spectrometry
NAT	N-acetyl transferase
NHEJ	non-homologous end joining
NQO	NAD(P)H:quinone oxidoreductase
PAS	basic-helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim
PAU	polyaromatické uhlovodíky
PCB	polychlorinated biphenyls
qRT-PCR	quantitative real time polycyclic chain reaction
ROS	reactive oxygen species
SCFA	short chain fatty acids
SOD	superoxid dismutase
TCDD	2,3,7,8-tetrachlórdibenzo-p-dioxin
TNF	tumor necrosis factor
UGT	UDP-glucuronosyltransferase
UPL	universal probe library
XME	xenobiotic metabolising enzymes
XRE	xenobiotic response elements
TGF- β	transforming growth factor- β

1 Úvod

Kolorektální karcinom je rozšířené nádorové onemocnění, při jehož vzniku mohou hrát roli dietární a environmentální faktory. Složky potravy, jako jsou například některé tuky a vláknina, mají prokazatelně pozitivní efekt na zdraví střevní epitelální tkáň. Předpokládá se, že mastné kyseliny s krátkým řetězcem (např. butyrát) a ω -3 nenasycené mastné kyseliny mají protektivní účinky proti zánětu a karcinogenezi v tlustém střevě. Mezi dietární karcinogeny, které mohou přispívat ke vzniku a rozvoji kolorektálního karcinomu řadíme také polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU). Ačkoliv jejich silný karcinogenní potenciál byl pozorován v mnoha studiích na zvířatech, jejich úloha při vzniku kolorektálního karcinomu u lidí není dosud příliš jasná (Gilsing et al., 2012).

PAU patří mezi cizorodé látky - xenobiotika. Obecně jsou tak označovány všechny látky pronikající do těla z vnějšího prostředí. Protože jejich vliv na buňky a organismus je často negativní, v buňkách se vyvinuly mechanismy umožňující jejich účinnou detoxifikaci. Tyto protektivní mechanismy jsou zajišťovány skupinou enzymů, které mají za úkol katalyzovat metabolismus xenobiotik.

Hlavním cílem této práce bylo popsat dopad kombinovaného působení butyrátu a modelového karcinogenního PAU, benzo[a]pyrenu (B[a]P) na expresi enzymů metabolizujících xenobiotika (XME) v buněčných modelech odvozených z buněk střevního epitelu. Tato práce je zároveň součástí širšího projektu, jehož cílem je popis vlivu lipidových složek potravy na metabolismus a toxicitu xenobiotik v epitelálních buňkách tlustého střeva.

2 Kolorektální karcinom (CRC)

V současnosti se jedná o třetí nejčastější nádorové onemocnění v západním světě. České republice patří dokonce prvenství v incidenci této choroby (Kiss a Tomášek 2006 linkos.cz). Podle Epidemiologie zhoubných nádorů v ČR je každoročně evidováno zhruba 7000 nových případů (údaj za rok 2013), (Dušek et al. 2013). Onemocnění se vyvíjí z benigního adenomového polypu, ze kterého se postupně vytváří pokročilý adenom s vysokým stupněm dysplazie, který postupuje až do stádia invazivního nádoru (Markowitz a Bertagnolli 2009; Shimada a Fujii-Kuriyama 2004). Invazivní stádia, která zůstávají ohraničená ve stěně kolonu (stádium I a II podle TNM klasifikace kolorektálního karcinomu) je možno odstranit chirurgicky, ale pokud se neléčí, rozšíří se do regionálních lymfatických uzlin (stádium III) a

následně metastázuje do odlišných tkání (stádium IV). Choroba ve stádiu IV je již obvykle nevyléčitelná.

Nádory tlustého střeva vznikají z kolonových epiteliálních buněk pokrývajících vnitřní povrch střeva, které se obnovují každých pět dní z populace kmenových buněk střevních krypt (Markowitz *et al.*, 2002). Samotné nádory jsou konečným výsledkem dlouhodobého vícestupňového procesu karcinogeneze, který trvá několik let. Nejprve se zformuje tubulární adenom ze stopkovité polypoidní struktury, který začne růst do lumen tlustého střeva. Postupem času se novotvary přetvářejí a získávají charakter vilózního adenomu s neuspořádanou histologií a dysplazií, ale jako nádor jsou klasifikovány až poté, co invazivní transformované buňky prorostou spodní základní epiteliální membránou střeva (Markowitz *et al.*, 2002).

Nárůst incidence kolorektálního karcinomu v populacích, které migrovaly z oblastí s nízkou incidencí do oblastí s vysokou incidencí, naznačuje významný podíl environmentálních faktorů na vzniku a rozvoji tohoto onemocnění. Výsledky epidemiologických studií ukazují, že riziko vzniku CRC se zvyšuje spolu s příjmem červeného masa, nízkým příjmem kyseliny listové a sedavým životním stylem (Willett 2001). Určitý vliv na rozvoj tohoto onemocnění mají také genetické faktory, asi 3 – 7 % všech ročně zaznamenaných případů tvoří hereditární CRC (Markowitz *et al.*, 2002).

2.1 Genetické faktory přispívající ke vzniku CRC

2.1.1 Dědičné formy CRC

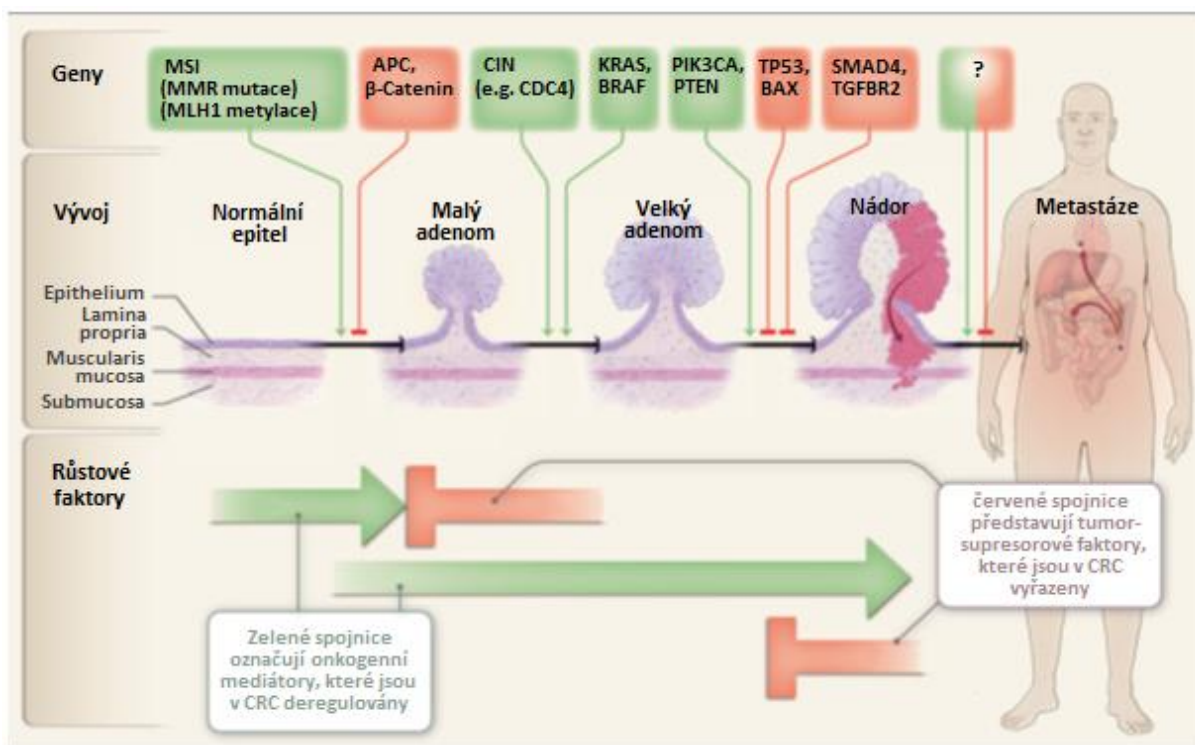
Díky studiu hereditárního CRC jsme schopni lépe pochopit genetické příčiny vzniku tohoto onemocnění (Kinzler a Vogelstein 1996). V případě CRC jde především o mutace genu *APC* (*adenomatic polyposis coli*), které způsobují syndrom familiární adenomatózní polypózy (FAP), při kterém se vyvinou stovky až tisíce kolonových adenomů během třetí až čtvrté dekády života a pravděpodobnost vzniku karcinomu je téměř 100% (Goss a Groden 2000; Kinzler a Vogelstein 1996). *APC* je nádorový supresor a nádory způsobené FAP mají gen *APC* inaktivován nejčastěji delecí (Goss a Groden 2000; Kinzler a Vogelstein 1996). *APC* protein funguje jako supresor Wnt signalizace. Tento protein je součástí cytoplazmatického destrukčního komplexu, který fosforyluje β -katenin. Výsledkem tohoto procesu je pak degradace β -kateninu a inhibice β -kateninem zprostředkované transkripce (Goss a Groden 2000; Kinzler a Vogelstein 1996). Somatická mutace v genu pro *APC* je ve většině případů také prvním krokem při vzniku sporadických karcinomů kolonu.

Další formou dědičného onemocnění přispívajícího ke vzniku CRC je syndrom nepolypózního nádoru kolonu (HNPCC; z angl. hereditary non-polyposis colorectal cancer), který je způsoben mutacemi v genech kódujících proteiny podílející se na DNA mismatch repair (MMR), zejména *MLH1* a *MSH2* (Kinzler a Vogelstein 1996; Markowitz 2000). Nositelé autosomálně dominantních mutací mají 80% riziko vzniku nádorů kolonu v průběhu celého života. Ty jsou v tomto případě lokalizované především do vzestupného tračníku střeva. Inaktivace MMR má za následek téměř tisícinásobné zvýšení spontánních genových mutací (Eshleman *et al.*, 1995). Tento „mutační“ fenotyp urychluje vývoj karcinomu na méně než 36 měsíců. Vytvářejí se „hot spot“ mutační oblasti, zejména v homopolymerních repeticích přítomných v kódujících oblastech některých nádorových supresorů. Příkladem může být třeba mutační inaktivace receptoru TGF- β typu II (Markowitz 2000).

2.1.2 Sporadické CRC

Prvotní model vzniku CRC navrhli Vogelstein a kolektiv (Vogelstein *et al.*, 1988). Hlavní postupné kroky vedoucí ke vzniku nádoru představují aktivace onkogenů *KRAS* a *BRAF* a ztráta funkce nádorových supresorů (*APC*, *DCC*, *MCC*, *TP53*). Tato postupná akumulace genetických změn koreluje s postupnými změnami morfologie (Winder a Lenz 2010). Díky ztrátě stability genomu vznikají v nádorové tkáni častěji mutace nádorových supresorů a onkogenů (Markowitz a Bertagnolli 2009). Genomická nestabilita může souviset s chromosomální nestabilitou, poruchami DNA reparačních mechanismů a aberantní DNA metylací CpG oblastí některých promotorů, která vede k epigenetickému umlčení genů (např. nádorových supresorů).

Přestože se v průběhu vzniku CRC vyskytuje mnoho molekulárních změn, některé signální dráhy jsou zjevně klíčové a jejich deregulace se objevují téměř vždy (Markowitz a Bertagnolli 2009). Jde především o mutace *APC*, dále mutaci genu pro protein p53 a inaktivaci TGF- β signalizace. Dalším častým jevem je aktivace onkogenů *KRAS* a *BRAF* aktivujících MAPK signalizaci, která se vyskytuje v 37 %, respektive 13 % CRC (Davies *et al.*, 2002; Siena *et al.*, 2009). Postupná akumulace genetických a morfologických změn je znázorněna na Obrázku č. 1.



Obrázek č. 1: Schéma genů vývoje CRC. Upraveno podle: (Markowitz a Bertagnolli 2009).

Přibližně 90 % všech případů CRC představují sporadické nádory bez předešlého výskytu v rodině (Diggs *et al.*, 2011). Epidemiologické studie ukazují, že environmentální faktory, zejména strava, hrají významnou roli v náchylnosti k CRC (Cross a Sinha 2004; Martinez 2005). Odhaduje se, že stravovací návyky přispívají až k 80 % případů CRC (Willett 1995), a proto je velmi důležité pochopit vliv dietárních karcinogenů i jejich metabolismus ve střevním epitelu.

3 Xenobiotika

Cizorodé látky přírodního původu jsou, stejně jako jejich antropogenní protějšky, biologicky aktivní látky schopné modulovat fyziologické procesy v organismu. Největším zdrojem expozice těmto látkám je strava. Mnoho chemikálií obsažených ve stravě má nepříznivé účinky na lidský organismus. Zdrojem většiny z nich jsou rostliny a houby. Řada potenciálně nebezpečných látek se do potravy dostává druhotně: uvolňuje se např. z plastových obalů (ftaláty), kontaminuje potraviny při nesprávném skladování (mykotoxiny plísní) nebo vzniká při jejich tepelné úpravě (Ioannides 2002). Látky vznikající během tepelné úpravy jídla jsou účinnými karcinogeny a patří mezi ně zejména heterocyklické aminy a PAU.

Uvádí se, že průměrný obyvatel Severní Ameriky přijme denně 5000 – 10000 různých chemikálií a produktů jejich rozpadu (Ames *et al.*, 1990). Ne všechny tělo dokáže nějak smysluplně využít, ať už k vytvoření energie, růstu nových tkání nebo jako chemické posly. Z tohoto důvodu se pro tyto látky vžil souhrnné označení xenobiotika (z řeckého: xeno – cizí, bios – život), tedy „životu cizí“. Tělo tyto látky rozeznává jako potenciálně škodlivé a snaží se je ihned odstranit. Většina z nich má lipofilní charakter, který jim umožňuje procházet skrz buněčné membrány a snáze se dostat do krevního oběhu (Ioannides 2002). Mechanismy na eliminaci xenobiotik, které si organismy vyvinuly, jsou založeny na enzymech schopných metabolicky přeměnit tyto lipofilní látky na hydrofilní sloučeniny (Ioannides 2002), které je snazší vyloučit z buněk i organismu (v moči nebo stolici).

3.1 Heterocyklické aromatické aminy (HAA)

První zmínka o karcinogenech z tepelně upraveného masa, pochází ze studie Widmarka (1939), který zkoumal účinek extraktů pečeného koňského masa na myších a zaznamenal, že způsobují vznik nádorů mléčné žlázy. Mezi sloučeniny, pravděpodobně zodpovědné za tento efekt, patří heterocyklické aromatické aminy (HAA). Ty byly poprvé objeveny ve vařených pokrmech profesorem Sugimurou a jeho spolupracovníky v roce 1977 (Sugimura *et al.*, 1977). HAA patří mezi mutagenní sloučeniny vznikající během tepelné úpravy masa, které nejsou detekovatelné v nezahřívaných produktech (Skog *et al.*, 1998). Vznik různých HAA je závislý hlavně na teplotě a podmínkách při zahřívání (Murkovic 2004; Sugimura *et al.*, 2004). Chemické struktury, které vznikají při teplotách mezi 100 - 300 °C se nazývají termické HAA typu IQ (imidazochinolin nebo imidazochinoxalin) či aminoimidazoazaareny (Jägerstad *et al.*, 1998). Nad 300 °C dochází k pyrolýze proteinů a takto vzniklé HAA se označují jako pyrolytické nebo typu non-IQ (Jägerstad *et al.*, 1998).

Termické HAA se objevují téměř ve všech potravinách živočišného původu, protože hlavním prekurzorem jejich vzniku je kreatin, který je v nich obsažený (Jägerstad *et al.*, 1998). 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP) byl však nalezen nejen v mase, ale i uzeném sýru, víně a pivu (Manabe *et al.*, 1993; Naccari *et al.*, 2009). V tomto případě je jeho původ pravděpodobně environmentální, jelikož PhIP vzniká během procesu hoření.

Většina HAA není ve své přirozené podobě mutagenní a vyžadují nejprve metabolickou aktivaci (Frandsen *et al.*, 1991; Hellmold *et al.*, 1998). Hlavní aktivační dráha zahrnuje N-hydroxylaci pomocí enzymů fáze I následovanou esterifikací enzymy fáze II (Cheng *et al.*, 2006). Pro některé HAA může být modifikace ve fázi II klíčová a mnohonásobně zesilovat jejich toxicitu, jak ukazují výsledky studií s použitím enzymů fáze II (Davis *et al.*, 1993; Chou

et al., 1995; Sadrieh *et al.*, 1996). Metabolity HAA mohou vytvářet DNA adukty, jejichž role v procesu karcinogeneze byla prokázána v *in vitro* (Malfatti *et al.*, 1995; Wakabayashi *et al.*, 1992) i *in vivo* studiích (Director *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2013; Totsuka *et al.*, 1996). Dlouhodobé podávání HAA (v krmivu se zvýšeným obsahem IQ, MeIQ a MeIQx) vede ke vzniku nádorů u myši, zejména v játrech a střevech (Ohgaki *et al.*, 1987). Na základě této a dalších studií byl IQ v roce 1993 klasifikován Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) jako možný karcinogen (třídy 2A) a 8 dalších HAA jako pravděpodobné karcinogeny (třída 2B), (Gibis 2016). Jejich genotoxicita a mutagenita byla potvrzena i Amesovým testem (Sugimura *et al.*, 2004). HAA lze tedy řadit mezi velmi silně mutagenní sloučeniny.

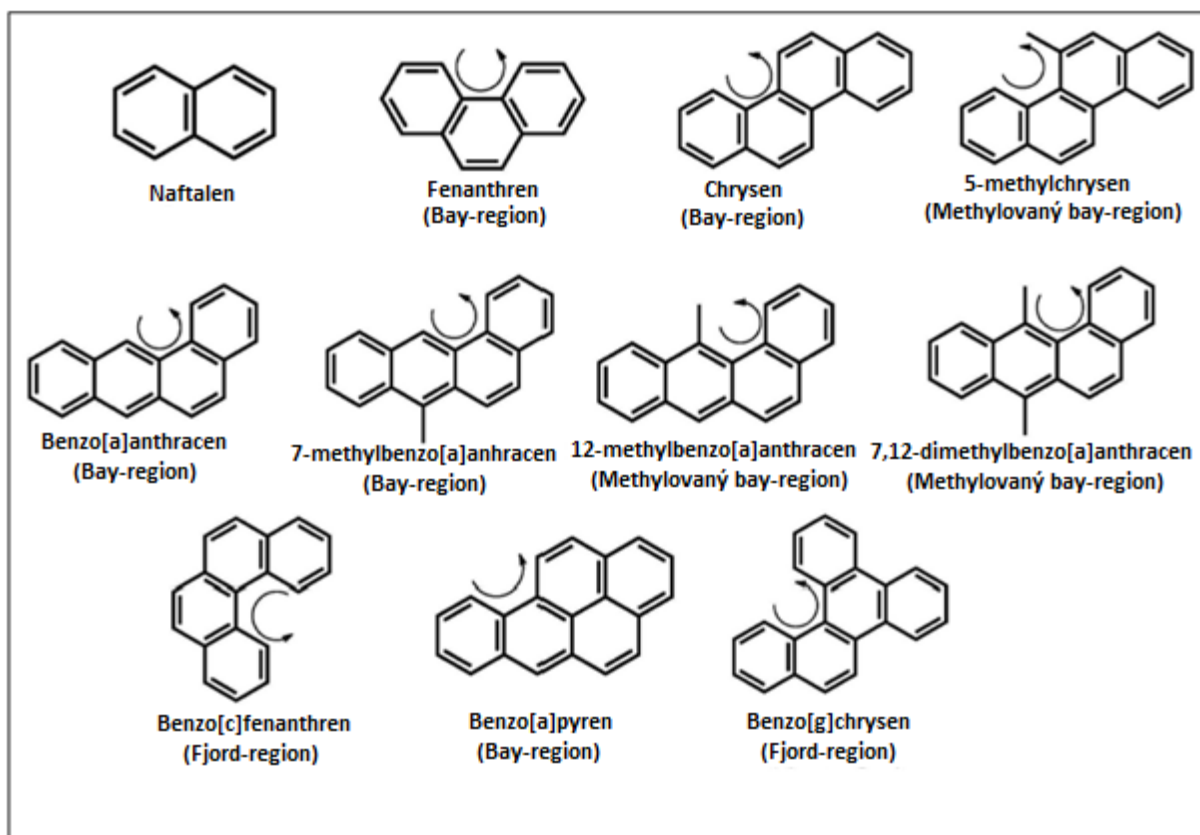
3.2 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou široce rozšířené environmentální polutanty. Většina PAU je antropogenního původu a jejich zdrojem je hlavně spalování fosilních paliv motory, koksovny, ropné rafinerie, tepelné elektrárny, spalovny odpadu a další průmyslová činnost (Christensen a Bzdusek 2005; Moon *et al.*, 2006). Jakožto složky tabákového kouře a výfukových plynů jsou velice pravděpodobně odpovědné za vznik karcinomu plic (Burczynski *et al.*, 1999; Palackal *et al.*, 2002).

PAU charakterizuje přítomnost dvou nebo více spojených aromatických kruhů v různých konfiguracích. Na základě jejich uspořádání bývají někdy členěny na PAU bez tzv. „bay region“ (např. naftalen), s „bay region“ (např. B[a]P) a s „fjord region“ (benzo[g]chrysen), (Obrázek č. 2). PAU lze dále rozdělit do skupin podle počtu aromatických kruhů (Zhang *et al.*, 2012). Dva aromatické kruhy tvoří naftalen, tři kruhy fenanthren, čtyři kruhy tvoří chrysen a 5-metyl-chrysen, pět kruhů tvoří benzo[a]pyren (B[a]P) a benzo[g]pyren atd.. Modelovým PAU se stal B[a]P, který je již řadu let široce využíván ke studiu mutagenních a karcinogenních účinků PAU (Conney 1982).

Potrava představuje jeden z hlavních zdrojů PAU. Existují dva hlavní způsoby, kterými se PAU do potravy dostávají. Jsou to environmentální a syntetická cesta. V případě environmentální cesty je syrová potrava (například ovoce a zelenina) kontaminována PAU přítomnými přímo ve vzduchu a půdě (Bansal a Kim 2015). Koncentrace mohou být významné v blízkosti průmyslové zóny, nebo v oblastech s hustou automobilovou dopravou (Kwon a Choi 2014; Suman *et al.*, 2016). Například v oblasti s rušnou dopravou mohou koncentrace PAU v půdě (v hloubce 5 – 15 cm) průměrně dosahovat až 3 mg/kg (Bishnoi *et al.*, 2006). Podobně

také voda může obsahovat PAU. Do lidského organismu se pak dostávají konzumací kontaminované vody a potravy (Nwaichi a Ntorgbo 2016).

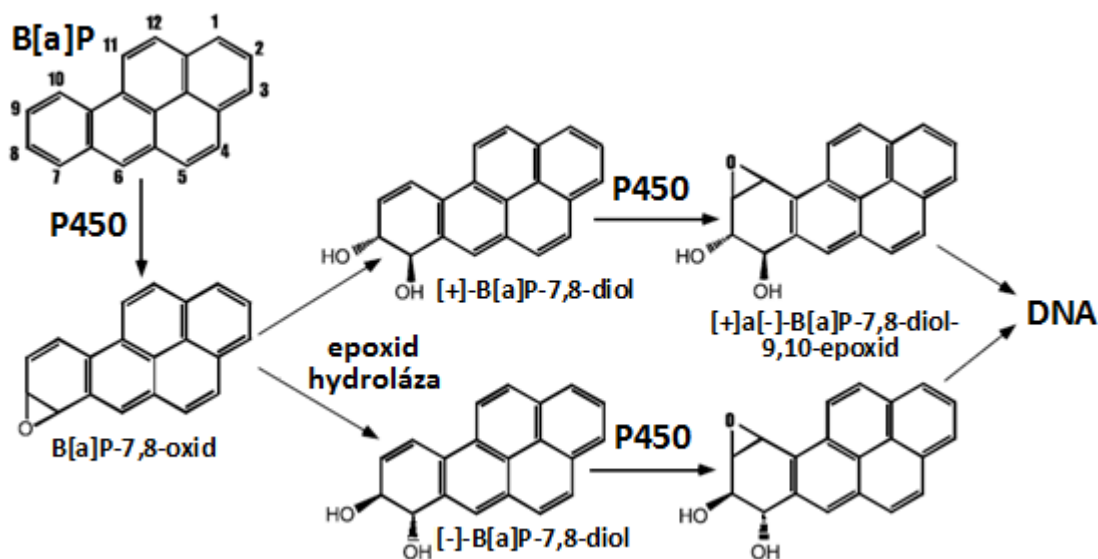


Obrázek č. 2: Chemická struktura PAU. Šipka ukazuje pozici Bay nebo Fjord region.
Upraveno podle: (Zhang et al., 2012).

Kontaminace syntetickou cestou spočívá v nesprávné tepelné úpravě pokrmů a průmyslových metodách zpracování (Bansal a Kim 2015). Nejvíce PAU vzniká při grilování masa, ryb a tučných jídel (Jägerstad a Skog 2005). Tento proces vzniku se nazývá pyrolýza. Novější studie také udává spojitost s materiálem, který je při tepelné úpravě spalován (Rose et al., 2015). PAU samy o sobě nejsou reaktivní a potřebují být nejprve metabolicky aktivovány na elektrofilní vysoce reaktivní sloučeniny, které mají škodlivý efekt (Gelboin 1980).

3.2.1 Benzo[a]pyren (B[a]P)

B[a]P, jak již bylo zmíněno, je karcinogenní PAU, jehož planární molekula obsahuje „bay region“ a je složena z pěti aromatických kruhů. Mechanismus, kterým je B[a]P přeměněn na toxické reaktivní metabolity, je zprostředkován detoxifikačními enzymy rodiny cytochromů P450. Mezi mnoha různými metabolity vznikajícími v buňkách ovlivněných B[a]P je (+) anti-benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) ten, který nejefektivněji vytváří adukty s DNA (Endo *et al.*, 2008; Levin *et al.*, 1986). Dráha vedoucí ke vzniku epoxidů B[a]P byla podrobně prostudována na potkaních mikrosomech a systémech obsahujících izolované CYP enzymy a mikrosomální epoxid hydrolázu (Gelboin 1980; Shimada a Fujii-Kuriyama 2004). B[a]P je oxidován enzymy CYP1A1 a CYP1B1 na fenoly (jako 3-hydroxy- B[a]P a 9-hydroxy- B[a]P) a epoxidy (např. B[a]P-7,8-epoxid). Ten je dále metabolizován epoxid hydrolázou na B[a]P-7,8-dihydrodiol, který následně slouží jako substrát pro další oxidaci pomocí cytochromu P450 (Endo *et al.*, 2008). Výsledkem je vysoce toxický BPDE.



Obrázek č. 3: Metabolická aktivace B[a]P pomocí CYP enzymů a epoxid hydrolasy. Upraveno podle: (Shimada a Fujii-Kuriyama 2004).

Tato dráha metabolické aktivace B[a]P hraje zásadní roli v jeho toxicitě a mutagenitě (Hankinson *et al.*, 1991). Existují ale i další dvě metabolické dráhy aktivace B[a]P. Kromě již zmíněné tzv. diol-epoxidové dráhy může být B[a]P aktivován také tzv. dráhou radikálového kationu a o-chinonovou dráhou (Xue a Warshawsky 2005).

3.3 Enzymy metabolizující xenobiotika

Richard Tecwyn Williams (1909–1979), jeden ze zakladatelů studia metabolismu léčiv a cizorodých látek, jako první představil myšlenku rozdělení biotransformačních reakcí na dvě úrovně, které nazval reakce fáze I a fáze II (David Josephy et al., 2005). Podle jeho hypotézy je možné metabolismus většiny cizorodých látek rozdělit do těchto dvou fází. Fáze I zahrnuje oxidační, redukční a hydrolyzační reakce a fáze II pak syntézy, převážně konjugací reakce. Podle Williamse mohou být v první fázi biologicky aktivní látky inaktivovány, nebo jejich aktivita alespoň pozměněna, a biologicky neaktivní látky naopak aktivovány. Druhá fáze je ve většině případů inaktivační proces a vytváří metabolity připravené k přímému vyloučení ledvinami (David Josephy et al., 2005).

Dnes už víme, že druhá fáze bioaktivace, tedy konjugací reakce, může také zvyšovat toxicitu a reaktivitu řady xenobiotik (David Josephy et al., 2005). Původní Williamsovo rozdělení je tedy neplatné, nicméně terminologie a rozdělení na fázi I a fázi II se používá dodnes. Nutno také podotknout, že toto rozdělení je pouze rámcové a někteří autoři jej považují za zavádějící a přiklání se spíše ke klasifikaci enzymů čistě podle charakteru jejich aktivity (David Josephy et al., 2005). Pro potřeby této práce však bude zachováno toto jednoduché členění.

V lidském těle je řada enzymatických systémů adaptovaných k přetváření xenobiotik na polární metabolity. Primárně jsou vysoké hladiny těchto enzymů přítomné v játrech a dalších tkáních s potenciálně vysokou expozicí xenobiotikům (Fujii-Kuriyama a Mimura 2005). Na buněčné úrovni jsou umístěny na endoplazmatickém retikulu, mitochondriích nebo volně v cytosolu (Ioannides 2002). Mezi tyto enzymy patří například monooxygenasy (cytochromy P450, CYP), reduktasy (aldo-keto reduktasy, AKR), transferasy (N-acetyl transferasy, NAT; glutathion-S-transferasy) dehydrogenasy (NADPH dehydrogenasy) a další. Při klasifikaci metabolismu xenobiotik vycházíme z původního rozdělení na fázi I a fázi II. Kromě těchto dvou fází je někdy rozlišována také fáze III, během které probíhá vyloučení metabolitů pomocí transportérových proteinů (např. ABC transportéry). Ve většině případů metabolismus ruší biologickou aktivitu xenobiotik tak, že vytváří metabolity neschopné dostat se k cílovému receptoru nebo s ním interagovat (Ioannides 2002).

3.3.1 Cytochromy P450 (CYP)

Bezesporu nejvšestrannějším enzymatickým systémem zapojeným do metabolismu xenobiotik jsou cytochromy P450 (CYP). CYP katalyzují metabolismus širokého spektra chemikálií výrazně se lišících ve velikosti i struktuře (Ioannides a Lewis 2004). Cytochrom

P450 je proteinová nadrodina složená z mnoha enzymů s různou substrátovou specifitou. Lze ji rozčlenit do mnoha rodin, které jsou dále rozděleny do podrodin, které mohou zahrnovat jeden nebo více enzymů (isoform). Jsou přítomny téměř ve všech živých organismech (Guengerich 2003).

Je známo více než 1300 isoform CYPů a z toho důvodu byla v roce 1987 zavedena jednotná klasifikace, která se užívá dodnes (Nebert a Gonzalez 1987). Dnes je k dispozici online databáze „Cytochrome P450 Homepage“, která obsahuje informace o nomenklatuře a sekvenci genů pro CYP, kterou vytvořil D. R. Nelson (Nelson 2009).

Klasifikace CYP do rodin je založena na primární sekvenční homologii, nikoli na jejich metabolické funkci. CYP enzymy náležící do stejné rodiny mají alespoň 40% strukturní homologii a enzymy stejné podrodiny sdílí alespoň 55 % strukturní homologie (Ioannides a Lewis 2004). Systém lze nejlépe vysvětlit na konkrétním příkladu. CYP1A1 je označení pro isoformu enzymu cytochrom P450 náležící do rodiny 1, podrodiny A s označením 1. Rodiny zodpovědné za metabolismus xenobiotik jsou CYP1 až CYP3 a částečně i CYP4. Zbylé rodiny metabolizují převážně endogenní substráty (Ioannides a Lewis 2004).

Lidské CYPy jsou kódovány 57 geny a jsou rozděleny do 18 rodin a 44 podrodin. U savců jsou všechny CYP vázány na membrány. Většina jich je lokalizována na endoplazmatickém retikulu, zbytek na membráně mitochondrií (Anandatheerthavarada *et al.*, 1999). Všechny CYPy na endoplazmatickém retikulu přijímají elektron z jediného flavoproteinu – cytochrom P450 reduktasy – enzymu, který zajišťuje přenos elektronu z NADPH na CYP. Mitochondriální CYP využívají elektronový transportní řetězec s adrenodoxinem a flavoproteinem adrenodoxin reduktasou (Anandatheerthavarada *et al.*, 1999; Guengerich 2003).

V kontextu metabolismu PAU ve tkáni střevního epitelu nás nejvíce zajímají isoformy rodiny CYP1. Je to především CYP1A1 a 1B1, které jsou lokalizovány i mimo jaterní tkáň (extrahepatické) a jejich exprese je velmi často zvýšena v nádorových tkáních (Go *et al.*, 2015; Shimada *et al.*, 1996). Transkripce CYP1 je regulována prostřednictvím AhR (aryl hydrocarbon receptor) (Nebert a Karp 2008). PAU a halogenované aromatické uhlovodíky (HAU), jako je např. 2,3,7,8-tetrachlórdibenzo-p-dioxin (TCDD), jsou účinné AhR ligandy, které ho aktivují. Hladiny exprese CYP1A1 a CYP1B1 mohou tedy mj. sloužit i jako biomarkery toxicity a aktivace environmentálních karcinogenů (Go *et al.*, 2015). Enzymy CYP1 rodiny hrají klíčovou roli v produkci vysoce mutagenního BPDE (Xue a Warshawsky 2005).

3.3.2 Aldo-keto reduktasy (AKR)

Aldo-keto reduktasy (AKR) jsou nadrodina monomerických oxidoreduktas závislých na NAD(P)H. Jsou lokalizovány v cytosolu buněk, mají přibližně 320 aminokyselin v řetězci a jejich molekulární hmotnost je zhruba 34-37 kDa (Jez *et al.*, 1997). Nomenklatura AKR enzymů se řídí podobnými pravidly jako v případě CYP, s tím rozdílem, že isoformy AKR jsou rozdělovány do rodin na základě sekvence aminokyselin (Jez *et al.*, 1997). Informace o jednotlivých isoformách jsou rovněž přístupné v on-line databázi (www.med.upenn.edu/akr/).

AKR katalyzují redukci aldehydů a ketonů za vzniku primárních a sekundárních alkoholů z širokého spektra endogenních substrátů a xenobiotik (Hara *et al.*, 1996; Jin a Penning 2007) Řadí se mezi enzymy biotransformace fáze I. AKR jsou zapojeny do procesu vzniku mnoha onemocnění. Například AKR1B1 je spojována s komplikacemi v případě diabetu, AKR1B10 se pravděpodobně účastní patogeneze nádoru plic a hepatocelulárního karcinomu (Fukumoto *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2012; Penning a Lerman 2008). AKR1 rodina hraje zásadní roli v metabolismu pohlavních hormonů a může proto být zapojena do procesu vzniku hormonálně závislých malignit jako jsou karcinom prsu nebo prostaty (Penning a Byrns 2009). Předmětem zájmu této práce je však úloha AKR v metabolismu PAU.

AKR se podílejí na metabolismu PAU a jsou klíčovými enzymy metabolické dráhy, při níž vznikají vysoce reaktivní *ortho*-chinony. Primární metabolity vzniklé aktivitou CYP enzymů, jako je B[a]P-7,8-trans-dihydrodiol, jsou oxidovány AKR a dávají vznik ketolům, které se spontánně přeskupují a vytvářejí katecholy (Burczynski *et al.*, 1998; Palackal *et al.*, 2001; Palackal *et al.*, 2002) B[a]P-7,8-katechol není stabilní molekula a podstupuje autooxidaci za vzniku B[a]P-7,8-dionu (chinon). PAU o-chinony mají elektrofilní charakter a velmi snadno reagují s endogenními nukleofily. Mohou také reagovat přímo s DNA a vytvářet stabilní adukty (Balu *et al.*, 2006; McCoull *et al.*, 1999; Shou *et al.*, 1993). Důležitým mechanismem toxického účinku o-chinonů je také produkce ROS (reaktivní formy kyslíku, z angl. reactive oxygen species). Ty jsou produkovány redoxním cyklem, do kterého je zapojena molekula NADPH a katecholy vzniklé zpětnou redukcí o-chinonu. ROS způsobují poškození DNA, které může v konečném důsledku způsobit G-T transverzi například v genu *KRAS* nebo *TP53* (Cheng *et al.*, 1992; Kasai *et al.*, 1986). Podle některých studií s použitím *in vitro* p53 testu mutagenity mohou být PAU o-chinony ještě více mutagenní než diol epoxidy (BPED)(Park *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2002).

3.3.3 Arylamin N-acetyltransferasy (NAT)

NAT jsou rodinou XME vyskytující se ve tkáních eukaryotických i prokaryotických organismů. Jejich aktivita spočívá v katalýze přenosu acetylové skupiny z acetyl koenzymu A na xenobiotický substrát, kterým mohou být například arylaminy, arylhydroxylaminy, arylhydraziny a další (Eggleton *et al.*, 2014). Těmito substráty mohou být farmaceutika nebo z environmentálního hlediska významné sloučeniny jako 4-aminobifenyl, nebo HAA (Mitchell a Warshawsky 2003).

V lidském genomu se vyskytují dva geny pro NAT, jsou to *NAT1* a *NAT2*. Oba produkty těchto genů jsou enzymy biotransformační fáze II. *NAT1* je přítomný téměř ve všech tkáních organismu a sehrává mimo jiné roli v udržení homeostázy různých kofaktorů (Minchin 1995; Wakefield *et al.*, 2007). Naproti tomu *NAT2* je exprimována převážně v játrech a střevních buňkách.

Oba lidské geny *NAT1* i *NAT2* jsou polymorfní a výsledky studií naznačují, že různé polymorfizmy těchto genů mohou ovlivňovat náchylnost ke vzniku nádorů v různých tkáních vystavovaných působení xenobiotik (Hein *et al.*, 2000). Na základě polymorfizmů se lidská populace dělí na rychlé a pomalé acetylátory. Některé studie také prokázaly spojitost mezi hladinami exprese *NAT1* a estrogenového receptoru (ER) v karcinomu prsu (Bièche *et al.*, 2004). Tato korelace naznačuje, že role *NAT1* v karcinogenezi může být spojena také s metabolismem endogenních látek, nejen xenobiotik. *NAT1* byl zařazen mezi 10 genů s největším nárůstem exprese v ER pozitivních nádorech (Adam *et al.*, 2003; Tozlu *et al.*, 2006). *NAT1* je tedy předmětem zájmu jako potenciální diagnostický a prognostický biomarker pro ER+ nádory a podle některých nedávných studií také nový terapeutický cíl v léčbě těchto nádorů (Butcher a Minchin 2012).

V kontextu vzniku kolorektálního karcinomu jsou NAT důležité hlavně při bioaktivaci HAA. Prvním krokem v metabolické aktivaci HAA je hydroxylace katalyzovaná CYP enzymy (Kato a Yamazoe 1987). Výsledné N-hydroxy deriváty jsou obecně velmi málo reaktivní s DNA, ale mohou být dále acetylovány na estery, které velmi snadno vytváří DNA adukty (Davis *et al.*, 1993; Snyderwine *et al.*, 1993). O-acetylce je katalyzována právě enzymy NAT. Aktivita *NAT1* v lidských epiteliálních buňkách kolonu a močového měchýře je důležitým faktorem při určování rizika vzniku karcinomu a metabolické aktivace arylaminů *in situ* (Badawi *et al.*, 1995; Bell *et al.*, 1995).

3.3.4 Glutathion S-transferasy (GST)

GST představují velkou a různorodou skupinu enzymů fáze II, které detoxikují potenciální mutageny, karcinogeny, cytotoxické reaktivní metabolity a elektrofilní sloučeniny tím, že katalyzují jejich konjugaci s glutathionem (Khabaz 2012). Glutathion je endogenní antioxidant přítomný v savčích buňkách. Zde se vyskytují převážně dvě formy - redukováná forma (GSH) a oxidovaná forma glutathion disulfid (GSSG), (Noh *et al.*, 2012). Hlavní fyziologickou funkcí glutathionu je vychytávání volných radikálů a toxinů, tedy obrana buněčných struktur před oxidativním stresem a toxickým poškozením (Niu *et al.*, 2012). Konjugace GSH s elektrofilů je jednou z hlavních reakcí fáze II. GST katalyzují zejména nukleofilní aromatické substituce, Michaelovy adice a reakce otevírající řetězec epoxidů, přičemž výsledkem všech je vznik GSH konjugátů (Sheehan *et al.*, 2001).

GST jsou dimerní enzymy nacházející se převážně v cytosolu. Kromě role, kterou zastávají v detoxikačních procesech, jsou též aktivovány širokým spektrem ligandů (Barycki a Colman 1997). Pravděpodobně jsou také zapojeny do mechanismu resistance k chemoterapeutikům (McLellan a Wolf 1999; Tew 1994), insekticidům (Ranson *et al.*, 1997) a antibiotikům (Arca *et al.*, 1990).

GST představují komplexní a široce rozšířenou nadrodinu enzymů, která je rozdělena do mnoha tříd na základě různých kritérií zahrnujících nukleotidovou sekvenci, imunologické a kinetické vlastnosti a strukturu (Sheehan *et al.*, 2001). Třídy s označením Alfa, Mi, Pi, Theta, Kappa, Omega se vyskytují u savců a Beta, Sigma, Zeta jsou přítomné u jiných organismů.

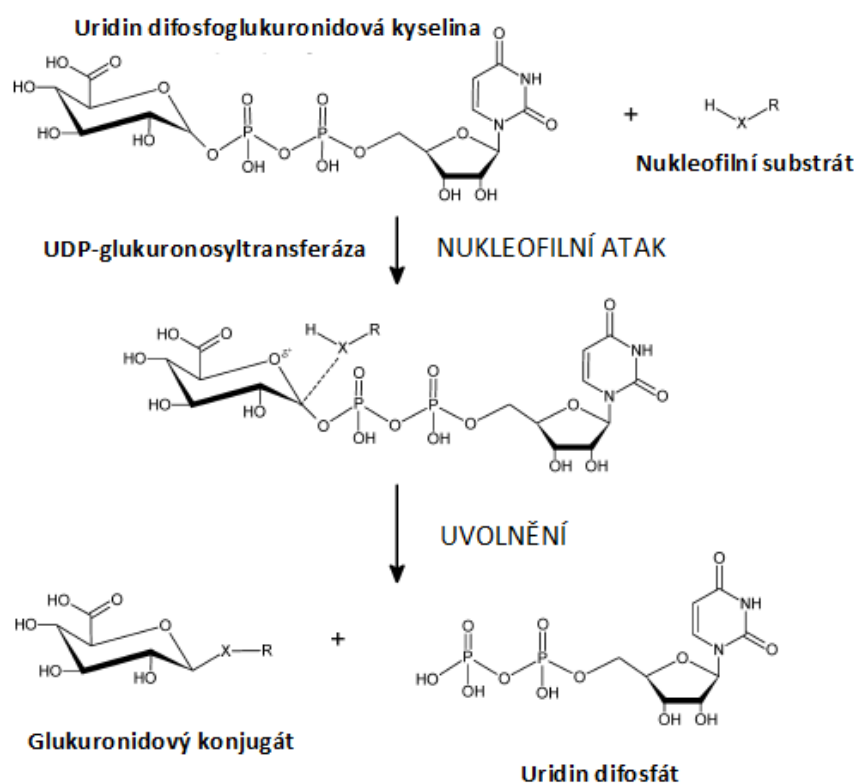
GST hrají důležitou roli v detoxifikaci PAU oxidů a diol-epoxidů (BPDE) (Hayes *et al.*, 2005). Hladiny GST enzymů mohou být ovlivněny indukci, nebo genetickými polymorfismy. Některé studie uvádí spojitost mezi GST polymorfismy v genech *GSTA*, *GSTM1*, *GSTP1* a predispozicemi ke vzniku nádorů, jiné ji vyvrací (Bedford *et al.*, 2012; Ntais *et al.*, 2005; Vogl *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003).

V gastrointestinálním traktu je nejvíce zastoupena isoforma GSTP1 jejíž exprese klesá od žaludku do tlustého střeva (Coles *et al.*, 2002). Hladiny tohoto proteinu se zvyšují spolu se stádiem neoplastické transformace kolonu - nejnižší hladina je v normální tkáni, nejvyšší ve stádiu adenokarcinomu (Gaitanarou *et al.*, 2008). Předpokládá se také, že GSTP1 svou aktivitou působí proti účinku chemoterapie prostřednictvím inaktivace protinádorových léků. Zvýšená exprese GSTP1 v nádorových buňkách kolonu může být zodpovědná za rezistenci k lékům jako je 5-fluorouracil (Townsend a Tew 2003).

3.3.5 UDP-Glukuronosyl transferasy (UGT)

Lidské UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) jsou mikrosomální enzymy, které přednostně katalyzují reakci označovanou jako glukuronidace. Tato reakce zahrnuje kovalentní připojení glukuronové kyseliny, odvozené z kofaktoru UDP-glukuronové kyseliny, k substrátu nesoucímu vhodnou funkční skupinu (Rowland *et al.*, 2013). Kromě konjugátu s glukuronidem vzniká během reakce také uridin difosfát.

Jako substrát pro glukuronidaci mohou sloužit mnohé nukleofilní sloučeniny. Mezi ně patří alifatické alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny, aromatické aminy, thioley a další (Rowland *et al.*, 2013). Schopnost UGT metabolizovat takto široké spektrum běžně se vyskytujících funkčních skupin, řadí glukuronidaci mezi nejběžnější eliminační reakce fáze II pro mnohé strukturně odlišné endogenní i exogenní sloučeniny (Miners *et al.*, 2002). Spolu s CYP450 jsou UGT zodpovědné za odstranění více než 90 % léčiv závislých na jaterní eliminaci (Rowland *et al.*, 2013). Glukuronidace je zapojena v metabolismu klíčových endogenních sloučenin včetně bilirubinu, mastných kyselin, steroidních hormonů, tyroidních hormonů a rozpustných vitamínů (Burchell *et al.*, 1995; Miners *et al.*, 2004; Tukey a Strassburg 2000).



Obrázek č. 4: Reakční schéma Glukuronidace. Upraveno podle: (Rowland *et al.*, 2013).

Na základě sekvenční homologie jsou lidské UGT rozděleny do 4 genových rodin: UGT1 na chromosomu 2q37, UGT2 na chromosomu 4q13, UGT3 na chromosomu 5p13.2 a UGT8 na chromosomu 4q26 (Tukey a Strassburg 2000). Různé isoformy rodiny UGT1 vznikají alternativním sestřihem jednoho genu (Rowland *et al.*, 2013). V metabolismu xenobiotik jsou nejúčinnější rodiny UGT1 a UGT2. V gastrointestinálním traktu jsou nejvíce exprimované isoformy UGT1A1, 1A6, 1A10, 2B15 a 2B17 (Rowland *et al.*, 2013). Na buněčné úrovni jsou všechny UGT transmembránové proteiny lokalizované převážně v membráně hladkého endoplazmatického retikula.

3.3.6 NAD(P)H:chinon oxidoreduktasy (NQO)

NQO je skupina cytoplazmatických enzymů s funkcí dvouelektronové reduktasy, které katalyzují redukci chinonů na hydrochinony s využitím NAD(P)H jako kofaktoru (Ross *et al.*, 2000). Výsledkem reakce jsou substráty pro konjugací reakce fáze II. Redukce na hydrochinon probíhá v jednom kroku, čímž přeskakuje fázi vzniku radikálních semichinonových intermediátů, které jsou vysoce reaktivní (Jaiswal 2000). Byly identifikovány dvě isoformy, NQO1 a NQO2. Chinon reduktázy byly objeveny v širokém spektru eukaryotických organismů, od kvasinek po savce (Deller *et al.*, 2007).

NQO1 je primárně cytosolický enzym (> 90%) a existuje ve formě homodimeru s jednou molekulou FAD na monomer (Ross *et al.*, 2000). Katalyzuje redukci širokého spektra substrátů od chinonů, chinon-iminů, naftochinonů, dichlorofenolindolfenolů až po azo a nitro sloučeniny (Lind *et al.*, 1990).

Ne všechny hydrochinony, vznikající katalýzou NQO1, jsou stabilní a v některých případech se vytváří reaktivnější produkty. Redoxně nestabilní hydrochinony mohou reagovat s molekulárním kyslíkem za vzniku reaktivních druhů kyslíku a druhotně mohou také vznikat reaktivní semichinony prostřednictvím komproporcionačních reakcí (Cadenas 1995).

NQO1 představuje protein s více různými protektivními účinky, které přesahují rámec jeho katalytických funkcí (Ross 2004). Bylo zjištěno, že má schopnost přímo vychytávat superoxid, a to jen s o něco menší účinností než SOD (superoxid dismutasa) (Siegel *et al.*, 2004). Tato schopnost je důležitá zejména ve tkáních s nízkou expresí SOD. Další protektivní efekt, který stojí za zmínku je relativně nedávno objevená schopnost stabilizace tumor supresorových proteinů p53, p33 a p73α prostřednictvím regulace aktivity 20S proteasomu (Asher *et al.*, 2005; Asher *et al.*, 2001).

4 Mechanismy genotoxicity a karcinogenity PAU

4.1 Receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR)

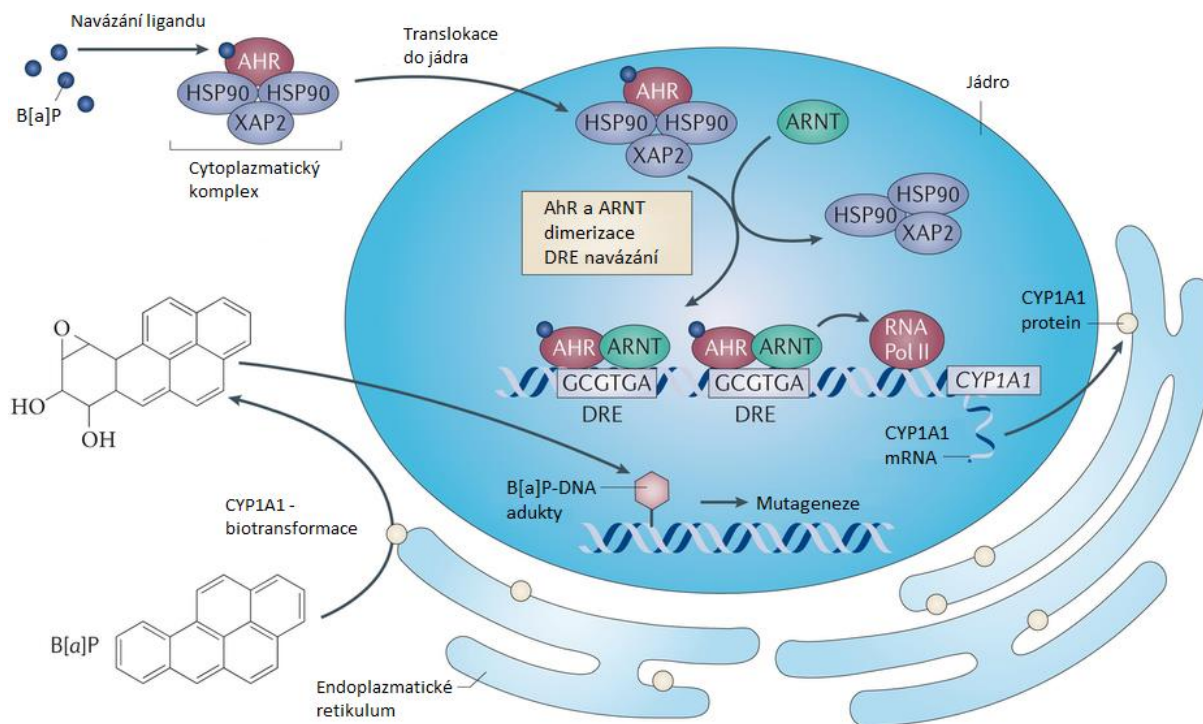
Prvním krokem působení PAU je často aktivace receptoru pro aromatické uhlovodíky (AhR, z angl. aryl hydrocarbon receptor). AhR je transkripční faktor náležící do rodiny proteinů, které spojuje přítomnost těchto vazebných domén: bazická šroubovice-otáčka-šroubovice (basic helix-loop-helix) a PAS doména (Per/Arnt/Sim) (Hankinson 1995; Whitlock Jr 1993). V rodině těchto proteinů je AhR jediný savčí protein, který je aktivován ligandy (Beischlag *et al.*, 2008). PAS doména byla identifikována u proteinů, které se podílejí na regulaci odpovědi organismu na rychlé změny okolního prostředí (Gu *et al.*, 2000). Stejnou doménu obsahuje například HIF-1 α (z angl. hypoxia inducible factor), což je protein zajišťující rychlou odpověď na snížený parciální tlak kyslíku (Kewley *et al.*, 2004). PAS doména je vysoce konzervována a evolučně velmi stará.

AhR byl původně objeven díky schopnosti indukovat enzymy podílející se na metabolismu B[a]P a dalších PAU, které se také staly jeho prvními známými ligandy (Swanson a Bradfield 1993). Dnes je známo více než 400 exogenních AhR ligandů. Kromě PAU jsou to například polyhalogenované dioxiny a dibenzofurany, nebo polychlorované bifenyly (PCB) (Denison *et al.*, 2002). Nejsilnějším známým toxickým ligandem je 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD).

Je všeobecně uznáváno, že toxické účinky řady těchto environmentálních polutantů jsou přímým důsledkem aktivace AhR. Biochemické a genetické studie s použitím AhR aktivátorů pomohly pochopit důležité molekulární dráhy, ve kterých je tento receptor zapojen a alespoň částečně tak objasnit toxické efekty těchto látek (Dietrich a Kaina 2010). Společnou odpovědí po navázání ligandu na AhR je indukce exprese genů. V cytosolu je receptor v komplexu s dvěma Hsp90 proteiny a proteiny XAP2 a p23 (Carver a Bradfield 1997; Ma a Whitlock 1997). Po navázání ligandu je komplex translokován do jádra, kde uvolněný AhR vytváří heterodimer s ARNT (AhR nuclear translocator). Tento heterodimer se pak váže k dioxin-responsivním elementům (DRE), známým též jako xenobiotické responzivní elementy (XRE), a spouští expresi cílových genů AhR (Dietrich a Kaina 2010). Společným znakem těchto elementů je sekvence 5'-TNGCGTG-3'. Typickými cílovými geny jsou geny kódující XME fáze I a II.

Aktivace AhR dráhy tedy vede k detoxikaci a vyloučení PAU, ale zároveň může vést k jejich metabolické aktivaci (bioaktivaci). Skutečnost že B[a]P není karcinogenní u myší s vyřazeným genem pro AhR dokazuje, že „kanonická“ AhR dráha je nezbytná pro iniciaci

nádorové transformace prostřednictvím PAU u zvířat a pravděpodobně také u lidí (Nakatsuru *et al.*, 2004; Shimizu *et al.*, 2000).



Obrázek č. 5: Schéma aktivace AhR pomocí B[a]P

AhR bez navázaného ligandu setrvává v cytoplazmě v komplexu s proteiny HSP90, XAP2. Po navázání ligandu (B[a]P) je AhR komplex translokován do jádra, kde jsou HSP90 a XAP2 nahrazeny proteinem ARNT a dochází k vytvoření AhR-ARNT heterodimeru. Tento heterodimer je schopný vazby na DRE. Oba proteiny komplexu jsou schopné vázat koaktivátory, což vede k transkripci širokého spektra genů. Mezi cílové geny patří také CYP1A1, který metabolizuje a bioaktivuje mnoho pro-karcinogenů. Upraveno podle: (Murray *et al.*, 2014)

4.2 Bioaktivace a genotoxicita PAU

Mechanismus bioaktivace PAU byl popsán v kapitole 2.1.1. Aktivitou CYP, AKR a dalších enzymů vznikají z PAU elektrofilní sloučeniny, které snadno reagují s DNA, vytvářejí kovalentní DNA adukty a způsobují poruchy replikace a dvouřetězcové zlomy.

Pojem genotoxicita znamená potenciál dané látky způsobit poškození DNA. Vzhledem ke spojitosti mezi poškozením DNA a rozvojem nádorových onemocnění, bývá často zaměňována s karcinogenitou. Karcinogenitou dané látky rozumíme schopnost indukovat vznik

nádorů po dlouhodobé expozici. Rozlišujeme dvě základní mechanisticky odlišné skupiny karcinogenů (Bolt a Degen 2004). Jsou to genotoxické a ne-genotoxické karcinogeny.

V případě genotoxických karcinogenů je za riziko považováno vystavení se byť jen malým dávkám genotoxinů, protože i jediná mutace může teoreticky dát vznik nádoru (Ellinger-Ziegelbauer *et al.*, 2009). Naproti tomu ne-genotoxické karcinogeny navozují karcinogenezi prostřednictvím mechanismů založených např. na ovlivnění proliferace, regenerativních procesů, inhibice apoptózy, vyvolání imunosuprese apod., které nejsou spojeny s přímým poškozením DNA (Williams 2001).

4.2.1 Tvorba DNA aduktů

Hlavním mechanismem genotoxického účinku reaktivních metabolitů PAH, je tvorba DNA aduktů. Vysoce reaktivní produkt metabolické aktivace B[a]P - BPDE je hydrolyzován nebo konjugován s GSH a následně vyloučen (Baird *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2004). Všechny molekuly, které uniknou tomuto detoxikačnímu mechanismu, mohou vstoupit do jádra a vytvářet adukty s purinovými bázemi (Xue a Warshawsky 2005). Jsou to především BPDE-N(2)-deoxyguanosin a v menší míře BPDE-N(2)-deoxyadenosin.

Jiná dráha aktivace PAU je zprostředkována AKR a na jejím konci stojí B[a]P-7,8-dion, který má rovněž potenciál vytvářet DNA adukty (Balu *et al.*, 2004; McCoull *et al.*, 1999; Shou *et al.*, 1993). Kromě toho ještě v přítomnosti buněčných redukčních ekvivalentů produkuje ROS, které také mohou způsobit poškození DNA oxidativním stresem (Park *et al.*, 2005).

Existuje množství testů, které jsou široce využívány k přímému studiu genotoxických efektů PAU. Patří sem například kometový test (comet assay), který umožňuje vizualizaci jednořetězcových či dvouřetězcových zlomů, nebo v modifikované verzi i oxidativního poškození DNA (Collins 2004). Stablnější DNA adukty mohou být kvantifikovány pomocí ³²P-postlabelingu a chromatografických metod, tenkovrstevné chromatografie nebo HPLC-MS/MS (Tarantini *et al.*, 2009).

4.2.2 Poruchy replikace a dvouřetězcové zlomy DNA

Dvouřetězcové zlomy (DSB, z angl. double strand breaks) představují nejzávažnější typ poškození molekuly DNA (Helleday *et al.*, 2007; Jackson 2002). Tyto zlomy se vyskytují, když jsou dvě komplementární vlákna simultánně přerušena v těsné blízkosti, čímž dojde k fyzickému oddělení dvou fragmentů molekuly (Helleday *et al.*, 2007). Příčinou DSB mohou být poruchy replikace DNA v místech DNA aduktů, nebo oxidativní poškození molekuly

prostřednictvím ROS. DSB jsou opravovány homologní rekombinací (HR), nebo nehomologním spojováním konců (NHEJ, z angl. non-homologous end joining) (Tung *et al.*, 2014). HR využívá k nápravě sesterskou chromatidu homologního chromosomu. Pokud sekvence použitá k opravě není plně homologní, může to přispět k dalšímu poškození DNA. V případě NHEJ je DNA v místě DSB upravována, aby konce mohly být spojeny (Tung *et al.*, 2014). Delece a inserce genů jsou tak během NHEJ mnohem častější. Při obou procesech oprav dochází k chybám, nesprávné opravy DNA jsou tak potenciálním mechanismem mutageneze.

Přítomnost DNA aduktů nejen zvyšuje riziko DSB, ale je také problémem během replikace molekuly. Pouze pro určitý typ polymeráz z rodiny Y nepředstavují velké adukty překážku v replikačním procesu (Rechkoblit *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002). Většina přesných DNA polymeráz nedokáže BPED-dGuo adukty překonat (Hruszkewycz *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 2007). Pokud tedy nejsou adukty opraveny některým z mechanismů, mohou přerušit postup replikační vidlice. Následně se uplatňují mechanismy translézní syntézy, nebo HR (Wu a Hickson 2006). Oba tyto záchranné mechanismy svojí nepřesností generují mutace a chromosomální aberace (Thompson a Schild 2001).

5 Produkty střevní bakteriální mikroflory

Lidská populace se změnou životního stylu odklonila od tradiční diety bohaté na vlákninu směrem ke zpracované potravě, což s sebou přineslo výrazný nárůst v incidenci kolorektálního karcinomu. Existují dva hlavní teoretické modely, které vysvětlují protektivní efekt vlákniny (Bultman 2014). Prvním z nich je schopnost vlákniny vázat na sebe nestrávený obsah střev a tím snižovat dobu vystavení střevního epitelu potenciálním karcinogenům. Druhá teorie bere v úvahu fakt, že vláknina je hlavním substrátem pro produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem, které jsou využívány kolonovými epiteliálními buňkami jako zdroj energie (Bultman 2014). Tyto kyseliny mají vliv na proliferaci buněk a je jim přičítána většina protektivních efektů.

5.1 Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA)

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem SCFA (z angl. short chain fatty acids) jsou produkty bakteriálního metabolismu střevní mikroflóry v tlustém střevě člověka a zvířat (Andriamihaja *et al.*, 2009). Substrát pro jejich produkci představuje již zmíněná vláknina, která je trávicím ústrojím člověka nestravitelná, a některé aminokyseliny, které nejsou vstřebány v tenkém střevě (Blachier *et al.*, 2007). Hlavní SCFA přítomné v lumen tlustého střeva jsou

acetát, propionát a butyrát (Hamer *et al.*, 2008). Největší pozornost je věnována butyrátu, protože představuje hlavní zdroj energie pro epitelální buňky kolonu.

5.1.1 Butyrát

Butyrát je produkován především grampozitivními bakteriemi v tlustém střevě. Řetězec butyrátu se skládá pouze ze tří atomů uhlíku a zbytku karboxylové kyseliny. Řada studií prokázala schopnost butyrátu zastavit proliferaci nádorových buněk tlustého střeva procházejících mitózou a stimulovat apoptózu (Fung *et al.*, 2012; Lupton 2004). Butyrát je nejefektivnější ze všech mastných kyselin produkováných v kolonu v zastavení proliferace buněk adenokarcinomu (Hinnebusch *et al.*, 2002; Leschelle *et al.*, 2000).

Protože je butyrát preferovaný zdroj energie pro kolonocyty, je oxidován v mitochondriích a pouze relativně malé množství se akumuluje v jádře (Donohoe *et al.*, 2012; Donohoe *et al.*, 2011). Naproti tomu buňky karcinomu využívají jako zdroj energie hlavně glukózu. Jejich spotřeba glukózy se zvýší více než 10-ti násobně a k produkci energie začnou využívat hlavně aerobní glykolýzu (Bultman 2014). Díky této změně metabolismu, známé jako Warburgův efekt, není butyrát oxidován a ve větší míře se akumuluje v jádře, kde působí jako účinný inhibitor histon deacetyláz (HDAC) a moduluje tak genovou expresi (Donohoe *et al.*, 2012).

5.1.2 Mechanismy účinku butyrátu

Jedním z mechanismů, kterým butyrát ovlivňuje proliferaci buněk je inhibice HDAC. Byl dokonce prvním objeveným inhibitorem HDAC (Davie 2003). Inhibitory HDAC lze považovat za „globální transkripční faktory“, protože zvyšují acetylaci histonů, která vede k rozvolnění struktury nukleozómu a zpřístupnění genových sekvencí transkripčnímu aparátu (Bultman 2014). Butyrát indukuje acetylaci histonů v promotorech mnoha genů. Některé z nich (např. inhibitor cyklin dependentních kináz protein p21 – *CDKN1A*, proapoptotické geny *BAX* a *FAS*) přispívají ke změnám v buněčném cyklu a apoptóze a jejich prostřednictvím butyrát zastavuje proliferaci buněk (Fung *et al.*, 2012; Hamer *et al.*, 2008; Sengupta *et al.*, 2006). Může také navodit diferenciaci buněk regulací genů pro muciny. Lze jej tedy považovat za „nádorově supresorový metabolit“.

Vedle genů zodpovědných za řízení buněčného cyklu a apoptózy, může ovlivňovat také transkripci genů pro některé cytokiny, včetně genů pro komponenty signálních drah IFN- γ , TNF- α a NF- κ B zapojených do procesu zánětu (Fung *et al.*, 2012; Hamer *et al.*, 2008; Sengupta *et al.*, 2006). Má tedy potenciálně i protizánětlivé účinky.

Na základě předchozích studií a výsledků naší laboratoře je patrné, že butyrát zvyšuje AhR-dependentní indukci enzymu CYP1A1 prostřednictvím inhibice HDAC. Jak je to v případě ostatních XME však dosud není známo. V této práci jsme se proto věnovali objasnění změn exprese vybraných XME v buněčných modelech odvozených z epitelu kolonu po ovlivnění butyrátem a B[a]P.

Cíle diplomové práce

Hlavním cílem diplomové práce bylo zjistit, jak ovlivňuje B[a]P a butyrát expresi vybraných XME v buněčných modelech střevních epitelálních buněk *in vitro*. Hlavním předmětem zájmu pak bylo ověřit, jestli iHDAC aktivita butyrátu umocňuje toxické efekty PAU, prostřednictvím zvýšené exprese bioaktivačních enzymů. Jako primární buněčné modely pro tuto studii byly zvoleny buněčné linie odvozené od buněk reprezentujících různé fáze neoplastické transformace střevního epitelu (linie HCT-116, HT-29 a Caco-2).

Vlastní cíle práce byly následující:

1. Vytvořit seznam XME potenciálně zapojených do metabolismu karcinogenů v buňkách kolonu (zejména těch, které jsou potenciálně regulovány AhR) a vybrat vhodné kandidáty k další analýze.
2. Stanovit míru inducibility vybraných XME pomocí analýzy PCR arrays v buněčné linii HCT-116 po ovlivnění buněk B[a]P a butyrátem.
3. Na základě výsledků PCR arrays vybrat významně ovlivněné geny a ověřit změny v jejich expresi pomocí jednokrokové real-time RT-PCR analýzy nejprve na linii HCT-116 a poté na dalších buněčných modelech odvozených od nádorů kolonu (HT-29, Caco-2), opět po ovlivnění butyrátem a B[a]P.

6 Materiál a metody

6.1 Materiál

Studie byla prováděna pomocí *in vitro* experimentů s využitím lidských buněčných linií odvozených z různých fází neoplastické transformace epiteliálních buněk tlustého střeva a konečníku. K přípravě vzorků byly použity buněčné linie HCT-116, HT-29 a Caco-2, které byly po výsevu ovlivňovány studovanými látkami.

6.1.1 Buněčné linie HCT-116, HT-29 a Caco-2

HCT-116 je buněčná linie odvozená z nádorové tkáně tlustého střeva ve fázi karcinomu. HT-29 je linie buněk odvozená z nádoru tlustého střeva ve fázi adenokarcinomu. Obě tyto linie byly zakoupeny od americké firmy ATCC (American Type Culture Collection; USA). Jejich kultivace probíhala v plastových lahvích o povrchu 75 cm² (TPP, Švýcarsko), při teplotě 37 °C, vlhkosti vzduchu 95 % a atmosféře 5% CO₂. Ke kultivaci buněk bylo použito médium McCoy's (k.č. 36600, Gibco, Invitrogen Corporation, USA) s přidavkem antibiotik penicilinu a streptomycinu a 10% inaktivovaného FBS (fetální bovinní sérum).

Caco-2 je buněčná linie odvozena z adenokarcinomu tlustého střeva. Tyto střevní buňky se široce uplatňovaly ve výzkumu během posledních dvaceti let a slouží především jako model střevní bariéry pro toxikologické a xenobiochemické studie (Sambuy *et al.*, 2005). Tato buněčná linie prochází během kultivace procesem spontánní diferenciaci, který vede k formaci vrstvy buněk vykazujících některé morfologické a funkční charakteristiky zralých enterocytů. Kultivace probíhala rovněž v plastových lahvích o povrchu 75 cm² (TPP, Švýcarsko), při teplotě 37 °C, vlhkosti vzduchu 95 % a atmosféře 5% CO₂. Ke kultivaci bylo použito médium DMEM (21885, Gibco, Invitrogen Corporation, USA) s přidavkem glukózy (1g), pyruvátu a glutamatu. Pro kultivaci buněk bylo do média přidáno 20% inaktivní FBS a pro diferenciaci pouze 10%.

Buňky byly 2x týdně pasážovány s pravidelnou výměnou média. V případě Caco-2 linie probíhala pasáž 3x týdně a buňky byly ponechány růstu a diferenciaci po dobu 21 dní. Během pasáže byly nejprve opláchnuty EDTA/PBS (roztok kyseliny etylendiamintetraoctové a fosfátového pufru) a přisedlé buňky následně uvolněny z podkladu pomocí trypsinu (0,05% trypsin / 0,02% EDTA; Biotech, GmbH). Počty buněk byly stanoveny pomocí přístroje CASY Cell Counter (Invitrogen Corporation, USA), (umožňuje zjistit počet buněk a jejich viabilitu) a následně vysety v požadované hustotě při založení experimentu, případně vráceny zpět do kultivační lahve.

6.2 Použité chemikálie

Dimethylsulfoxid (DMSO) - rozpouštědlo používané k rozpuštění B[a]P. Zakoupeno od firmy (Sigma-Aldrich, ČR). Při ovlivňování během experimentu sloužil jako negativní kontrola.

Benzo[a]pyren (B[a]P) - rozpuštěný v DMSO. Zakoupený od firmy Ehrenstorfer (Augsburg, Německo). Při experimentech byl používán v koncentraci 10 μ M.

Butyrát sodný (NaBt) – sůl kyseliny máselné. Zakoupený od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Při experimentech byl používán v koncentraci 0,5mM a 3mM.

Při ovlivňování buněk, byly chemikálie vždy aplikovány do čerstvého média. V případě kombinované aplikace dvou látek, byly obě přidávány současně. Ovlivňování probíhalo po dobu 24 h.

6.3 Metody

6.3.1 Experimentální design

Buňky linie HCT-116, HT-29 i Caco-2 byly při založení experimentu vysety v koncentraci 4 x 10⁴ buněk/cm² na kultivační misky s povrchem 9,2 cm² a byly kultivovány 48h při teplotě 37°C, vlhkosti vzduchu 95 % a atmosféře 5% CO₂. Po 48h bylo vyměněno kultivační médium a na každou misku byly přidány studované látky v požadovaných koncentracích. DMSO byl použit jako negativní kontrola, butyrát a B[a]P byly aplikovány samostatně i v kombinaci v koncentracích: B[a]P 10 μ M a NaBt 0,5mM a 3mM. Po 24 h inkubace s přidanými látkami byly buňky sesbírány pro izolaci mRNA a následnou analýzu pomocí qRT-PCR. Linie Caco-2 byla ovlivňována nejprve v nediferencovaném stádiu a po 21 dnech kultivace také v diferencovaném stádiu. Všechny experimenty byly prováděny nejméně ve třech nezávislých opakováních na různých pasážích buněk.

6.3.2 Izolace RNA a qRT-PCR

K izolaci totální RNA, byl použit izolační kit NucleoSpin[®] RNA II Purification Kit (Macherey-Nagel, Germany). Buňky byly 24 h po přidání studovaných látek 2x opláchnuty PBS a po přidání RA1 lyzačního pufru zlyzovány. Následně byl buněčný lyzát přečištěn centrifugací (11000 g/ 1 min.) pomocí kolony a v dalším kroku precipitován ethanolem a zachycen na povrchu membrány kolony. DNA ze vzorků byla odstraněna působením rDNasy. V dalším kroku byla rDNasa inaktivována a membrána několikrát promyta. V posledním kroku byla RNA uvolněna z membrány pomocí vody bez RNas.

6.3.3 PCR arrays

PCR arrays je metoda, která umožňuje provést kvantifikaci exprese více genů současně pomocí qRT-PCR. Pro tento účel byly použity RealTime Ready Custom Panels 96 od firmy Roche (Roche Applied Sciences). RealTime ready Custom Panels jsou 96-ti jamkové destičky s předem připravenými reagensy. Každá jamka obsahuje primery a próby UPL (z angl. Universal Probe Library) pro vybrané geny. qRT-PCR reakce je v tomto případě dvoukroková a je nutné nejprve přepsat mRNA do cDNA. K tomuto účelu byla použita komerční sada Transkriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche Applied Sciences). Tato sada obsahuje reverzní transkriptázu, reakční pufr, inhibitor RNáz, mix deoxyribonukleotidů a různé typy primerů a kontrolní RNA (totální RNA frakci izolovanou z imortalizované linie K562). K přepisu byly jako primery použity náhodné hexamery. Jednotlivé kroky reakce shrnuje Tabulka č. 1.

Krok	primery	podmínky	délka kroku
Příprava		připravit reakční mix v daném oběmu	
denaturace		65°C	10 min
cDNA syntéza	oligo(dT) ₁₈ / genově specifické	55°C / 50°C	30 min / 60 min
	náhodné hexamerní	25°C	10 min
		55°C / 50°C	30 min / 60 min
inaktivace		80°C	5 min

Tabulka č. 1: Podmínky a kroky reverzní transkripce.

Po přepsání do cDNA proběhla samotná PCR. Vzorky k přepisu a následné PCR byly získány z buněčné linie HCT-116 po 24h expozici. K analýze genové exprese byla vybrána paleta XME, pro které byly předem připraveny reagensy na desce firmou Roche. Tabulka č. 2 nabízí přehled vybraných XME. Měření proběhlo ve 4 opakováních a na základě výsledků byly vybrány kandidátní geny k další analýze.

Název genu	ID genu	Roche ID	Název enzymu
<i>ABCC1</i>	4363	144443	ATP-vazebna kazeta, podrodina C (CFTR/MRP), člen 1
<i>ABCG2</i>	9429	144818	ATP-vazebna kazeta, podrodina G, člen 2
<i>AHR</i>	196	102490	Aryl uhlovodíkový receptor
<i>AKR1C1</i>	1645	117462	Aldo-keto reduktasa rodina 1, člen C1
<i>AKR1C3</i>	8644	114952	Aldo-keto reduktasa rodina 1, člen C3
<i>ALDH1A1</i>	216	112320	Aldehyd dehydrogenasa 1 člen A1
<i>ALDH1A3</i>	220	146925	Aldehyd dehydrogenasa 1 člen A3
<i>ALDH3A1</i>	218	117774	Aldehyd dehydrogenasa 3 člen A1
<i>ARNT</i>	405	102546	Jaderný translokátor Ah receptoru
<i>COMT</i>	1312	112923	Katechol-O-methyltransferasa
<i>CYP1A1</i>	1543	110757	Cytochrom P450, rodina 1, podrodina A, polypeptid 1
<i>CYP1A2</i>	1544	111753	Cytochrom P450, rodina 1, podrodina A, polypeptid 2
<i>CYP1B1</i>	1545	113037	Cytochrom P450, rodina 1, podrodina B, polypeptid 1
<i>CYP2B6</i>	1555	111789	Cytochrom P450, rodina 2, podrodina B, polypeptid 6
<i>CYP2C8</i>	1558	111407	Cytochrom P450, rodina 2, podrodina C, polypeptid 8
<i>CYP2D6</i>	1565	135986	Cytochrom P450, rodina 2, podrodina D, polypeptid 6
<i>CYP2S1</i>	29785	131270	Cytochrom P450, rodina 2, podrodina S, polypeptid 1
<i>CYP3A4</i>	1576	135760	Cytochrom P450, rodina 3, podrodina A, polypeptid 4
<i>CYP3A5</i>	1577	112269	Cytochrom P450, rodina 3, podrodina A, polypeptid 5
<i>EPHX1</i>	2052	109467	Epoxid hydrolasa 1
<i>GSTA3</i>	2940	140872	Glutathion S-tranferasa alfa 3
<i>GSTA4</i>	2941	127401	Glutathion S-tranferasa alfa 4
<i>GSTK1</i>	373156	130230	Glutathion S-tranferasa kappa 1
<i>GSTM1</i>	2944	143693	Glutathion S-tranferasa mu 1
<i>GSTP1</i>	2950	145576	Glutathion S-tranferasa pi 1
<i>GSTT1</i>	2952	113004	Glutathion S-tranferasa theta 1
<i>GSTT2</i>	2953	144500	Glutathion S-tranferasa theta 2
<i>HMOX1</i>	3162	110977	Hem oxygenasa 1
<i>HSD17B10</i>	3028	115561	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenasa 10
<i>NAT1</i>	9	113205	N-acetyltransferasa 1 (arylamín N-acetyltransferasa)

Název genu	ID genu	Roche ID	Název enzymu
<i>NAT2</i>	10	111837	N-acetyltransferasa 2 (arylamin N-acetyltransferasa)
<i>NFE2L2</i>	4780	113587	Jaderný faktor erythroid 2 like 2
<i>NQO1</i>	1728		NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa 1
<i>PTGS2</i>	5743	102471	Prostaglandin-endoperoxid syntasa 2
<i>SULT1A1</i>	6817	138249	Sulfotransferasa rodina 1A člen 1
<i>SULT1A2</i>	6799	119014	Sulfotransferasa rodina 1A člen 2
<i>SULT2A1</i>	6822	117753	Sulfotransferasa rodina 2A člen 1
<i>UGT1A1</i>	54658	138404	UDP glukuronosyltransferasa 1, polypeptid A1
<i>UGT1A4</i>	54657	140612	UDP glukuronosyltransferasa 1, polypeptid A4
<i>UGT1A6</i>	54578	112191	UDP glukuronosyltransferasa 1, polypeptid A6
referenční geny			
<i>RPL13A</i>	23521	102119	Ribosomální protein L13a
<i>TBP</i>	6908	101145	TATA-box vazebný protein
<i>YWHAZ</i>	7534	102125	Tyrosin 3-monooxygenasa/tryptophan 5-monooxygenasa aktivační protein zeta

Tabulka č. 2: XME vybrané k analýze pomocí PCR arrays

6.3.4 qRT-PCR

K analýze exprese sledovaných genů, byla využita metoda jednokrokové kvantitativní polycyklické reakce s reverzní transkripcí v reálném čase (qRT-PCR) s použitím komerční sady SuperScript III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, USA). Při jednokrokové RT-PCR je DNA templát pro reakci získán reverzní transkripcí z mRNA před vlastní PCR ve stejné reakční směsi. K amplifikaci a detekci byl použit termocyklér Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Sydney, Austrálie). Reakční směs pro každý vzorek byla připravena v celkovém objemu 20 µl. K reakci byly použity primery od firmy Generi-Biotech a próby z UPL firmy Roche (s výjimkou prób pro CYP1A1, CYP1B1 dodaných firmou Generi-Biotech). Přehled sekvencí použitých primerů a prób je uveden v Tabulce č. 3. Jednotlivé kroky polycyklické reakce jsou uvedeny v Tabulce č. 4.

Název genu	ID mRNA sekvence	Sekvence primerů a prób	
CYP1A1	NM_000499.4	R	5'-TTACAAAGACACAACGCCCC-3'
		F	5'-CACCATCCCCCAGCAG-3'
		P	5'-FAM AAGTTTGAAAGGCTTTTACATCCCC-BH1-3'
CYP1B1	NM_000104.3	R	5'-TTCATTTTCGAGGCTCATTTG-3'
		F	5'-GCTTTTCTCTTCATCTCCATC-3'
		P	5'-FAM-CTACCAAGTGCATTTTCAGGGCCAAC-BH1-3'
AKR1C1	NM_001353.5	R	5'-AGAATCAATATGGCGGAAGC-3'
		F	5'-CATGCCTGTCCTGGGATTT-3'
		P	# 49 UPL
AKR1C3	NM_003739.4	R	5'-CCGGTTGAAATACGGATGAC-3'
		F	5'-CATTGGGGTGTCAAACCTTCA-3'
		P	# 27 UPL
NQO1	NM_000903.2	R	5'-TCCCTTGACAGAGTACATGG-3'
		F	5'-ATGTATGACAAAGGACCCCTCC-3'
		P	# 87 UPL
NAT1	NM_001160170.1	R	5'-TGTGGACATTTTGGAGAGCAT-3'
		F	5'-GCCCAACAGGCTTTCTACC-3'
		P	# 89 UPL
NAT2	NM_000015.2	R	5'-TAATTCCTGCCGTCATGGT-3'
		F	5'-CAAATACAGCACTGGCATGG-3'
		P	# 2 UPL
ALDH1A1	NM_000689.4	R	5'-CTGGATGCGGCTATACAACA-3'
		F	5'-TGTTAGCTGATGCCGACTTG-3'
		P	# 81 UPL
UGT1A1	NM_000463.2	R	5'-TCTCCAGAAGCATTAATGTAGGC-3'
		F	5'-CATCATGCCCAATATGGTTTTT-3'
		P	# 31 UPL
UGT1A4	NM_007120.2	R	5'-GTTGCAAGATTCGATGGTC-3'
		F	5'-ATGGCAATTGCTGATGCTTT-3'
		P	# 47 UPL

Tabulka č. 3: Sekvence použitých primerů a prób ke genům vybraných enzymů.

Krok		Délka kroku	teplota
Reverzní transkripce		15 min	50°C
Iniciace polymerázy		2 min	90°C
40 cyklů	Denaturace dsDNA	15 s	95°C
	navázání primerů	30 s	60°C
	extenze		

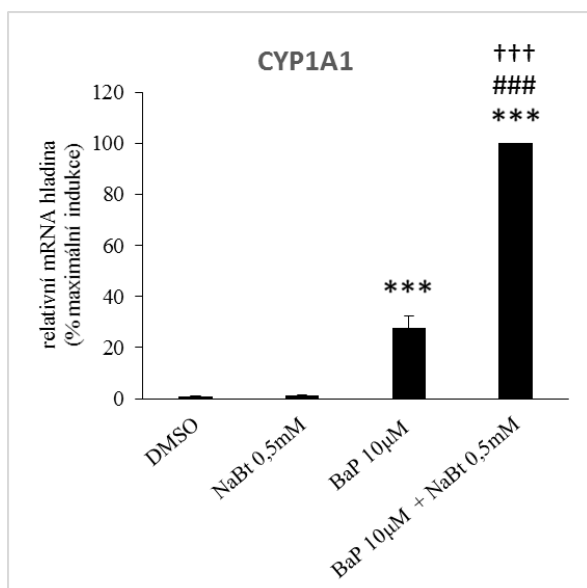
Tabulka č. 4: Podmínky a kroky PCR.

7 Výsledky

7.1 Verifikace indukce exprese enzymu CYP1A1 po ovlivnění B[a]P a NaBt v buněčné linii HCT-116

Fyziologické koncentrace butyrátu se v různých částech tlustého střeva a konečníku liší. Pro účely experimentu byly, na základě předchozích výsledků a také zkušeností z naší laboratoře, zvoleny koncentrace 0,5mM a 3mM (Donohoe et al., 2012; Hofmanová et al., 2012). Vyšší koncentrace butyrátu má však negativní efekt na počet adherentně rostoucích HCT-116 buněk a v koncentraci 3mM u nich navozuje apoptózu. Koncentrace 3mM byly proto použity až pro buňky HT-29 a Caco-2.

Prvním krokem před výběrem cílových XME pro PCR array analýzu, bylo ověření kvality vzorků pomocí detekce exprese CYP1A1 po 24h ovlivnění buněk HCT-116 B[a]P a butyrátem. Inducibilita enzymu byla stanovena na úrovni mRNA pomocí qRT-PCR. Jak je vidět v grafu č. 1, hladina mRNA enzymu CYP1A1 byla výrazně zvýšena po ovlivnění kombinací obou látek, oproti ovlivnění samotným B[a]P. Z toho je patrné, že butyrát posílil účinek B[a]P na indukci tohoto enzymu, tak jak bylo předtím popsáno v naší laboratoři (Zapletal et al., 2016). Dalším krokem a zároveň hlavní fází experimentu bylo proto zjistit, jak tyto látky ovlivňují hladiny mRNA dalších XME.



Graf č.1: Změny relativní hladiny mRNA CYP1A1 vyjádřené vzhledem k maximální indukci po 24 hodinové inkubaci s butyrátem a B[a]P v buňkách HCT-116. Jednotlivé sloupce grafu představují průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky ze tří nezávislých opakování. Symbol „***“, označuje statisticky významný rozdíl mezi kontrolou (DMSO) a ovlivněním kombinací látek ($P < 0,001$). Symbol „###“, označuje statisticky významný rozdíl mezi ovlivněním samotným butyrátem a ovlivněním kombinací látek ($P < 0,001$). Symbol „+++“, označuje statisticky významný rozdíl mezi ovlivněním samotným B[a]P a ovlivněním kombinací látek ($P < 0,001$). Všechny hodnoty byly porovnávány metodou jednocestné ANOVY a Tukeyho testu.

ovlivněním kombinací látek ($P < 0,001$). Symbol „+++“, označuje statisticky významný rozdíl mezi ovlivněním samotným B[a]P a ovlivněním kombinací látek ($P < 0,001$). Všechny hodnoty byly porovnávány metodou jednocestné ANOVY a Tukeyho testu.

7.2 Detekce mRNA XME pomocí PCR arrays analýzy

Následovalo vybrání palety XME pro analýzu pomocí PCR arrays. Enzymy byly vybrány na základě dostupné literatury, on-line databází a poznatků o expresi XME ve střevní tkáni. Jejich kompletní seznam je uveden v tabulce č. 4 v části věnované Metodice práce. Na základě tohoto seznamu byly objednány PCR array desky od firmy Roche s předem připravenými reagensii pro expresní analýzu. Měření bylo provedeno ve čtyřech nezávislých opakováních. K analýze byly použity vzorky celkové RNA izolované z buněk HCT-116 po ovlivnění B[a]P a butyrátem, u nichž byla předem ověřena standardní indukce CYP1A1.

geny bez výrazné změny							
název genu	ovlivnění	Průměr	SD	název genu	ovlivnění	Průměr	SD
ABCC1	DMSO	1,00	0,00	GSTP1	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	1,27	0,05		NaBt 0.5 mM	0,86	0,05
	BaP 10 µM	1,04	0,21		BaP 10 µM	1,19	0,23
	BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	1,17	0,27		BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	1,09	0,52
ARNT	DMSO	1,00	0,00	HMOX1	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	1,35	0,32		NaBt 0.5 mM	1,00	0,11
	BaP 10 µM	1,21	0,17		BaP 10 µM	1,20	0,21
	BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	1,22	0,17		BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	1,45	0,20
CYP3A4	DMSO	1,00	0,00	HSD17B10	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	3,26	4,06		NaBt 0.5 mM	1,16	0,25
	BaP 10 µM	3,39	4,40		BaP 10 µM	0,99	0,14
	BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	3,46	3,95		BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	0,89	0,18
GCTT1	pod detekčním limitem			SULT1A2	DMSO	1,00	0,00
GSTK1	DMSO	1,00	0,00		NaBt 0.5 mM	1,17	0,15
	NaBt 0.5 mM	1,24	0,21		BaP 10 µM	1,19	0,10
	BaP 10 µM	1,20	0,08		BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	1,21	0,14
	BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	1,27	0,12	SULT2A1	pod detekčním limitem		
GSTM1	pod detekčním limitem						

geny ovlivněné butyrátem							
název genu	ovlivnění	Průměr	SD	název genu	ovlivnění	Průměr	SD
ABCG2	DMSO	1,00	0,00	GSTA3	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	2,81	1,06		NaBt 0.5 mM	60,82	79,31
	BaP 10 µM	1,60	0,46		BaP 10 µM	3,69	3,44
	BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	3,61	0,93		BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	44,90	46,92
ALDH1A1	DMSO	1,00	0,00	GSTA4	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	42,76	44,77		NaBt 0.5 mM	9,14	9,15
	BaP 10 µM	1,21	0,93		BaP 10 µM	1,76	1,49
	BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	43,26	37,72		BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	9,43	8,20
CYP2B6	DMSO	1,00	0,00	GSTT2	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	3,63	1,64		NaBt 0.5 mM	1,70	0,30
	BaP 10 µM	0,80	0,53		BaP 10 µM	1,29	0,43
	BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	4,79	3,48		BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	1,94	0,28

geny ovlivněné butyrátem							
název genu	ovlivnění	Průměr	SD	název genu	ovlivnění	Průměr	SD
CYP2C8	DMSO	1,00	0,00	PTGS2	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	3,29	1,02		NaBt 0.5 mM	3,85	1,74
	BaP 10 µM	1,43	0,32		BaP 10 µM	1,36	0,59
	BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	3,05	0,63		BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	4,69	1,53
CYP2D6	DMSO	1,00	0,00	SULT1A1	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	1,98	1,04		NaBt 0.5 mM	4,58	6,25
	BaP 10 µM	1,07	0,13		BaP 10 µM	2,31	1,76
	BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	1,55	0,37		BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	2,99	2,78
CYP2S1	DMSO	1,00	0,00	UGT1A6	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	1,37	0,05		NaBt 0.5 mM	5,22	0,65
	BaP 10 µM	1,08	0,09		BaP 10 µM	1,66	0,88
	BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	1,45	0,42		BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	6,34	0,42
CYP3A5	DMSO	1,00	0,00				
	NaBt 0.5 mM	4,01	2,86				
	BaP 10 µM	1,99	1,87				
	BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	5,45	4,30				

geny ovlivněné B[a]P							
název genu	ovlivnění	Průměr	SD	název genu	ovlivnění	Průměr	SD
COMT	DMSO	1,00	0,00	ALDH3A1	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	0,70	0,11		NaBt 0.5 mM	1,31	1,03
	BaP 10 µM	1,20	0,24		BaP 10 µM	2,06	0,29
	BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	0,70	0,13		BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	2,04	0,41
EPHX1	DMSO	1,00	0,00	NFE2L2	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	0,45	0,28		NaBt 0.5 mM	0,63	0,12
	BaP 10 µM	1,77	0,21		BaP 10 µM	1,41	0,27
	BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	0,82	0,54		BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	0,95	0,06
ALDH1A3	DMSO	1,00	0,00	UGT1A4	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	1,04	0,65		NaBt 0.5 mM	1,30	0,68
	BaP 10 µM	4,48	1,79		BaP 10 µM	5,75	5,59
	BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	3,41	1,08		BaP 10 µM + NaBt 0.5 mM	5,06	2,89

Geny ovlivněné kombinací							
název genu	ovlivnění	Průměr	SD	název genu	ovlivnění	Průměr	SD
AHR	DMSO	1,00	0,00	CYP1A1	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	1,64	0,49		NaBt 0.5 mM	1,19	0,08
	BaP 10 μ M	1,33	0,56		BaP 10 μ M	20,16	1,76
	BaP 10 μ M + NaBt 0.5 mM	2,00	0,55		BaP 10 μ M + NaBt 0.5 mM	81,62	22,18
AKR1C1	DMSO	1,00	0,00	CYP1A2	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	1,40	0,12		NaBt 0.5 mM	3,92	0,47
	BaP 10 μ M	1,67	0,53		BaP 10 μ M	17,94	5,48
	BaP 10 μ M + NaBt 0.5 mM	2,31	1,01		BaP 10 μ M + NaBt 0.5 mM	50,21	10,10
AKR1C3	DMSO	1,00	0,00	CYP1B1	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	13,68	3,91		NaBt 0.5 mM	0,88	0,37
	BaP 10 μ M	2,52	1,84		BaP 10 μ M	8,40	1,25
	BaP 10 μ M + NaBt 0.5 mM	29,27	15,02		BaP 10 μ M + NaBt 0.5 mM	23,72	3,71

Geny ovlivněné kombinací							
název genu	ovlivnění	Průměr	SD	název genu	ovlivnění	Průměr	SD
NAT1	DMSO	1,00	0,00	NQO1	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	2,09	0,35		NaBt 0.5 mM	1,09	0,60
	BaP 10 μ M	1,15	0,23		BaP 10 μ M	2,40	1,12
	BaP 10 μ M + NaBt 0.5 mM	2,60	0,05		BaP 10 μ M + NaBt 0.5 mM	4,01	1,53
NAT2	DMSO	1,00	0,00	UGT1A1	DMSO	1,00	0,00
	NaBt 0.5 mM	11,86	8,40		NaBt 0.5 mM	12,81	10,31
	BaP 10 μ M	1,72	0,97		BaP 10 μ M	6,85	2,53
	BaP 10 μ M + NaBt 0.5 mM	14,59	7,64		BaP 10 μ M + NaBt 0.5 mM	22,86	13,09

Tabulka č. 5: Tabulka shrnující výsledky PCR arrays analýzy rozdělené na základě různé intenzity indukce mRNA po ovlivnění studovanými látkami.

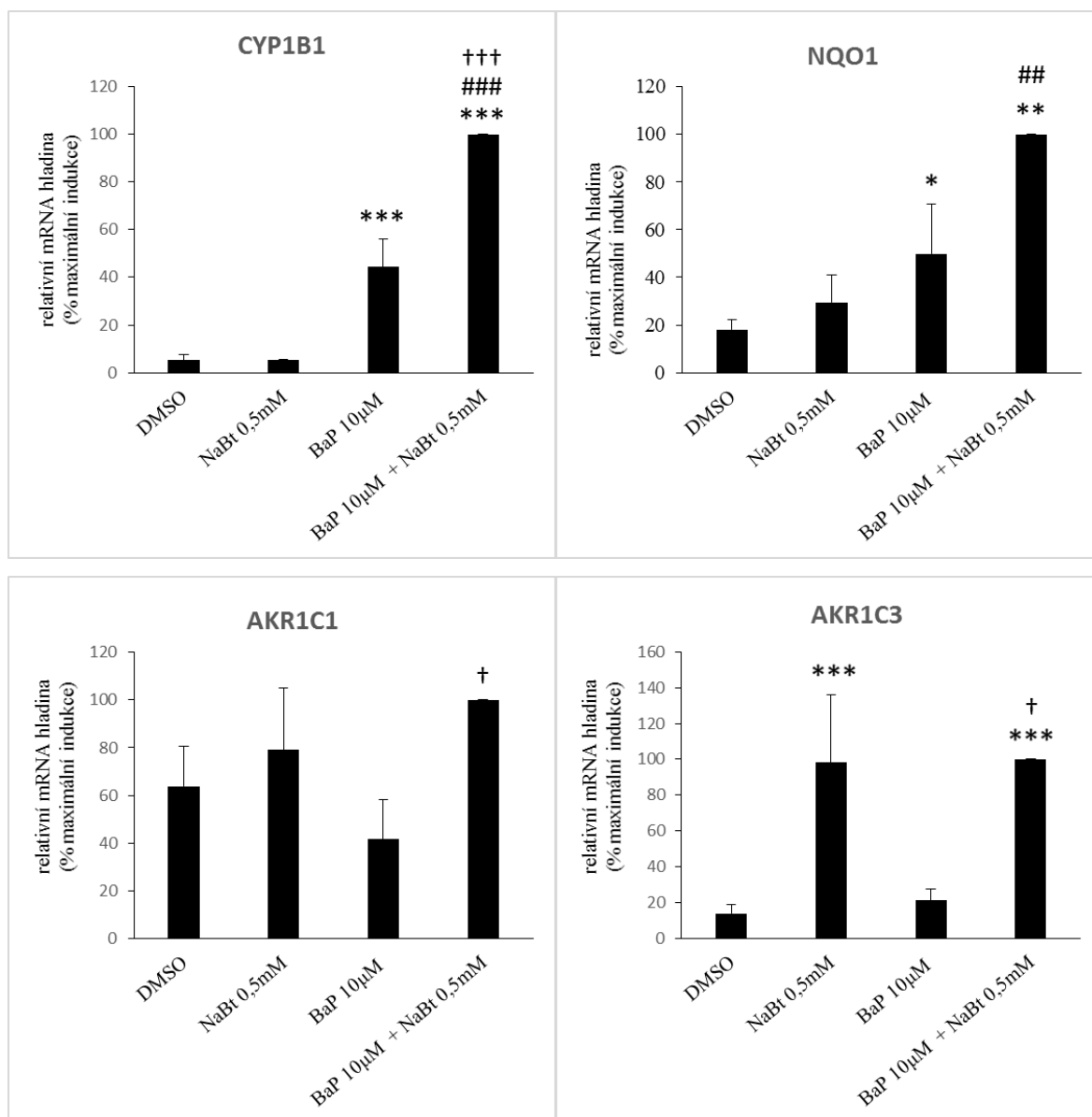
Hodnoty představují průměr hladin mRNA vybraných enzymů vyjádřený relativně oproti kontrole (DMSO). Sloupec „SD“ ukazuje hodnoty směrodatných odchylek.

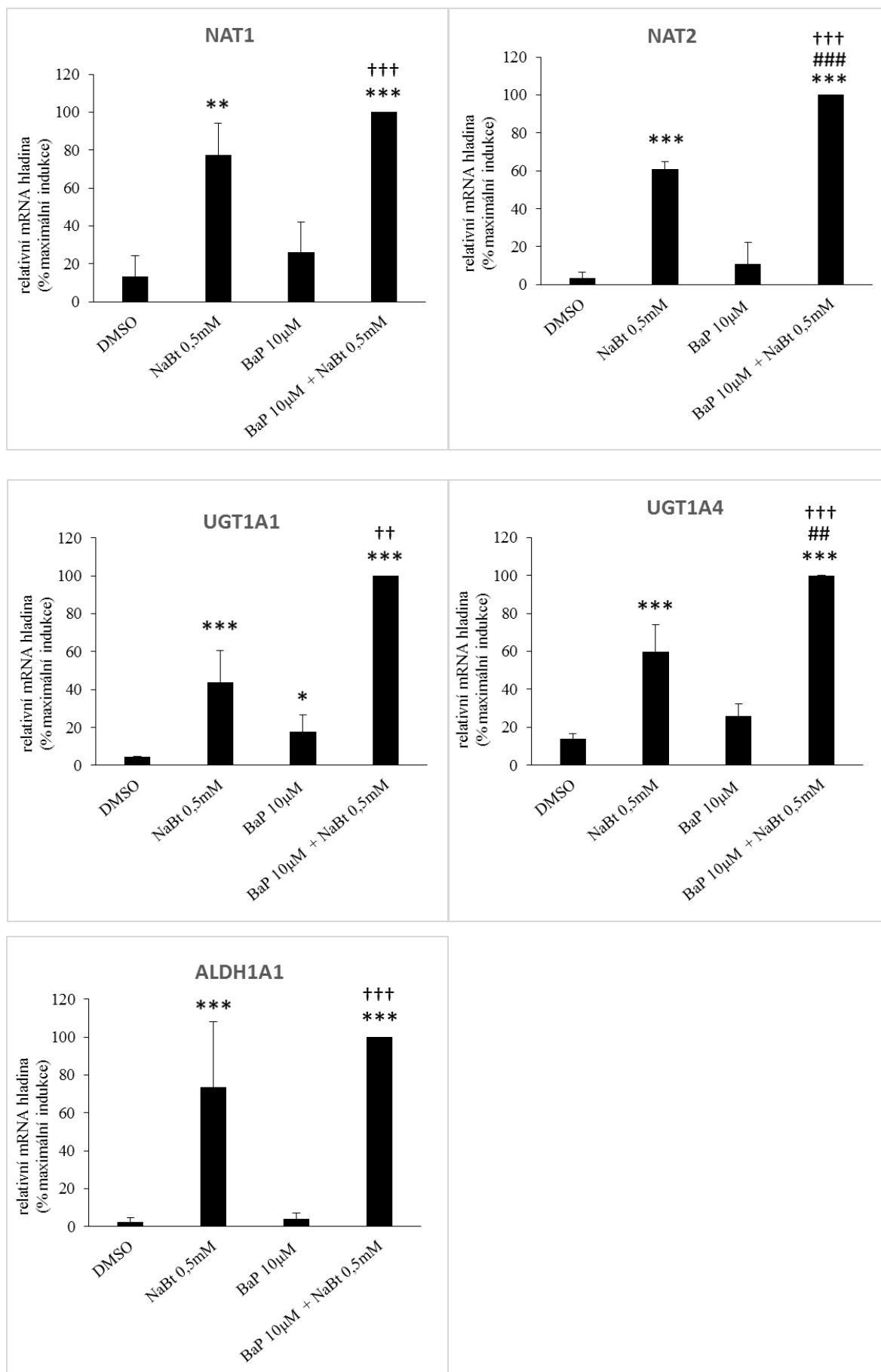
Na základě těchto výsledků jsme zúžili seznam studovaných enzymů zejména na ty, u nichž bylo pozorováno významné ovlivnění butyrátem, nebo interaktivní účinky kombinace butyrátu a B[a]P (viz tabulka č. 5). Do dalších fází práce byly proto vybrány tyto enzymy CYP1A1, CYP1B1, AKR1C1, AKR1C3, NAT1, NAT2, NQO1, ALDH1A1, UGT1A1 a UGT1A4.

7.3 Stanovení exprese vybraných XME u buněčné linie HCT-116 pomocí qRT-PCR

Vzhledem k tomu, že bylo nutné otestovat primery a próby pro XME vybrané pro další fázi experimentů na dalších buněčných liniích, byla indukce těchto enzymů nejprve ověřena na linii HCT-116. Analýza byla provedena ve třech nezávislých opakováních a z výsledků byly vypočítány průměrné hodnoty. Výsledky jsou shrnuty v Obrázku č. 6.

Indukce enzymů CYP1B1 a NQO1 byla zaznamenána po ovlivnění samotným B[a]P a posílena spolupůsobením B[a]P a butyrátu. V obou těchto případech měl butyrát stejný posilující účinek jako v případě enzymu CYP1A1. Enzymy AKR1C1 a AKR1C3 byly indukovány převážně butyrátem, s několikanásobně vyšším účinkem v případě AKR1C3. NAT1, NAT2, UGT1A1 a UGT1A4 byly všechny indukovány působením samotného butyrátu a indukce byla rovněž posílena spolupůsobením látek. V případě ALDH1A1 byla indukce markantní po ovlivnění butyrátem i kombinací látek, ale samotný B[a]P neměl na indukci enzymu téměř žádný vliv.





Obrázek č. 6: Změny relativních hladin mRNA vybraných XME vzhledem k maximální indukci po 24 hodinové inkubaci s butyrátem a B[a]P v buňkách HCT-116.

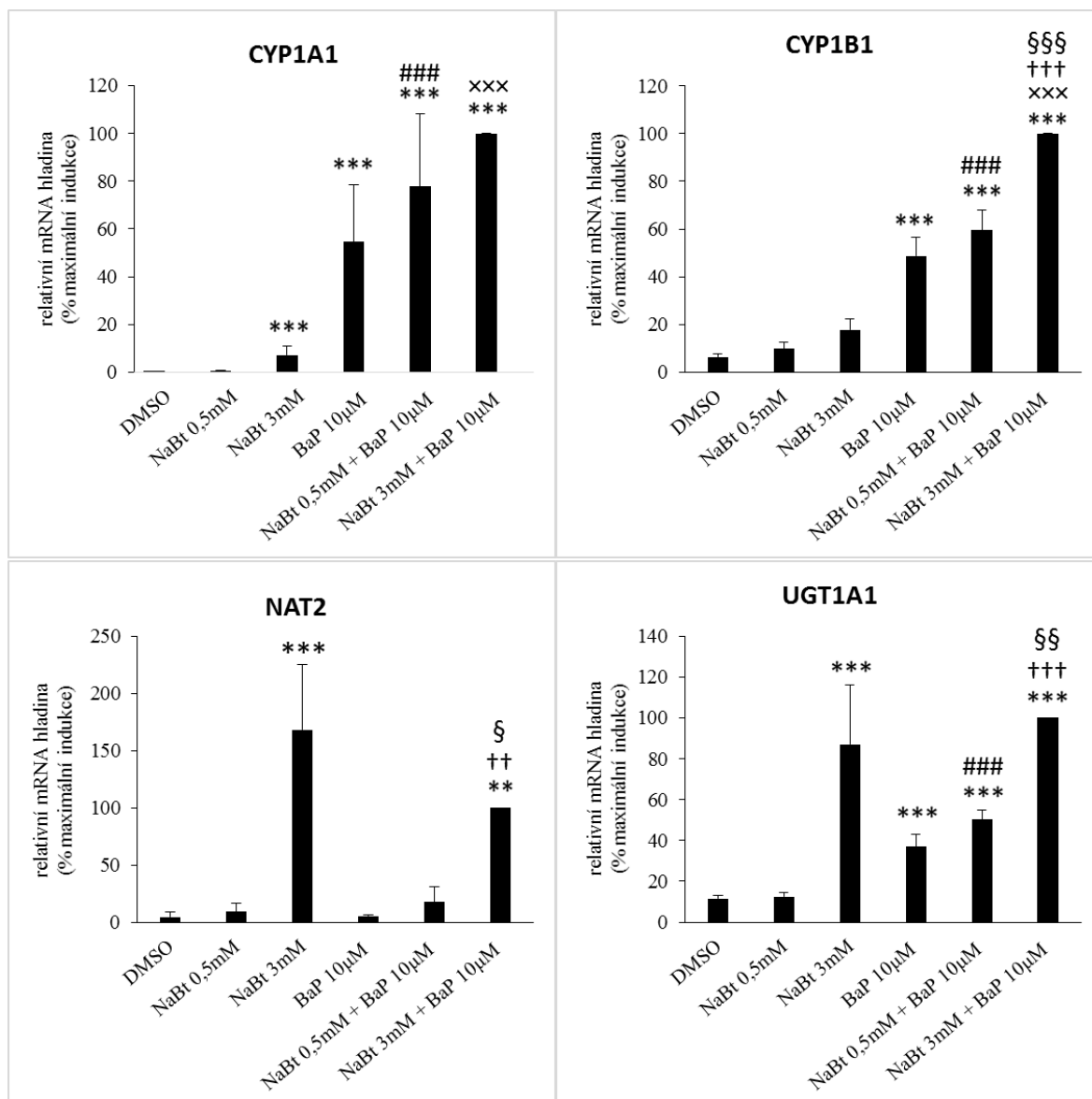
Jednotlivé sloupce grafu představují průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky ze tří nezávislých opakování. Symboly „*“, „**“, „***“, označují statisticky významný rozdíl mezi kontrolou (DMSO) a ovlivněním kombinací látek ($P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$). Symboly „##“, „###“ označují statisticky významný rozdíl mezi ovlivněním samotným butyrátem a ovlivněním kombinací látek ($P < 0,01$, $P < 0,001$). Symboly „†“, „††“, „†††“, označují statisticky významný rozdíl mezi ovlivněním samotným B[a]P a ovlivněním kombinací látek ($P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$). Všechny hodnoty byly porovnávány metodou jednocestné ANOVY a Tukeyho testu.

7.4 Účinky butyrátu a B[a]P na indukci XME v buněčné linii HT-29

Buněčná linie HT-29 představuje model nádorových epiteliálních buněk kolonu ve fázi adenokarcinomu. Na rozdíl od linie HCT-116 jsou buňky HT-29 méně citlivé vůči indukci apoptózy butyrátem a jsou schopné po jeho aplikaci diferencovat. Výhodou této linie je také to, že expresní profil XME se u této linie blíží normálním buňkám kolonového epitelu (Bourguine *et al.*, 2012). Naším dalším cílem bylo proto ověřit účinky butyrátu v kombinaci s B[a]P na této linii.

Buňky byly ovlivněny 0,5mM butyrátem, 10μM B[a]P a také 3mM butyrátem po dobu 24 h a byly z nich připraveny vzorky celkové mRNA pro qRT-PCR analýzu. Výsledky byly opět zprůměrovány a jsou shrnuty v Obrázku č. 7. Úspěšně se podařilo detekovat změny pouze u čtyř ze sledovaných XME enzymů – CYP1A1, CYP1B1, NAT2 a UGT1A1.

Indukce CYP1A1 a CYP1B1 byla i v případě této linie navozena působením B[a]P a posílena účinkem butyrátu. Indukce byla zesílena vyšší koncentrací butyrátu. V případě NAT2 enzymu byla indukce navozena účinkem samotného butyrátu a zeslabena při společném působení studovaných látek. Po aplikaci samotného B[a]P nebyl pozorován žádný efekt na indukci enzymu. Enzym UGT1A1 byl rovněž silně indukován butyrátem, ale v případě spolupůsobení B[a]P a butyrátu nedošlo k oslabení indukce jako v případě NAT2, ale k lehkému posílení. Rovněž samotný B[a]P v menší míře indukoval tento enzym.



Obrázek č. 7: Změny relativních hladin mRNA vybraných genů pro XME vzhledem k maximální indukci po 24 hodinové inkubaci s butyrátem v koncentracích (0,5mM a 3mM), B[a]P a kombinací obou látek v buňkách HT-29.

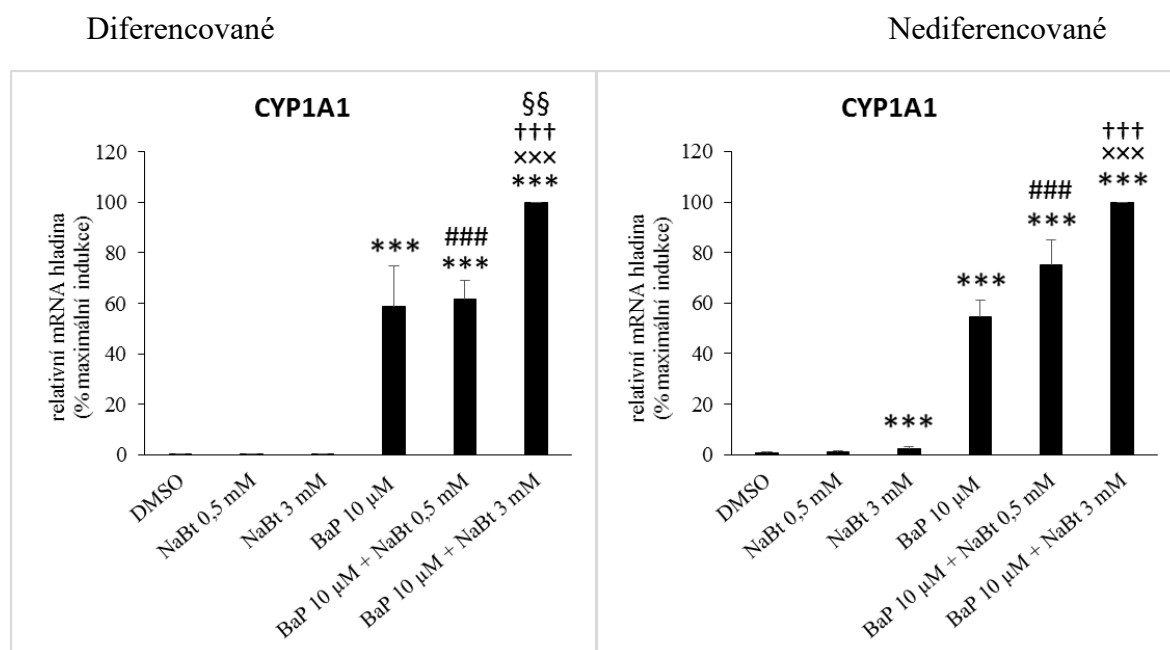
Jednotlivé sloupce grafu představují průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky ze tří nezávislých opakování. Symboly „**“, „***“, označují statisticky významný rozdíl mezi kontrolou (DMSO) a ovlivněním kombinací látek ($P < 0,01$, $P < 0,001$). Symbol „###“ označuje statisticky významný rozdíl mezi ovlivněním samotným butyrátem v koncentraci (0,5mM) a ovlivněním kombinací látek ($P < 0,001$). Symbol „×××“, označuje statisticky významný rozdíl mezi ovlivněním samotným butyrátem v koncentraci (3mM) a ovlivněním kombinací látek ($P < 0,001$). Symboly „††“, „†††“, označují statisticky významný rozdíl mezi ovlivněním samotným B[a]P a ovlivněním kombinací látek ($P < 0,01$, $P < 0,001$). Symbol

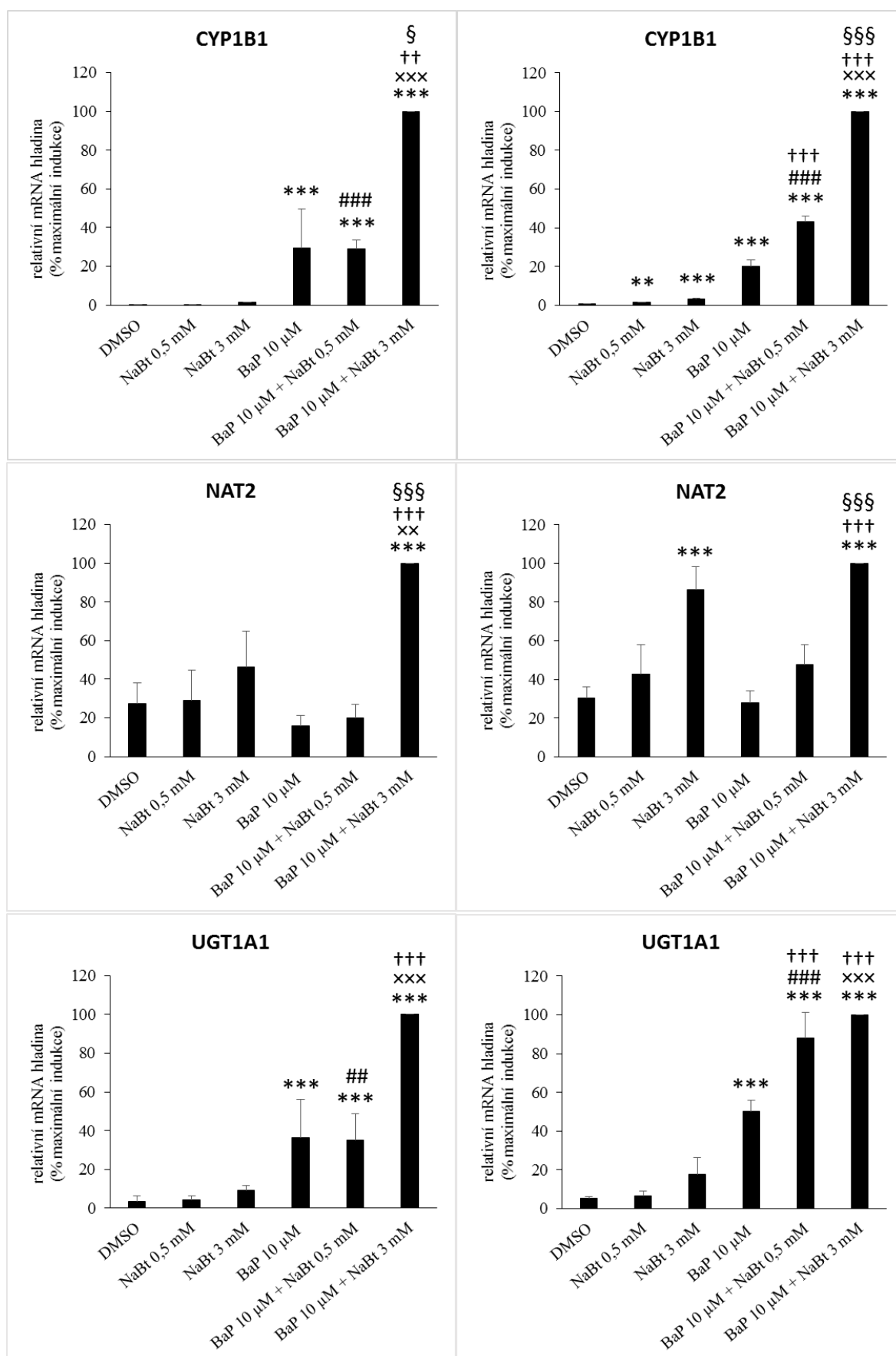
„§§§“, označuje statisticky významný rozdíl mezi ovlivněním kombinací látek s různými koncentracemi butyrátu ($P < 0,001$). Všechny hodnoty byly porovnávány metodou jednocestné ANOVY a Tukeyho testu.

7.5 Účinky butyrátu a B[a]P na expresi XME v buněčné linii Caco-2.

Dalším krokem bylo ověření indukce XME také na modelu buněk Caco-2, které jsou využívány ke studiu metabolismu a transportu PAU. Buňky byly opět ovlivněny 0,5 mM butyrátem, 10 μ M B[a]P a 3 mM butyrátem po dobu 24 h. V případě této linie byly připraveny 2 sady vzorků totální RNA a to jak z nediferencovaných tak z diferencovaných buněk Caco-2. Výsledky jsou shrnuty v Obrázku č. 8.

Obě linie, diferencovaná i nediferencovaná, vykazovaly v případě enzymů CYP1A1 a CYP1B1 shodný trend po ovlivnění studovanými látkami. Enzymy byly indukovány působením B[a]P a tato indukce byla posílena butyrátem při kombinovaném ovlivnění, stejně jako u obou předchozích linií. V případě působení samotného butyrátu nebyl zaznamenán žádný efekt, a to i v případě vyšší koncentrace (3 mM). Enzym NAT2 byl indukován převážně butyrátem a tato indukce byla posílena při spolupůsobení B[a]P a butyrátu v koncentraci 3 mM. Při srovnání s kontrolním vzorkem je zřejmé, že samotný B[a]P neměl na indukci enzymu žádný vliv. Enzym UGT1A1 byl indukován B[a]P a indukce byla posílena butyrátem, stejně jako v případě enzymů CYP rodiny. V případě nediferencované linie došlo k výraznému posílení indukce po kombinovaném ovlivnění i při použití nižší koncentrace butyrátu (0,5 mM).





Obrázek č. 8: Změny relativních hladin mRNA vybraných XME vzhledem k maximální indukci po 24 hodinové inkubaci s butyrátem v koncentracích (0,5mM a 3mM), B[a]P a kombinací obou látek v nediferencovaných a diferencovaných buňkách Caco-2.

Jednotlivé sloupce grafu představují průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky ze tří nezávislých opakování. Symboly „**“, „***“, označují statisticky významný rozdíl mezi kontrolou (DMSO) a ovlivněním kombinací látek ($P < 0,01$, $P < 0,001$). Symboly „##“, „###“, označují statisticky významný rozdíl mezi ovlivněním samotným butyrátem v koncentraci (0,5mM) a ovlivněním kombinací látek ($P < 0,001$). Symbol „×××“, označuje statisticky významný rozdíl mezi ovlivněním samotným butyrátem v koncentraci (3mM) a ovlivněním kombinací látek ($P < 0,001$). Symboly „††“, „†††“, označují statisticky významný rozdíl mezi ovlivněním samotným B[a]P a ovlivněním kombinací látek ($P < 0,01$, $P < 0,001$). Symboly „§§“, „§§§“, označují statisticky významný rozdíl mezi ovlivněním kombinací látek s různými koncentracemi butyrátu ($P < 0,001$). Všechny hodnoty byly porovnávány metodou jednocestné ANOVY a Tukeyho testu.

8 Diskuse

Buňky střevního epitelu přicházejí do kontaktu s velkým množstvím látek různého charakteru přijímaných v potravě. Tyto látky mohou mít jak protektivní, tak toxické účinky. Jednou z látek běžně přítomných ve střevě, která má chemoprotektivní účinky, je mastná kyselina s krátkým řetězcem - butyrát. Účinky butyrátu na buňky střevního epitelu jsou předmětem mnoha studií (Bultman 2014; Sengupta *et al.*, 2006; Scharlau *et al.*, 2009). První zmínky o přítomnosti butyrátu, nebo SCFA obecně, ve střevě se objevily již před více než dvěma dekádami (Cummings *et al.*, 1987; Cummings 1981). Butyrát je produkt bakteriální mikroflóry metabolizující vlákninu a pro enterocyty slouží primárně jako zdroj energie. Zajímavé jsou zejména výsledky studií poukazujících na jeho protinádorové účinky (Clarke *et al.*, 2008; Le Leu *et al.*, 2009; Toden *et al.*, 2007). Nádorová chemoprevence je charakterizována schopností různých látek zvrátit, potlačit, nebo předejít rozvoji nádoru (Scharlau *et al.*, 2009). Mechanismy nádorové chemoprevence mohou být různé, například zastavení proliferace mitotických buněk a navození diferenciací a apoptózy. Právě tyto účinky jsou přisuzovány butyrátu. Jedním z navrhovaných mechanismů tohoto efektu je mj. také indukce GST jako detoxifikačních enzymů (Pool-Zobel *et al.*, 2005). Hlavním molekulárním mechanismem účinku butyrátu je pravděpodobně jeho schopnost inhibovat HDAC, díky níž působí jako „globální transkripční faktor“ a moduluje aktivitu řady signálních drah zapojených do řízení procesů proliferace, diferenciací a apoptózy (Bultman a Jobin 2014; McBain *et al.*, 1997). Těmito mechanismy zastavuje proliferaci transformovaných nádorových buněk (Donohoe *et al.*, 2012). Výsledky několika studií však naznačují, že inhibiční aktivita butyrátu může být buněčně i genově specifická (Haarmann-Stemmann *et al.*, 2007; Schneckeburger *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2004)

Butyrát tedy představuje látku s protektivním účinkem. Díky své iHDAC aktivitě však mimo jiné zvyšuje expresi CYP1 enzymů, a tím potenciálně úroveň bioaktivace B[a]P. Tento efekt byl pozorován i v naší laboratoři (Zapletal *et al.*, 2016). Nicméně v *in vivo* podmínkách má zvýšená indukce CYP1A1 pravděpodobně převážně protektivní účinek, vzhledem k tomu, že se jedná o jeden z hlavních enzymů metabolismu B[a]P a podporuje jeho rychlejší odbourávání (Uno *et al.*, 2006). Cílem této práce bylo ověřit jaký má kombinované působení B[a]P a butyrátu účinek na expresi dalších XME přítomných ve střevě a zjistit jak jsou zapojeny do metabolismu PAU.

Hladiny XME ve sliznici tlustého střeva jsou obecně nízké. To může v kombinaci s vysokou expozicí bioaktivním nebo karcinogenním látkám přispívat k vyšší incidenci

karcinomu v této části trávicího traktu (Beyerle *et al.*, 2015). Mnoho nedávno publikovaných studií se zaměřilo zejména na zjišťování polymorfizmů XME a jejich vztahu k riziku vzniku CRC. Velmi málo studií se však doposud věnovalo sledování rozdílů exprese těchto enzymů v různých částech střeva a výsledky byly navíc mnohdy rozporuplné. Studie z této oblasti dobře shrnuje souhrnná práce Beyerle *et al.* (2015). V epitelu tlustého střeva jsou normálně detekovány enzymy rodiny CYP450, zejména pak isoformy CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2E1 a CYP3A5 (Beyerle *et al.*, 2015). Nejvýznamnějším extrahepatickým cytochromem, pravděpodobně zapojeným do patologie CRC, je pak isoforma CYP1B1 (Badal a Delgoda 2013; Chang *et al.*, 2005). Také v této práci byla pozorována indukovatelnost tohoto enzymu na různých buněčných liniích odvozených od střevního epitelu, a podobně jako u CYP1A1 byla i indukce CYP1B1 mRNA B[a]P podpořena působením butyrátu.

Abychom zjistili, které další geny pro XME v epiteliálních buňkách kolonu mohou být ovlivněny butyrátem, B[a]P, či jejich kombinací, provedli jsme analýzu pomocí PCR array a jednokrokové qRT-PCR metody na buněčném modelu HCT-116. Abychom ověřili, že námi získané výsledky se neomezují pouze na tento buněčný model, provedli jsme qRT-PCR analýzu také na dalších buněčných modelech. Za tímto účelem byly připraveny vzorky z linií HT-29 a Caco-2 a měření bylo zopakováno na nich. Caco-2 lze vhodnými podmínkami kultivace přimět k diferenciaci a polarizaci, takže jejich fenotyp morfologicky a funkčně připomíná enterocyty (Pignata *et al.*, 1994). Nabízí tedy zajímavé srovnání diferencovaných a nediferencovaných buněk. Připravili jsme proto vzorky jak z diferencovaných tak i nediferencovaných buněk a sledovali rozdíly v indukci studovaných enzymů.

V případě těchto dalších linií byla situace o něco méně jasná než u HCT-116. Podařilo se ověřit indukci pouze u enzymů CYP1A1, CYP1B1, UGT1A1, NAT2. Navíc během prvních pokusů se ukázalo, že se tyto buňky liší v odpovědi na butyrát a nízká dávka (0,5mM) u nich nemusí být dostatečná k vyvolání indukce enzymů. Proto jsme použili vyšší (3mM) koncentraci butyrátu, která je však stále v mezích normálních fyziologických podmínek střeva (Donohoe *et al.*, 2012; Hofmanová *et al.*, 2012). Výsledky z linie Caco-2 u obou stádií diferenciacie korespondovaly s výsledky získanými u buněk HT-29, nediferencované buňky nicméně reagovaly silněji.

Kromě již zmíněných enzymů rodiny CYP450, lze mezi důležité XME ve střevě zařadit UGT. Nejběžnější rodinou v této tkáni je UGT1A, jejíž mRNA hladiny klesají v transformované nádorové tkáni (Wang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). Bylo rovněž zjištěno, že enzymatická aktivita UGT je u CRC pacientů nižší (Hoensch *et al.*, 2013). Primární UGT v tlustém střevě je UGT1A10, další detekované isoformy jsou UGT1A1, UGT1A6, UGT1A7,

UGT1A8, UGT1A9 (Court *et al.*, 2012). Z rodiny UGT2A enzymů jsou v kolonu exprimovány tyto isoformy: UGT2A3, UGT2B4, UGT2B7, UGT2B15 a UGT2B17 (Court *et al.*, 2012). V největší míře jsou přítomny isoformy UGT2A3 a 2B4. Tyto enzymy jsou důležité v mnoha glukuronidačních reakcích širokého spektra substrátů, přičemž různé enzymatické aktivity a polymorfizmy mohou hrát roli v patologii CRC (Angstadt *et al.*, 2013; Angstadt *et al.*, 2014; Holthe *et al.*, 2002).

V této práci se podařilo zjistit, že UGT1A1 je indukována v různé míře zejména po působení kombinace obou studovaných látek. V buňkách HCT-116 a HT-29 byl tento enzym indukován působením samotného butyrátu a kombinací obou látek a v menší míře také B[a]P. V případě linie Caco-2, neměl samotný butyrát výrazný efekt na indukci, patrnější byl nárůst hladin mRNA po působení B[a]P a kombinací látek, zejména v nediferencovaných buňkách. V linii HCT-116 byla, podobně jako u UGT1A1, indukována také UGT1A4.

Mezi další enzymy detekovatelné v tlustém střevě patří NAT, SULT a GST. NAT1 a NAT2 jsou zapojeny zejména do metabolismu heterocyklických aminů. NAT1 je přítomna téměř ve všech tkáních, exprese NAT2 se omezuje pouze na játra a střeva a jen stopové hladiny jsou přítomny v jiných tkáních (Beyerle *et al.*, 2015). V rámci této diplomové práce se podařilo zjistit, že exprese NAT2 může být indukována butyrátem v buněčných modelech odvozených od epitelu tlustého střeva.

V buňkách HCT-116 byla NAT2 silně indukována butyrátem a bylo pozorováno posílení indukce v kombinaci. Indukce butyrátem byla společná všem buněčným liniím, v případě ostatních však až při vyšší koncentraci (3mM). Navíc v buňkách HT-29 bylo pozorováno oslabení působení butyrátu v kombinaci s B[a]P. B[a]P neměl v případě žádné linie posilující efekt na indukci enzymu. Naopak v některých případech byl dokonce zaznamenán jejich lehký pokles oproti kontrole (Caco-2).

Sulfotransferázy (SULT) patří mezi enzymy fáze II detekovatelné ve střevní tkáni. U lidí jsou známy isoformy SULT1, SULT2, SULT4, SULT6. Během našeho experimentu se však nepodařilo pozorovat indukci těchto enzymů po působení butyrátu, B[a]P nebo jejich kombinace. Podobně tomu bylo i v případě GST, které se řadí mezi další důležité enzymy v buňkách střevního epitelu. Nejdůležitější isoformou zde je GSTP1 (Grubben *et al.*, 2000). Ani zde jsme však nepozorovali významnou indukci.

Indukce 4 dalších enzymů, AKR1C1, AKR1C3, NQO1 a ALDH, byla pozorována pouze v buňkách HCT-116. NQO1 byl indukován B[a]P a indukce tohoto enzymu byla posílena kombinací obou látek. Pozorovaný trend byl shodný s CYP1 enzymy, pouze s nižší intenzitou. Nárůst exprese AKR enzymů může souviset s metabolickou aktivací PAU trans-dihydrodiolů

na o-chinony (Penning 2014). Isoformy AKR1C1 – AKR1C4 hrají významnou úlohu v aktivaci PAU prostřednictvím jejich dihydrodiol dehydrogenasové aktivity. Indukce NQO1 by naopak mohla přispět k metabolizaci o-chinonů vznikajících aktivitou AKR.

Ostatní enzymy byly indukovány zejména butyrátem. Po ovlivnění B[a]P nebyly pozorovány téměř žádné změny v jejich expresi. Největší změny byly zaznamenány v případě enzymu AKR1C3, jehož hladiny mRNA byly po ovlivnění samotným butyrátem v některých případech dokonce vyšší, než po kombinovaném ovlivnění.

Vedle buněčných modelů uvedených v této práci, jsme testovali i možnost detekce těchto enzymů v buněčné linii AA/C1. Buňky AA/C1 představují pomalu rostoucí linii odvozenou z kolorektálního adenomu. Pravděpodobně vykazují značně rozdílný expresní profil oproti ostatním studovaným liniím, protože výsledky detekce XME byly velmi variabilní a nebylo je tedy možné zařadit do výsledkové části této práce.

9 Závěr

V této práci se nám podařilo s využitím *in vitro* modelů buněk epitelu tlustého střeva detekovat indukci některých významných XME po působení butyrátu (významného produktu střevního mikrobiomu) a B[a]P (dietárního karcinogenu). Tyto enzymy by mohly významným způsobem ovlivnit metabolismus karcinogenů, jako jsou PAU a HAA v epitelu tlustého střeva a rekta. Naše výsledky také poukazují na poměrně vysokou variabilitu indukce XME v různých buněčných modelech odvozených od CRC. Skutečná fyziologická úloha indukovaných enzymů není samozřejmě z výsledků získaných *in vitro* jasná, data prezentovaná v této práci však představují základ pro další práce v této oblasti, zaměřené na studium aktivit těchto enzymů ve střevě (zejména v normálních enterocytech a jejich prekurzorech) a jejich roli v detoxifikaci či bioaktivaci dietárních karcinogenů.

10 Literatura

Adam, P. J., Berry, J., Loader, J. A., Tyson, K. L., Craggs, G., Smith, P., De Belin, J., Steers, G., Pezzella, F., Sachsenmeir, K. F., Stamps, A. C., Herath, A., Sim, E., O'hare, M. J., Harris, A. L. and Terrett, J. A. 2003. Arylamine n-acetyltransferase-1 is highly expressed in breast cancers and conveys enhanced growth and resistance to etoposide in vitro. *Mol Cancer Res.* 1: 826-35.

Ames, B. N., Profet, M. and Gold, L. S. 1990. Dietary pesticides (99.99% all natural). *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 7777-81.

Anandatheerthavarada, H. K., Vijayasathya, C., Bhagwat, S. V., Biswas, G., Mullick, J. and Avadhani, N. G. 1999. Physiological role of the n-terminal processed p4501a1 targeted to mitochondria in erythromycin metabolism and reversal of erythromycin-mediated inhibition of mitochondrial protein synthesis. *J Biol Chem.* 274: 6617-25.

Andriamihaja, M., Chaumontet, C., Tome, D. and Blachier, F. 2009. Butyrate metabolism in human colon carcinoma cells: Implications concerning its growth-inhibitory effect. *J Cell Physiol.* 218: 58-65.

Angstadt, A. Y., Berg, A., Zhu, J., Miller, P., Hartman, T. J., Lesko, S. M., Muscat, J. E., Lazarus, P. and Gallagher, C. J. 2013. The effect of copy number variation in the phase ii detoxification genes *ugt2b17* and *ugt2b28* on colorectal cancer risk. *Cancer.* 119: 2477-85.

Angstadt, A. Y., Hartman, T. J., Lesko, S. M., Muscat, J. E., Zhu, J., Gallagher, C. J. and Lazarus, P. 2014. The effect of *ugt1a* and *ugt2b* polymorphisms on colorectal cancer risk: Haplotype associations and gene–environment interactions. *Gene Chromosome Canc.* 53: 454-66.

Arca, P., Hardisson, C. and Suarez, J. 1990. Purification of a glutathione s-transferase that mediates fosfomycin resistance in bacteria. *Antimicrob Agents Ch.* 34: 844-48.

Asher, G., Bercovich, Z., Tsvetkov, P., Shaul, Y. and Kahana, C. 2005. 20s proteasomal degradation of ornithine decarboxylase is regulated by *nqo1*. *Mol Cell.* 17: 645-55.

Asher, G., Lotem, J., Cohen, B., Sachs, L. and Shaul, Y. 2001. Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by nadh quinone oxidoreductase 1. *Proc Natl Acad Sci.* 98: 1188-93.

Badal, S. and Delgoda, R. 2013. *Cyp1b1*: Friend or foe? A critical review. *Biochemistry-US.* 1: 8.

Badawi, A. F., Hirvonen, A., Bell, D. A., Lang, N. P. and Kadlubar, F. F. 1995. Role of aromatic amine acetyltransferases, *nat1* and *nat2*, in carcinogen-DNA adduct formation in the human urinary bladder. *Cancer Res.* 55: 5230-37.

Baird, W. M., Hooven, L. A. and Mahadevan, B. 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen.* 45: 106-14.

Balu, N., Padgett, W. T., Lambert, G. R., Swank, A. E., Richard, A. M. and Nesnow, S. 2004. Identification and characterization of novel stable deoxyguanosine and deoxyadenosine adducts of benzo [a] pyrene-7, 8-quinone from reactions at physiological pH. *Chem Res Toxicol.* 17: 827-38.

Balu, N., Padgett, W. T., Nelson, G. B., Lambert, G. R., Ross, J. A. and Nesnow, S. 2006. Benzo[a]pyrene-7,8-quinone-3'-mononucleotide adduct standards for 32p postlabeling analyses: Detection of benzo[a]pyrene-7,8-quinone-calf thymus DNA adducts. *Anal Biochem.* 355: 213-23.

Bansal, V. and Kim, K.-H. 2015. Review of pah contamination in food products and their health hazards. *Environ Int.* 84: 26-38.

Barycki, J. J. and Colman, R. F. 1997. Identification of the nonsubstrate steroid binding site of rat liver glutathione-S-transferase, isozyme 1-1, by the steroid affinity label, 3 β -(iodoacetoxy)dehydroisoandrosterone. *Arch Biochem Biophys.* 345: 16-31.

Bedford, M., Ananthan, S., Saleh, D., Hickson, A., McGregor, A., Boyle, K. and Burke, D. 2012. Response of glutathione S-transferase pi (gstp1) to neoadjuvant therapy in rectal adenocarcinoma. *Colorectal Dis.* 14: 1483-88.

Beischlag, T. V., Morales, J. L., Hollingshead, B. D. and Perdew, G. H. 2008. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev Eukar Gene.* 18: 207-50.

Bell, D. A., Stephens, E. A., Castranio, T., Umbach, D. M., Watson, M., Deakin, M., Elder, J., Hendrickse, C., Duncan, H. and Strange, R. C. 1995. Polyadenylation polymorphism in the acetyltransferase 1 gene (nat1) increases risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 55: 3537-42.

Beyerle, J., Frei, E., Stiborova, M., Habermann, N. and Ulrich, C. M. 2015. Biotransformation of xenobiotics in the human colon and rectum and its association with colorectal cancer. *Drug Metab Rev.* 47: 199-221.

Bièche, I., Girault, I., Urbain, E., Tozlu, S. and Lidereau, R. 2004. Relationship between intratumoral expression of genes coding for xenobiotic-metabolizing enzymes and benefit from adjuvant tamoxifen in estrogen receptor alpha-positive postmenopausal breast carcinoma. *Breast Cancer Res.* 6: 1-12.

Bishnoi, N. R., Mehta, U. and Pandit, G. G. 2006. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in fruits and vegetables using high performance liquid chromatography. *Indian J Chem Techn.* 13: 30-35.

Blachier, F., Mariotti, F., Huneau, J.-F. and Tomé, D. 2007. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino acids*. 33: 547-62.

Bolt, H. M. and Degen, G. H. 2004. Human carcinogenic risk evaluation, part ii: Contributions of the eurotox specialty section for carcinogenesis. *Toxicol Sci*. 81: 3-6.

Bourgine, J., Billaut-Laden, I., Happillon, M., Lo-Guidice, J.-M., Maunoury, V., Imbenotte, M. and Broly, F. 2012. Gene expression profiling of systems involved in the metabolism and the disposition of xenobiotics: Comparison between human intestinal biopsies and colon cell lines. *Drug Metab Dispos*. 40: 694-705.

Bultman, S. J. 2014. Molecular pathways: Gene–environment interactions regulating dietary fiber induction of proliferation and apoptosis via butyrate for cancer prevention. *Clin Cancer Res*. 20: 799-803.

Bultman, S. J. and Jobin, C. 2014. Microbial-derived butyrate: An oncometabolite or tumor-suppressive metabolite? *Cell Host Microbe*. 16: 143-45.

Burczynski, M. E., Harvey, R. G. and Penning, T. M. 1998. Expression and characterization of four recombinant human dihydrodiol dehydrogenase isoforms: Oxidation of trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene to the activated o-quinone metabolite benzo[a]pyrene-7,8-dione. *Biochemistry-Us*. 37: 6781-90.

Burczynski, M. E., Lin, H.-K. and Penning, T. M. 1999. Isoform-specific induction of a human aldo-keto reductase by polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs), electrophiles, and oxidative stress: Implications for the alternative pathway of pah activation catalyzed by human dihydrodiol dehydrogenase. *Cancer Res*. 59: 607-14.

Burchell, B., Brierley, C. H. and Rance, D. 1995. Specificity of human udp-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation. *Life Sci*. 57: 1819-31.

Butcher, N. J. and Minchin, R. F. 2012. Arylamine n-acetyltransferase 1: A novel drug target in cancer development. *Pharmacol Rev*. 64: 147-65.

Cadenas, E. 1995. Antioxidant and prooxidant functions of dt-diaphorase in quinone metabolism. *Biochem Pharmacol*. 49: 127-40.

Carver, L. A. and Bradfield, C. A. 1997. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem*. 272: 11452-56.

Clarke, J. M., Topping, D. L., Bird, A. R., Young, G. P. and Cobiac, L. 2008. Effects of high-amylose maize starch and butyrylated high-amylose maize starch on azoxymethane-induced intestinal cancer in rats. *Carcinogenesis*. 29: 2190-94.

Coles, B. F., Chen, G., Kadlubar, F. F. and Radominska-Pandya, A. 2002. Interindividual variation and organ-specific patterns of glutathione s-transferase alpha, mu, and pi expression in gastrointestinal tract mucosa of normal individuals. *Arch Biochem Biophys.* 403: 270-76.

Collins, A. R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol* 26: 249-61.

Conney, A. H. 1982. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res.* 42: 4875-917.

Court, M. H., Zhang, X., Ding, X., Yee, K. K., Hesse, L. M. and Finel, M. 2012. Quantitative distribution of mRNAs encoding the 19 human udp-glucuronosyltransferase enzymes in 26 adult and 3 fetal tissues. *Xenobiotica.* 42: 266-77.

Cross, A. J. and Sinha, R. 2004. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environ Mol Mutagen.* 44: 44-55.

Cummings, J., Pomare, E., Branch, W., Naylor, C. and Macfarlane, G. 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut.* 28: 1221-27.

Cummings, J. H. 1981. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut.* 22: 763.

David Josephy, P., Peter Guengerich, F. and Miners, J. O. 2005. "Phase i and phase ii" drug metabolism: Terminology that we should phase out? *Drug Metab Rev.* 37: 575-80.

Davie, J. R. 2003. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr.* 133: 2485S-93S.

Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J. and Bottomley, W. 2002. Mutations of the braf gene in human cancer. *Nature.* 417: 949-54.

Davis, C. D., Schut, H. A. and Snyderwine, E. G. 1993. Enzymatic phase ii activation of the n-hydroxylamines of iq, melqx and phip by various organs of monkeys and rats. *Carcinogenesis.* 14: 2091-96.

Deller, S., Macheroux, P. and Sollner, S. 2007. Flavin-dependent quinone reductases. *Cell Mol Life Sci.* 65: 141-60.

Denison, M. S., Pandini, A., Nagy, S. R., Baldwin, E. P. and Bonati, L. 2002. Ligand binding and activation of the ah receptor. *Chem-Biol Interact.* 141: 3-24.

Dietrich, C. and Kaina, B. 2010. The aryl hydrocarbon receptor (ahr) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis.* 31: 1319-28.

Diggs, D. L., Huderson, A. C., Harris, K. L., Myers, J. N., Banks, L. D., Rekhadevi, P. V., Niaz, M. S. and Ramesh, A. 2011. "Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers: A perspective". *J Environ Sci Heal C*. 29: 324-57.

Director, A. E., Nath, J., Ramsey, M. J., Swiger, R. R. and Tucker, J. D. 1996. Cytogenetic analysis of mice chronically fed the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5b] pyridine. *Mutat Res-Envir Muta*. 359: 53-61.

Donohoe, D. R., Collins, L. B., Wali, A., Bigler, R., Sun, W. and Bultman, S. J. 2012. The warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Mol cell*. 48: 612-26.

Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'connell, T. M., Bunger, M. K. and Bultman, S. J. 2011. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab*. 13: 517-26.

Egleton, J. E., Thinnies, C. C., Seden, P. T., Laurieri, N., Lee, S. P., Hadavizadeh, K. S., Measures, A. R., Jones, A. M., Thompson, S., Varney, A., Wynne, G. M., Ryan, A., Sim, E. and Russell, A. J. 2014. Structure–activity relationships and colorimetric properties of specific probes for the putative cancer biomarker human arylamine n-acetyltransferase 1. *Bioorgan Med Chem*. 22: 3030-54.

Ellinger-Ziegelbauer, H., Aubrecht, J., Kleinjans, J. C. and Ahr, H.-J. 2009. Application of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity. *Toxicol lett*. 186: 36-44.

Endo, K., Uno, S., Seki, T., Ariga, T., Kusumi, Y., Mitsumata, M., Yamada, S. and Makishima, M. 2008. Inhibition of aryl hydrocarbon receptor transactivation and DNA adduct formation by cyp1 isoform-selective metabolic deactivation of benzo[a]pyrene. *Toxicol Appl Pharm*. 230: 135-43.

Eshleman, J. R., Lang, E. Z., Bowerfind, G. K., Parsons, R., Vogelstein, B., Willson, J. K., Veigl, M. L., Sedwick, W. D. and Markowitz, S. D. 1995. Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene*. 10: 33-7.

Frandsen, H., Rasmussen, E. S., Nielsen, P. A., Farmer, P., Dragsted, L. and Larsen, J. C. 1991. Metabolic formation, synthesis and genotoxicity of the n-hydroxy derivative of the food mutagen 2-amino-1-methyl–6-phenylimidazo (4, 5–b) pyridine (phip). *Mutagenesis*. 6: 93-98.

Fujii-Kuriyama, Y. and Mimura, J. 2005. Molecular mechanisms of ahr functions in the regulation of cytochrome p450 genes. *Biochem Bioph Res Co*. 338: 311-17.

Fukumoto, S.-i., Yamauchi, N., Moriguchi, H., Hippo, Y., Watanabe, A., Shibahara, J., Taniguchi, H., Ishikawa, S., Ito, H., Yamamoto, S., Iwanari, H., Hironaka, M., Ishikawa, Y., Niki, T., Sohara, Y., Kodama, T., Nishimura, M., Fukayama, M., Dosaka-Akita, H. and Aburatani, H. 2005. Overexpression of the aldo-keto reductase family protein akr1b10 is highly correlated with smokers' non–small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res*. 11: 1776-85.

Fung, K. Y., Cosgrove, L., Lockett, T., Head, R. and Topping, D. L. 2012. A review of the potential mechanisms for the lowering of colorectal oncogenesis by butyrate. *Brit J Nutr.* 108: 820-31.

Gaitanarou, E., Seretis, E., Xinopoulos, D., Paraskevas, E., Arnoyiannaki, N. and Voloudakis-Baltatzis, I. 2008. Immunohistochemical localization of glutathione s-transferase-pi in human colorectal polyps. *World J Gastroentero.* 14: 4179-84.

Gelboin, H. V. 1980. Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: Role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev.* 60: 1107-66.

Gibis, M. 2016. Heterocyclic aromatic amines in cooked meat products: Causes, formation, occurrence, and risk assessment. *Compr Rev Food Sci F.*

Go, R.-E., Hwang, K.-A. and Choi, K.-C. 2015. Cytochrome p450 1 family and cancers. *J Steroid Biochem.* 147: 24-30.

Goss, K. H. and Groden, J. 2000. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol.* 18: 1967-79.

Grubben, M., Van Den Braak, C. C. M., Peters, W. H. M., Van Der Meer, J. W. M. and Nagengast, F. M. 2000. Low levels of colonic glutathione s-transferase in patients with x-linked agammaglobulinaemia. *Eur J Clin Invest.* 30: 642-45.

Gu, Y.-Z., Hogenesch, J. B. and Bradfield, C. A. 2000. The pas superfamily: Sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol.* 40: 519-61.

Guengerich, F. P. 2003. Cytochromes p450, drugs, and diseases. *Mol Interv.* 3: 194-204.

Haarmann-Stemmann, T., Bothe, H., Kohli, A., Sydlik, U., Abel, J. and Fritsche, E. 2007. Analysis of the transcriptional regulation and molecular function of the aryl hydrocarbon receptor repressor in human cell lines. *Drug Metab Dispos.* 35: 2262-69.

Hamer, H. M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F. and Brummer, R. J. 2008. Review article: The role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharm Ther.* 27: 104-19.

Hankinson, O. 1995. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol.* 35: 307-40.

Hankinson, O., Brooks, B. A., Weir-Brown, K. I., Hoffman, E. C., Johnson, B. S., Nanthur, J., Reyes, H. and Watson, A. J. 1991. Genetic and molecular analysis of the ah receptor and of cyp1a1 gene expression. *Biochimie.* 73: 61-66.

Hara, A., Matsuura, K., Tamada, Y., Sato, K., Miyabe, Y., Deyashiki, Y. and Ishida, N. 1996. Relationship of human liver dihydrodiol dehydrogenases to hepatic bile-acid-binding protein and an oxidoreductase of human colon cells. *Biochem J.* 313: 373-76.

Hayes, J. D., Flanagan, J. U. and Jowsey, I. R. 2005. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol.* 45: 51-88.

Hein, D. W., Doll, M. A., Fretland, A. J., Leff, M. A., Webb, S. J., Xiao, G. H., Devanaboyina, U.-S., Nangju, N. A. and Feng, Y. 2000. Molecular genetics and epidemiology of the nat1 and nat2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidem Biomar.* 9: 29-42.

Helleday, T., Lo, J., Van Gent, D. C. and Engelward, B. P. 2007. DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA repair.* 6: 923-35.

Hellmold, H., Magnusson, M., Pelto-Huikko, M., Rylander, T., Gustafsson, J.-Å. and Warner, M. 1998. Identification of cyp2a3 as a major cytochrome p450 enzyme in the female peripubertal rat breast. *Mol Pharmacol.* 53: 475-82.

Hinnebusch, B. F., Meng, S., Wu, J. T., Archer, S. Y. and Hodin, R. A. 2002. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr.* 132: 1012-17.

Hoensch, H. P., Roelofs, H. M., Edler, L., Kirch, W. and Peters, W. H. 2013. Disparities of conjugating protective enzyme activities in the colon of patients with adenomas and carcinomas. *World J Gastroentero.* 19: 6020.

Hofmanová, J., Ciganek, M., Slavík, J., Kozubík, A., Stixová, L., Vaculová, A., Dušek, L. and Machala, M. 2012. Lipid alterations in human colon epithelial cells induced to differentiation and/or apoptosis by butyrate and polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem.* 23: 539-48.

Holthe, M., Klepstad, P., Zahlse, K., Borchgrevink, P. C., Hagen, L., Dale, O., Kaasa, S., Krokan, H. E. and Skorpen, F. 2002. Morphine glucuronide-to-morphine plasma ratios are unaffected by the ugt2b7 h268y and ugt1a1* 28 polymorphisms in cancer patients on chronic morphine therapy. *Eur J Clin Pharmacol.* 58: 353-56.

Hruszkewycz, A. M., Canella, K. A., Peltonen, K., Kotrappa, L. and Dipple, A. 1992. DNA polymerase action on benzo [a] pyrene—DNA adducts. *Carcinogenesis.* 13: 2347-52.

Chang, H., Su, J.-M., Huang, C. C., Liu, L. C., Tsai, C. H., Chou, M.-C. and Lin, P. 2005. Using a combination of cytochrome p450 1b1 and β -catenin for early diagnosis and prevention of colorectal cancer. *Cancer Detect Prev.* 29: 562-69.

Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S. and Loeb, L. A. 1992. 8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes g----t and a----c substitutions. *J Biol Chem.* 267: 166-72.

Cheng, K. W., Chen, F. and Wang, M. 2006. Heterocyclic amines: Chemistry and health. *Mol Nutr Food Res.* 50: 1150-70.

- Chou, H., Lang, N. and Kadlubar, F.** 1995. Metabolic activation of n-hydroxy arylamines and n-hydroxy heterocyclic amines by human sulfotransferase (s). *Cancer res.* 55: 525-29.
- Christensen, E. R. and Bzdusek, P. A.** 2005. Pahs in sediments of the black river and the ashtabula river, ohio: Source apportionment by factor analysis. *Water Res.* 39: 511-24.
- Ioannides, C.** 2002. Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics. J. Wiley.
- Ioannides, C.** 2002. Topics in xenobiochemistry - pharmacokinetic interactions between herbal remedies and medicinal drugs. *Xenobiotica.* 32: 451-78.
- Ioannides, C. and Lewis, D. F. V.** 2004. Cytochromes p450 in the bioactivation of chemicals. *Curr Top Med Chem.* 4: 1767-88.
- Jackson, S. P.** 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis.* 23: 687-96.
- Jägerstad, M. and Skog, K.** 2005. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res-Fund Mol M.* 574: 156-72.
- Jägerstad, M., Skog, K., Arvidsson, P. and Solyakov, A.** 1998. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods. *Z Lebensm Unters F A.* 207: 419-27.
- Jaiswal, A. K.** 2000. Characterization and partial purification of microsomal nad (p) h: Quinone oxidoreductases. *Arch Biochem Biophys.* 375: 62-68.
- Jez, J. M., Flynn, T. G. and Penning, T. M.** 1997. A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem Pharmacol.* 54: 639-47.
- Jiang, H., Shen, Y.-M., Quinn, A. M. and Penning, T. M.** 2005. Competing roles of cytochrome p450 1a1/1b1 and aldo-keto reductase 1a1 in the metabolic activation of (±)-7, 8-dihydroxy-7, 8-dihydro-benzo [a] pyrene in human bronchoalveolar cell extracts. *Chem Res Toxicol.* 18: 365-74.
- Jin, Y. and Penning, T. M.** 2007. Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. *Annu Rev Pharmacol.* 47: 263-92.
- Kasai, H., Crain, P. F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A. and Tanooka, H.** 1986. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis.* 7: 1849-51.
- Kato, R. and Yamazoe, Y.** 1987. Metabolic activation and covalent binding to nucleic acids of carcinogenic heterocyclic amines from cooked foods and amino acid pyrolysates. *Jpn J Cancer Res.* 78: 297-311.

Kewley, R. J., Whitelaw, M. L. and Chapman-Smith, A. 2004. The mammalian basic helix–loop–helix/pas family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell B.* 36: 189-204.

Khabaz, M. N. 2012. The gstp1 ile105val polymorphism is not associated with susceptibility to colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer P.* 13: 2949-53.

Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 87: 159-70.

Kwon, H.-O. and Choi, S.-D. 2014. Polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs) in soils from a multi-industrial city, south korea. *Sci Total Environ.* 470–471: 1494-501.

Le Leu, R. K., Hu, Y., Brown, I. L. and Young, G. P. 2009. Effect of high amylose maize starches on colonic fermentation and apoptotic response to DNA-damage in the colon of rats. *Nutr Metab.* 6: 1.

Leschelle, X., Delpal, S., Goubert, M., Blottiere, H. M. and Blachier, F. 2000. Butyrate metabolism upstream and downstream acetyl-coa synthesis and growth control of human colon carcinoma cells. *Eur J Biochem.* 267: 6435-42.

Levin, W., Chang, R. L., Wood, A. W., Thakker, D. R., Yagi, H., Jerina, D. M. and Conney, A. H. 1986. Tumorigenicity of optical isomers of the diastereomeric bay-region 3, 4-diol-1, 2-epoxides of benzo (c) phenanthrene in murine tumor models. *Cancer res.* 46: 2257-61.

Lind, C., Cadenas, E., Hochstein, P. and Ernster, L. 1990. [30] dt-diaphorase: Purification, properties, and function. *Method Enzymol.* 186: 287-301.

Liu, Z., Yan, R., Al-Salman, A., Shen, Y., Bu, Y., Ma, J., Luo, D.-X., Huang, C., Jiang, Y., Wilber, A., Mo, Y.-Y., Huang, Mei C., Zhao, Y. and Cao, D. 2012. Epidermal growth factor induces tumour marker akr1b10 expression through activator protein-1 signalling in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem J.* 442: 273-82.

Lupton, J. R. 2004. Microbial degradation products influence colon cancer risk: The butyrate controversy. *J Nutr.* 134: 479-82.

Ma, Q. and Whitlock, J. P. 1997. A novel cytoplasmic protein that interacts with the ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem.* 272: 8878-84.

Malfatti, M. A., Shen, N. H., Wu, R. W., Turteltaub, K. W. and Felton, J. S. 1995. A correlation of salmonella mutagenicity with DNA adducts induced by the cooked-food mutagen 2-amino-1-methyl-6–6-phenylimidazo [4, 5,-b] pyridine. *Mutagenesis.* 10: 425-31.

Manabe, S., Suzuki, H., Wada, O. and Ueki, A. 1993. Detection of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo [4, 5-b] pyridine (phip) in beer and wine. *Carcinogenesis.* 14: 899-901.

Markowitz, S. 2000. Tgf- β receptors and DNA repair genes, coupled targets in a pathway of human colon carcinogenesis. *BBA-Rev Cancer*. 1470: M13-M20.

Markowitz, S. D. and Bertagnolli, M. M. 2009. "Molecular basis of colorectal cancer". *New Engl J Med*. 361: 2449-60.

Markowitz, S. D., Dawson, D. M., Willis, J. and Willson, J. K. V. 2002. Focus on colon cancer. *Cancer Cell*. 1: 233-36.

Martinez, M. E. 2005. Primary prevention of colorectal cancer: Lifestyle, nutrition, exercise. *Recent Res Cancer*. 166: 177-211.

Mcbain, J. A., Eastman, A., Nobel, C. S. and Mueller, G. C. 1997. Apoptotic death in adenocarcinoma cell lines induced by butyrate and other histone deacetylase inhibitors. *Biochem Pharmacol*. 53: 1357-68.

Mccoull, K. D., Rindgen, D., Blair, I. A. and Penning, T. M. 1999. Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone depurinating n7-guanine adducts. *Chem Res Toxicol*. 12: 237-46.

McLellan, L. I. and Wolf, C. R. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance. *Drug Resist Update*. 2: 153-64.

Miners, J. O., Mckinnon, R. A. and Mackenzie, P. I. 2002. Genetic polymorphisms of udp-glucuronosyltransferases and their functional significance. *Toxicology*. 181: 453-56.

Miners, J. O., Smith, P. A., Sorich, M. J., Mckinnon, R. A. and Mackenzie, P. I. 2004. Predicting human drug glucuronidation parameters: Application of in vitro and in silico modeling approaches. *Annu Rev Pharmacol*. 44: 1-25.

Minchin, R. F. 1995. Acetylation of p-aminobenzoylglutamate, a folic acid catabolite, by recombinant human arylamine n-acetyltransferase and u937 cells. *Biochem J*. 307: 1-3.

Mitchell, K. R. and Warshawsky, D. 2003. Xenobiotic inducible regions of the human arylamine n-acetyltransferase 1 and 2 genes. *Toxicol lett*. 139: 11-23.

Moon, H. B., Kannan, K., Lee, S. J. and Ok, G. 2006. Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in an urban and a suburban area of korea from 2002 to 2004. *Arch Environ Con Tox*. 51: 494-502.

Murkovic, M. 2004. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic aromatic amines in fried products. *Eur J Lipid Sci Tech*. 106: 777-85.

Murray, I. A., Patterson, A. D. and Perdew, G. H. 2014. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: Friend and foe. *Nat Rev Cancer*. 14: 801-14.

Naccari, C., Galceran, M., Moyano, E., Cristani, M., Siracusa, L. and Trombetta, D. 2009. Presence of heterocyclic aromatic amines (has) in smoked “provola” cheese from calabria (italy). *Food Chem Toxicol.* 47: 321-27.

Nakatsuru, Y., Wakabayashi, K., Fujii-Kuriyama, Y., Ishikawa, T., Kusama, K. and Ide, F. 2004. Dibenzo [a, l] pyrene-induced genotoxic and carcinogenic responses are dramatically suppressed in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Int J Cancer.* 112: 179-83.

Nebert, D. W. and Gonzalez, F. J. 1987. P450 genes - structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem.* 56: 945-93.

Nebert, D. W. and Karp, C. L. 2008. Endogenous functions of the aryl hydrocarbon receptor (ahr): Intersection of cytochrome p450 1 (cyp1)-metabolized eicosanoids and ahr biology. *J Biol Chem.* 283: 36061-65.

Nelson, D. R. 2009. The cytochrome p450 homepage. *Hum Genomics.* 4: 59-65.

Niu, L.-Y., Guan, Y.-S., Chen, Y.-Z., Wu, L.-Z., Tung, C.-H. and Yang, Q.-Z. 2012. Bodipy-based ratiometric fluorescent sensor for highly selective detection of glutathione over cysteine and homocysteine. *J Am Chem Soc.* 134: 18928-31.

Noh, H.-B., Chandra, P., Moon, J. O. and Shim, Y.-B. 2012. In vivo detection of glutathione disulfide and oxidative stress monitoring using a biosensor. *Biomaterials.* 33: 2600-07.

Ntais, C., Polycarpou, A. and Ioannidis, J. P. 2005. Association of gstm1, gstm1, and gstm1 gene polymorphisms with the risk of prostate cancer: A meta-analysis. *Cancer Epidem Biomar.* 14: 176-81.

Nwaichi, E. O. and Ntorgbo, S. A. 2016. Assessment of pahs levels in some fish and seafood from different coastal waters in the niger delta. *Toxicol Rep.* 3: 167-72.

Ohgaki, H., Hasegawa, H., Suenaga, M., Sato, S., Takayama, S. and Sugimura, T. 1987. Carcinogenicity in mice of a mutagenic compound, 2-amino-3, 8-dimethylimidazo [4, 5-f] quinoxaline (meiqx) from cooked foods. *Carcinogenesis.* 8: 665-68.

Palackal, N. T., Burczynski, M. E., Harvey, R. G. and Penning, T. M. 2001. The ubiquitous aldehyde reductase (akr1a1) oxidizes proximate carcinogen trans-dihydrodiols to o-quinones: Potential role in polycyclic aromatic hydrocarbon activation. *Biochemistry.* 40: 10901-10.

Palackal, N. T., Lee, S. H., Harvey, R. G., Blair, I. A. and Penning, T. M. 2002. Activation of polycyclic aromatic hydrocarbontrans-dihydrodiol proximate carcinogens by human aldo-keto reductase (akr1c) enzymes and their functional overexpression in human lung carcinoma (a549) cells. *J Biol Chem.* 277: 24799-808.

Park, J.-H., Gopishetty, S., Szewczuk, L. M., Troxel, A. B., Harvey, R. G. and Penning, T. M. 2005. Formation of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dguo) by pah o-

quinones: Involvement of reactive oxygen species and copper (ii)/copper (i) redox cycling. *Chem Res Toxicol.* 18: 1026-37.

Park, J.-H., Troxel, A. B., Harvey, R. G. and Penning, T. M. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon (pah) o-quinones produced by the aldo-keto-reductases (akrs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines, and 8-oxo-dguo via reactive oxygen species. *Chem Res Toxicol.* 19: 719-28.

Penning, T. M. 2014. Human aldo-keto reductases and the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol.* 27: 1901-17.

Penning, T. M. and Byrns, M. C. 2009. Steroid hormone transforming aldo-keto reductases and cancer. *Ann NY Acad Sci.* 1155: 33-42.

Penning, T. M. and Lerman, C. 2008. Genomics of smoking exposure and cessation: Lessons for cancer prevention and treatment. *Cancer Prev Res.* 1: 80-83.

Pignata, S., Maggini, L., Zarrilli, R., Rea, A. and Acquaviva, A. M. 1994. The enterocyte-like differentiation of the caco-2 tumor cell line strongly correlates with responsiveness to camp and activation of kinase a pathway. *Cell Growth Differ.* 5: 967-73.

Pool-Zobel, B., Veeriah, S. and Böhmer, F.-D. 2005. Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens—focus on glutathione s-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutat Res-Fund Mol M.* 591: 74-92.

Ranson, H., Prapantadara, L.-a. and Hemingway, J. 1997. Cloning and characterization of two glutathione s-transferases from a ddt-resistant strain of anopheles gambiae. *Biochem J.* 324: 97-102.

Rechkoblit, O., Zhang, Y., Guo, D., Wang, Z., Amin, S., Krzeminsky, J., Louneva, N. and Geacintov, N. E. 2002. Trans-lesion synthesis past bulky benzo [a] pyrene diol epoxide n 2-dg and n 6-da lesions catalyzed by DNA bypass polymerases. *J Biol Chem.* 277: 30488-94.

Rose, M., Holland, J., Dowding, A., Petch, S., White, S., Fernandes, A. and Mortimer, D. 2015. Investigation into the formation of pahs in foods prepared in the home to determine the effects of frying, grilling, barbecuing, toasting and roasting. *Food Chem Toxicol.* 78: 1-9.

Ross, D. 2004. Quinone reductases multitasking in the metabolic world. *Drug Metab Rev.* 36: 639-54.

Ross, D., Kepa, J. K., Winski, S. L., Beall, H. D., Anwar, A. and Siegel, D. 2000. Nad(p)h:Quinone oxidoreductase 1 (nqo1): Chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem-Biol Interact.* 129: 77-97.

Rowland, A., Miners, J. O. and Mackenzie, P. I. 2013. The udp-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. *Int J Biochem Cell B.* 45: 1121-32.

Sadrieh, N., Davis, C. D. and Snyderwine, E. G. 1996. N-acetyltransferase expression and metabolic activation of the food-derived heterocyclic amines in the human mammary gland. *Cancer res.* 56: 2683-87.

Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A. and Zucco, F. 2005. The caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 21: 1-26.

Sengupta, S., Muir, J. G. and Gibson, P. R. 2006. Does butyrate protect from colorectal cancer? *J Gastroen Hepatol.* 21: 209-18.

Sheehan, D., Meade, G. and Foley, V. M. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: Implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 360: 1-16.

Shen, Y.-M., Troxel, A. B., Vedantam, S., Penning, T. M. and Field, J. 2006. Comparison of p53 mutations induced by pah o-quinones with those caused by anti-benzo[a]pyrene diol epoxide in vitro: Role of reactive oxygen and biological selection. *Chem Res Toxicol.* 19: 1441-50.

Shimada, T. and Fujii-Kuriyama, Y. 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes p450 1a1 and 1b1. *Cancer Sci.* 95: 1-6.

Shimada, T., Hayes, C. L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S. S., Guengerich, F. P. and Sutter, T. R. 1996. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome p-450 1b1. *Cancer Res.* 56: 2979-84.

Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Y., Kume, H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. and Ishikawa, T. 2000. Benzo [a] pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *P Natl Acad Sci USA.* 97: 779-82.

Shou, M., Harvey, R. G. and Penning, T. M. 1993. Reactivity of benzo [a] pyrene-7, 8-dione with DNA. Evidence for the formation of deoxyguanosine adducts. *Carcinogenesis.* 14: 475-82.

Shou, M., Harvey, R. G. and Penning, T. M. 1993. Reactivity of benzo[a]pyrene-7,8-dione with DNA. Evidence for the formation of deoxyguanosine adducts. *Carcinogenesis.* 14: 475-82.

Scharlau, D., Borowicki, A., Habermann, N., Hofmann, T., Klenow, S., Miene, C., Munjal, U., Stein, K. and Gleis, M. 2009. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat Res-Rev Mutat* 682: 39-53.

Schnekenburger, M., Peng, L. and Puga, A. 2007. Hdac1 bound to the cyp1a1 promoter blocks histone acetylation associated with ah receptor-mediated trans-activation. *Biochim Biophys Acta.* 1769: 569-78.

Siegel, D., Gustafson, D. L., Dehn, D. L., Han, J. Y., Boonchoong, P., Berliner, L. J. and Ross, D. 2004. Nad(p)h:Quinone oxidoreductase 1: Role as a superoxide scavenger. *Mol Pharmacol.* 65: 1238-47.

Siena, S., Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Balfour, J. and Bardelli, A. 2009. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor–targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer I.*

Singh, S. V., Varma, V., Zimniak, P., Srivastava, S. K., Marynowski, S. W., Desai, D., Amin, S. and Ji, X. 2004. Structural basis for catalytic differences between α class human glutathione transferases hgsta1-1 and hgsta2-2 for glutathione conjugation of environmental carcinogen benzo [a] pyrene-7, 8-diol-9, 10-epoxide. *Biochemistry-Us.* 43: 9708-15.

Skog, K., Solyakov, A., Arvidsson, P. and Jägerstad, M. 1998. Analysis of nonpolar heterocyclic amines in cooked foods and meat extracts using gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 803: 227-33.

Snyderwine, E. G., Davis, C. D., Nouse, K., Roller, P. P. and Schut, H. A. 1993. 32p-postlabeling analysis of iq, melqx and phip adducts formed in vitro in DNA and polynucleotides and found in vivo in hepatic DNA from iq-, melqx-and phip-treated monkeys. *Carcinogenesis.* 14: 1389-95.

Sugimura, T., Nagao, M., Kawachi, T., Honda, M., Yahagi, T., Seino, Y., Sato, S., Matsukura, N., Matsushima, T. and Shirai, A. 1977. Mutagen-carcinogens in food, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods. In: *Origins of human cancer.* 4: 1561-77.

Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H. and Nagao, M. 2004. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci.* 95: 290-99.

Suman, S., Sinha, A. and Tarafdar, A. 2016. Polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs) concentration levels, pattern, source identification and soil toxicity assessment in urban traffic soil of dhanbad, india. *Sci Total Environ.* 545–546: 353-60.

Suzuki, N., Ohashi, E., Kolbanovskiy, A., Geacintov, N. E., Grollman, A. P., Ohmori, H. and Shibutani, S. 2002. Translesion synthesis by human DNA polymerase κ on a DNA template containing a single stereoisomer of dg-(+)-or dg-(-)-anti-n 2-bpde (7, 8-dihydroxy-anti-9, 10-epoxy-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo [a] pyrene). *Biochemistry.* 41: 6100-06.

Suzuki, T., Hayashi, M., Ochiai, M., Wakabayashi, K., Ushijima, T., Sugimura, T., Nagao, M. and Sofuni, T. 1996. Organ variation in the mutagenicity of meiq in big blue® lacI transgenic mice. *Mutat Res-Genet Tox.* 369: 45-49.

Swanson, H. I. and Bradfield, C. A. 1993. The ah-receptor: Genetics, structure and function. *Pharmacogenet Genom.* 3: 213-30.

- Tang, Y., Kassie, F., Qian, X., Ansha, B. and Turesky, R. J.** 2013. DNA adduct formation of 2-amino-9h-pyrido [2, 3-b] indole and 2-amino-3, 4-dimethylimidazo [4, 5-f] quinoline in mouse liver and extrahepatic tissues during a subchronic feeding study. *Toxicol Sci.* 133: 248-58.
- Tarantini, A., Maitre, A., Lefebvre, E., Marques, M., Marie, C., Ravanat, J.-L. and Douki, T.** 2009. Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo [a] pyrene as a pure compound and in complex mixtures. *Mutat Res-Fund Mol M.* 671: 67-75.
- Tew, K. D.** 1994. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.* 54: 4313-20.
- Thompson, L. H. and Schild, D.** 2001. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res-Fund Mol M* 477: 131-53.
- Toden, S., Bird, A. R., Topping, D. L. and Conlon, M. A.** 2007. Dose-dependent reduction of dietary protein-induced colonocyte DNA damage by resistant starch in rats correlates more highly with caecal butyrate than with other short chain fatty acids. *Cancer Biol Ther.* 6: 253-58.
- Totsuka, Y., Fukutome, K., Takahashi, M., Takahashi, S., Tada, A., Sugimura, T. and Wakabayashi, K.** 1996. Presence of n2-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3, 8-dimethylimidazo [4, 5-f] quinoxaline (dg-c8-meixq) in human tissues. *Carcinogenesis.* 17: 1029-34.
- Townsend, D. M. and Tew, K. D.** 2003. The role of glutathione-s-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene.* 22: 7369-75.
- Tozlu, S., Girault, I., Vacher, S., Vendrell, J., Andrieu, C., Spyrtos, F., Cohen, P., Lidereau, R. and Bieche, I.** 2006. Identification of novel genes that co-cluster with estrogen receptor alpha in breast tumor biopsy specimens, using a large-scale real-time reverse transcription-pcr approach. *Endocr-Relat Cancer.* 13: 1109-20.
- Tukey, R. H. and Strassburg, C. P.** 2000. Human udp-glucuronosyltransferases: Metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol.* 40: 581-616.
- Tung, E. W., Philbrook, N. A., Belanger, C. L., Ansari, S. and Winn, L. M.** 2014. Benzo [a] pyrene increases DNA double strand break repair in vitro and in vivo: A possible mechanism for benzo [a] pyrene-induced toxicity. *Mutat Res-Genet Tox.* 760: 64-69.
- Uno, S., Dalton, T. P., Dragin, N., Curran, C. P., Derkenne, S., Miller, M. L., Shertzer, H. G., Gonzalez, F. J. and Nebert, D. W.** 2006. Oral benzo [a] pyrene in cyp1 knockout mouse lines: Cyp1a1 important in detoxication, cyp1b1 metabolism required for immune damage independent of total-body burden and clearance rate. *Mol Pharmacol.* 69: 1103-14.

Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Smits, A. M. and Bos, J. L. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 319: 525-32.

Vogl, F. D., Taioli, E., Maugard, C., Zheng, W., Pinto, L. F. R., Ambrosone, C., Parl, F. F., Nedelcheva-Kristensen, V., Rebbeck, T. R. and Brennan, P. 2004. Glutathione s-transferases m1, t1, and p1 and breast cancer: A pooled analysis. *Cancer Epidem Biomar.* 13: 1473-79.

Wakabayashi, K., Nagao, M., Esumi, H. and Sugimura, T. 1992. Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Res.* 52: 2092s-98s.

Wakefield, L., Cornish, V., Long, H., Griffiths, W. J. and Sim, E. 2007. Deletion of a xenobiotic metabolizing gene in mice affects folate metabolism. *Biochem Bioph Res Co.* 364: 556-60.

Wang, J., Deng, Y., Cheng, J., Ding, J. and Tokudome, S. 2003. Gst genetic polymorphisms and lung adenocarcinoma susceptibility in a chinese population. *Cancer lett.* 201: 185-93.

Wang, M., Qi, Y.-Y., Chen, S., Sun, D.-F., Wang, S., Chen, J., Li, Y.-Q., Han, W. and Yang, X.-Y. 2012. Expression of udp-glucuronosyltransferase 1a, nuclear factor erythroid-e2-related factor 2 and kelch-like ech-associated protein 1 in colonic mucosa, adenoma and adenocarcinoma tissue. *Oncol Lett.* 4: 925-30.

Wang, M., Sun, D.-F., Wang, S., Qing, Y., Chen, S., Wu, D., Lin, Y.-M., Luo, J.-Z. and Li, Y.-Q. 2013. Polymorphic expression of udp-glucuronosyltransferase ugt1a gene in human colorectal cancer. *PloS one.* vol. 8, no. 2, pp. e57045.

Wei, Y.-D., Tepperman, K., Huang, M.-y., Sartor, M. A. and Puga, A. 2004. Chromium inhibits transcription from polycyclic aromatic hydrocarbon-inducible promoters by blocking the release of histone deacetylase and preventing the binding of p300 to chromatin. *J Biol Chem.* 279: 4110-19.

Whitlock Jr, J. P. 1993. Mechanistic aspects of dioxin action. *Chem Res Toxicol.* 6: 754-63.

Willett, W. C. 1995. Diet, nutrition, and avoidable cancer. *Environ Health Persp.* 103: 165-70.

Willett, W. C. 2001. Diet and cancer: One view at the start of the millennium. *Cancer Epidem Biomar.* 10: 3-8.

Williams, G. M. 2001. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology.* 166: 3-10.

Winder, T. and Lenz, H.-J. 2010. Molecular predictive and prognostic markers in colon cancer. *Cancer Treat Rev.* 36: 550-56.

Wu, L. and Hickson, I. D. 2006. DNA helicases required for homologous recombination and repair of damaged replication forks. *Annu Rev Genet.* 40: 279-306.

Xu, P., Oum, L., Beese, L. S., Geacintov, N. E. and Broyde, S. 2007. Following an environmental carcinogen n2-dg adduct through replication: Elucidating blockage and bypass in a high-fidelity DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 35: 4275-88.

Xue, W. and Warshawsky, D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicol Appl Pharm.* 206: 73-93.

Yu, D., Berlin, J. A., Penning, T. M. and Field, J. 2002. Reactive oxygen species generated by pah o-quinones cause change-in-function mutations in p53. *Chem Res Toxicol.* 15: 832-42.

Zapletal, O., Tylichová, Z., Neča, J., Kohoutek, J., Machala, M., Milcová, A., Pokorná, M., Topinka, J., Moyer, M. P. and Hofmanová, J. 2016. Butyrate alters expression of cytochrome p450 1a1 and metabolism of benzo [a] pyrene via its histone deacetylase activity in colon epithelial cell models. *Arch Toxicol.* 1-16.

Zhang, L., Jin, Y., Huang, M. and Penning, T. M. 2012. The role of human aldo-keto reductases in the metabolic activation and detoxication of polycyclic aromatic hydrocarbons: Interconversion of pah catechols and pah o-quinones. *Front Pharmacol.* 3: 193.

Internetové zdroje:

Dušek L., Mužík J., Kubásek M., Koptíková J., Žaloudík J., Vyzula R. 2005. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [cit. 2016-2-16]. < <http://www.svod.cz> >