

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Karolina Kettnerová

**Vliv ethinylestradiolu na  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázu**

**The effect of ethinylestradiol on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Praha, 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14. 8. 2014

.....  
Karolina Kettnerová

### **Poděkování:**

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Petru Svobodovi, DrSc. za odborné vedení a věnovaný čas. Dále jsem velice vděčná celému kolektivu oddělení biochemie membránových receptorů FgÚ AV ČR, jmenovitě RNDr. Lence Roubalové, PhD., Ing. Mírcě Vošahlíkové, PhD., Mgr. Dmytru Kaganovi, Mgr. Janě Brejchové, Ing. Kateřině Stolařové, Mgr. Haně Ujčíkové, PhD. a Mgr. Ladislavu Mertovi za trpělivý přístup, ochotnou pomoc, cenné rady a příjemné pracovní prostředí.

# Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	<b>6</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Úvod</b> .....	<b>11</b>
<b>3. Literární přehled</b> .....	<b>12</b>
3.1. Hormonální antikoncepce .....	12
3.2. Estrogeny .....	16
3.3. Plazmatická membrána .....	23
3.4. Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> - ATPáza.....	26
3.5. Fyziologický vliv ethinylestradiolu .....	41
<b>4. Cíle práce</b> .....	<b>49</b>
<b>5. Praktická část – Materiál a metody</b> .....	<b>50</b>
5.1. Chemikálie a příslušenství .....	50
5.2. Kultivace buněčné linie .....	51
5.3. Podávání ethinylestradiolu potkanům – příprava experimentálního materiálu ....	53
5.4. Příprava postnukleárního supernatantu.....	55
5.5. Frakcionace postnukleárního supernatantu pomocí gradientové centrifugace - sacharózový flotační gradient .....	56
5.6. Stanovení koncentrace proteinů.....	57
5.7. Stanovení vazby [ <sup>3</sup> H]ouabainu .....	58
5.7. Rovnovážná anizotropie DPH .....	61
<b>6. Výsledky</b> .....	<b>64</b>
6.1. Aplikace ethinylestradiolu potkanům .....	64
6.2. Stanovení koncentrace proteinů Lowryho metodou .....	65

6.3.	Fracionace postnukleárního supernatantu s pomocí gradientové centrifugace - sacharózový flotační gradient .....	67
6.4.	Jednobodové stanovení vazby [ <sup>3</sup> H]ouabainu v postnukleárním supernatantu z buněčné linie HEK293 .....	68
6.5.	Jednobodové stanovení vazby [ <sup>3</sup> H]ouabainu ve frakcích sacharózového flotačního gradientu z buněčné linie HEK293 .....	70
6.6.	Jednobodové stanovení vazby [ <sup>3</sup> H]ouabainu v postnukleárním supernatantu z tkání potkanů.....	78
6.7.	Stanovení saturační vazebné křivky [ <sup>3</sup> H]ouabainu v postnukleárním supernatantu z šedé kůry mozku potkana .....	80
6.8.	Rovnovážná anizotropie DPH .....	82
<b>7.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>88</b>
<b>9.</b>	<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>89</b>

## Abstrakt

Diplomová práce je zaměřena na studium fyziologického vlivu syntetického estrogenu ethinylestradiolu (EE), který je obsažen v preparátech orálně užívané hormonální antikoncepce. Z velkého množství fyziologicky významných molekul, jejichž exprese či funkce by mohla být EE ovlivněna, se práce zaměřuje na studium vlivu EE na sodíkem a draslíkem aktivovanou adenosintrifosfatázu ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázu), která je selektivně inhibována kardioaktivními glykosidy, jmenovitě ouabainem (g-strofantinem). Jedná se o významný, membránově vázaný enzym, který katalyzuje aktivní transport sodných draselných přes plazmatickou membránu. Pro tyto účely byla v první části experimentů využita metoda vazby [ $^3\text{H}$ ]ouabainu na  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázu. V druhé části experimentu byla pomocí rovnovážné anizotropie DPH studována fluidita plazmatické membrány.

Účinek EE na  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázu byl studován jednak v podmínkách *in vitro* v buněčné linii HEK293 (inkubace 24 hod v živném médiu), tak v podmínkách *in vivo* po subkutánním podání samicím potkanů kmene Wistar (10 dní). Výsledky získané při studiu HEK293 buněk ukázaly, že EE zvyšuje specifickou vazbu [ $^3\text{H}$ ]ouabainu ve frakcích plasmatických membrán, které byly připraveny flotací v hustotním sacharózovém gradientu. Výsledky účinku EE na vazbu [ $^3\text{H}$ ]ouabainu na podbuněčné preparáty (postnukleární supernatant) připravené z potkanů (šedá kůra mozková, levé komora srdeční, játra a kůra ledvin) nelze v současné době jednoznačně uzavřít vzhledem k tomu, že tkáně připravené z potkana, ve srovnání s jinými živočišnými druhy, příkladně morčetem, obsahují  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázu s nízkou afinitou vůči ouabainu.

**Klíčová slova:** ethinylestradiol, kombinovaná hormonální antikoncepce, plazmatická membrána,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPáza, [ $^3\text{H}$ ]ouabain, rovnovážná anizotropie fluorescence, difenylhexatrien, DPH

## Abstract

This diploma thesis is oriented to analysis of physiological effect of synthetic estrogen ethinylestradiol (EE), which represents the main component of steroid-based substance used in hormonal contraception. From wide range of physiologically important protein molecules, which might be effected by this steroid, thesis focuses to the study of the sodium plus potassium activated, magnesium dependent adenosinetriphosphatase ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase), which is selectively inhibited by cardiac glycosides such as ouabain (g-strophanthine).  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase represents an important plasma membrane bound enzyme, which catalyzes the active transport of sodium and potassium across plasma membrane. In the first part of this work,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase was determined by binding of radioactively labeled selective inhibitor of this enzyme [ $^3\text{H}$ ]ouabain, used for this purpose. In the second part of this work, plasma membrane fluidity was analyzed by steady-state fluorescence anisotropy of DPH.

The effect of EE on [ $^3\text{H}$ ]ouabain binding was studied first under *in vitro* conditions by using human embryonic kidney cells (HEK293) which were cultivated for 24 hours in the presence of EE in tissue culture medium. Second, the effect of EE was also studied under *in vivo* conditions, by subcutaneous application of EE to the female rats of Wistar strain. EE was applied for prolonged period of 10 days. Results of studies performed in HEK293 cells indicated an increase of specific [ $^3\text{H}$ ]ouabain binding in isolated plasma membranes, which were prepared by flotation of postnuclear supernatant fraction in sucrose density gradient. Results of analysis of [ $^3\text{H}$ ]ouabain binding to postnuclear fraction prepared from rat cortex, left heart ventricle, liver and renal cortex can not be unequivocally summarized at present time because of rather low-affinity [ $^3\text{H}$ ]ouabain binding sites detected in the rat tissues.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase activity in rat tissues exhibits rather low-affinity towards this inhibitor in comparison with other species, guinea-pig for instance.

**Key words:** ethinylestradiol, combined oral contraception, plasma membrane,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase, [ $^3\text{H}$ ]ouabain, steady-state fluorescence anisotropy, diphenylhexatriene, DPH

## 1. Seznam použitých zkratek

[ <sup>3</sup> H]ouabain	Ouabain značený radioaktivním tritiem
ADP	Adenosin difosfát
ATP	Adenosin trifosfát
ATPáza	Adenosin trifosfatáza
B <sub>max</sub>	Maximální počet vazebných míst
B <sub>nsp</sub>	Nespecifická vazba radioligandu
BSA	Bovine Serum Albumin (Hovězí sérový albumin)
B <sub>sp</sub>	Specifická vazba radioligandu
B <sub>tot</sub>	Celková vazba radioligandu
cAMP	Cyklický 3', 5'-adenosin monofosfát
cDNA	Komplementární DNA
Ci	Curie, jednotka radioaktivity (1 Ci = 3,7.10 <sup>10</sup> Bq)
COC	Combined Oral Contraception (Kombinovaná orální antikoncepce)
CTR	Kontrola
dH <sub>2</sub> O	Destilovaná voda
D <sub>l</sub>	Laterální difúzní konstanta lipidů
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOR-Gi <sub>1α</sub>	Buněčná linie HEK293 stabilně exprimující δ-opioidní receptor s fúzně připojenou Gi <sub>1α</sub> podjednotkou
D <sub>p</sub>	Laterální difúzní konstanta proteinů
DPH	1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EE	Ethinylestradiol
ER	Estrogenové receptory
EREs	Estrogen Response Elements (Estrogen responzivní jednotky)
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase (Kináza regulovaná extracelulárním signálem)
F	Koncentrace volného radioligandu
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching (Obnovení fluorescence po foto-vybělení)
FSH	Hormon stimulující folikuly



GnRH	Gonadotropin-releasing hormone (Hormon uvolňující gonadotropin)
GPER1	G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (Estrogenový receptor spřažený s G proteiny)
HDL	High Density Lipoprotein (Lipoprotein s vysokou hustotou)
HEK	Human Embryonic Kidney cells (Buněčná linie odvozená od lidských embryonálních ledvinných buněk)
HSP	Heat Shock Protein (Protein tepelného šoku)
I <sub>3</sub> P	Inositol-1,4,5-trifosfát
IARC	International Agency for Research on Cancer (Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny)
I <sub>VH</sub>	Intenzita fluorescence měřená při vertikální orientaci excitačního a horizontální orientaci emisního polarizátoru
I <sub>VV</sub>	Intenzita fluorescence měřená při vertikální orientaci excitačního i emisního polarizátoru
k <sub>1</sub>	Rychlostní konstanta asociace
k <sub>2</sub>	Rychlostní konstanta disociace
K <sub>d</sub>	Rovnovážná disociační konstanta
L	Ligand
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoprotein s nízkou hustotou)
LH	Luteinizační hormon
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases (Mitogenem aktivovaná protein kináza)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Nikotinamidadenindinukleotidfosfát)
NCS	Newborn Calf Serum (Novorozenecké telecí sérum)
PAK	Proteinkináza A
PBS	Phosphate Buffered Saline (Fosfátový pufr)
PC	Fosfatidylcholin
PE	Fosfoatidylethanolamin
PG	Propylenglykol
pH	Záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
PI	Fosfatidylinositol
PKC	Proteinkináza C
PLC	Fosfolipáza C
PMSF	Fenylmetylsulfonylfluorid

PNS	Postnukleární supernatant
PS	Fosfatidylserin
R	Receptor
RL	Komplex receptor-ligand
RNA	Ribonukleová kyselina
SHBG	Sex Hormone-Binding Globulin (Globulin vázající sexuální hormony)
SM	Sfingomyelin
Src	Nereceptorová tyrosinkináza
TE pufr	Tris/EDTA pufr
TF	Transkripční faktor
TGES motiv	Motiv obsahující Threonin - Glycin - Glutamin - Serin
TGF $\beta$ 1	Transforming Growth Factor $\beta$ 1 (Transformující růstový faktor $\beta$ 1)
TM	Transmembránový

## 2. Úvod

Současné ženy v ekonomicky rozvinutých zemích tráví většinu svého fertilního období snahou ovlivnit, ne-li přímo zabránit otěhotnění. Antikoncepční prostředky dosáhly nebývalé účinnosti a spolehlivosti. Nejbouřlivějším vývojem prošla kombinovaná hormonální antikoncepce. Její vývoj je charakterizován progresivním snižováním dávek, zaváděním nových progestinů a v posledních letech vynecháním dosud dominujícího ethinylestradiolu a jeho náhrada jiným vhodnějším estrogenem. Důvodem nahrazení ethinylestradiolu přirozenými estrogeny je přetrvávající negativní efekt na organismus navzdory stále se snižujícím dávkám.

Systémové účinky ethinylestradiolu jsou díky metabolismu, biologické dostupnosti a tkáňovým diferencím 100-600krát silnější než u estradiolu, přirozeného estrogenu. Užívání syntetických estrogenů zvyšuje výrazně jejich obsah v odpadních vodách, které jsou zbaveny této estrogenové příměsi po průchodu čistírnami pouze částečně (Chichirian a kol., 2007). Vzhledem k těmto vlastnostem se problematika ethinylestradiolu rozšiřuje z roviny ovlivnění metabolismu a fyziologie uživatelky i do roviny životního prostředí. Znečištění způsobené syntetickými estrogeny ovlivňuje pohlavní diferenciaci a reprodukci vodní fauny, zejména ryb. Hovoří se o estrogení endokrinní disrupci, podložené studii potvrdujícími korelaci incidence a závažnosti intersexu rybích populací s koncentrací estrogenů v kontaminovaných úsecích vodních toků. Ethinylestradiol je nejsilnějším induktorem intersexu ryb a syntézy vitelogeninu u rybích samců. Vitelogenin je protein fungující jako prekurzor proteinů žloutkového vajíčka a je exprimovaný u samic ryb, obojživelníků, plazů, pláků a většiny bezobratlých. Za přítomnosti estrogenů je exprimován i u samců a jeho exprese je tak indikátorem estrogení expozice (Sumpter a Jobling, 1995).

Pro studium vlivu ethinylestradiolu byla vybrána  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPáza, která je přítomna v plazmatických membránách všech živočišných buněk (Glynn, 1985, Lingrel a Kuntzweiler, 1994) a zajišťuje aktivní transport sodných a draselných iontů přes plazmatickou membránu. V souvislosti s tím je diskutován vztah mezi změnou její exprese a rozvojem rakoviny prsu (Chen a kol., 2006). Změna exprese a aktivity  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy byla zaznamenána u pacientů s Alzheimerovou chorobou (Chauhan a kol., 1997), diabetem (Tsimarato a kol., 2001), hypertenzí (Liu a Songu-Mize, 1997) a různými druhy rakoviny (Blok a kol., 1999; Espineda a kol., 2003; Feigelson a Henderson, 1996).

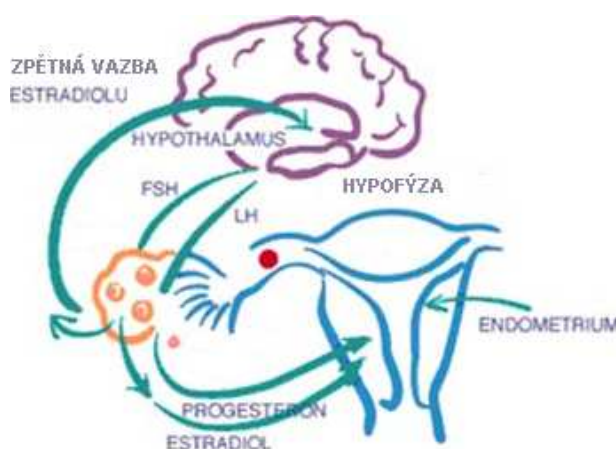
### 3. Literární přehled

#### 3.1. Hormonální antikoncepce

Nejužívanější metodou antikoncepce je v současnosti antikoncepce hormonální, která je jedním z přelomových objevů farmacie a lékařství druhé poloviny 20. století a která se rychle stala jedním z často užívaných léčiv současnosti. Její užívání ženami fertilního věku je v dnešní době považováno téměř za samozřejmost nebo alespoň za naprosto běžnou věc. Kvalita antikoncepčních preparátů se neustále zvyšuje a od počátku svého objevení se výrazně snížil obsah steroidních hormonů obsažených v jednotlivých dávkách, čímž se snížila hormonální zátěž projevující se řadou nežádoucích vedlejších účinků.

##### 3.1.1. Mechanismus účinku hormonální antikoncepce

Hormonální antikoncepce funguje na principu negativní zpětné vazby, jak demonstruje následující **obrázek č. 1**. Tvorba pohlavních hormonů je řízena GnRH (Gonadotropin-releasing hormone, gonadotropin uvolňující hormon), který je produkován v hypothalamu a následně působí na specifické buňky v adenohipofýze, ve kterých dochází k syntéze hormonu stimulujícího folikuly (FSH) a luteinizačního hormonu (LH). Tyto hormony přechází krevním oběhem do celého těla a podněcují tvorbu estrogenů a gestagenů (progestinu) ve vaječnících. Vysoká hladina pohlavních hormonů inhibuje další sekreci FSH a LH. Hormonální antikoncepce ovlivňuje nejen funkci hypothalamo-hipofyzo-ovariální osy, ale přímo i další hormonálně závislé procesy (neantikoncepční efekty). Hormonální antikoncepci lze rozdělit podle složení na čistě gestagenní a kombinovanou estrogen-gestagenní (Fait, 2008).



**Obrázek č. 1 – Estrogenová negativní zpětná vazba**

(Převzato a upraveno podle Dharmananda, 2005)

Gestagení hormonální antikoncepce je dostupná v několika odlišných typech preparátů. Nejčastěji se s ní setkáváme ve formě postkoitální antikoncepce neboli emergentní antikoncepce. Méně častou orálně podávanou formou gestagenů jsou tzv. minipilulky. Dále je možné podávat progestiny v injekční formě, ve formě podkožních tělísek a jako součást nitroděložních tělísek.

### 3.1.2. Kombinovaná hormonální antikoncepce

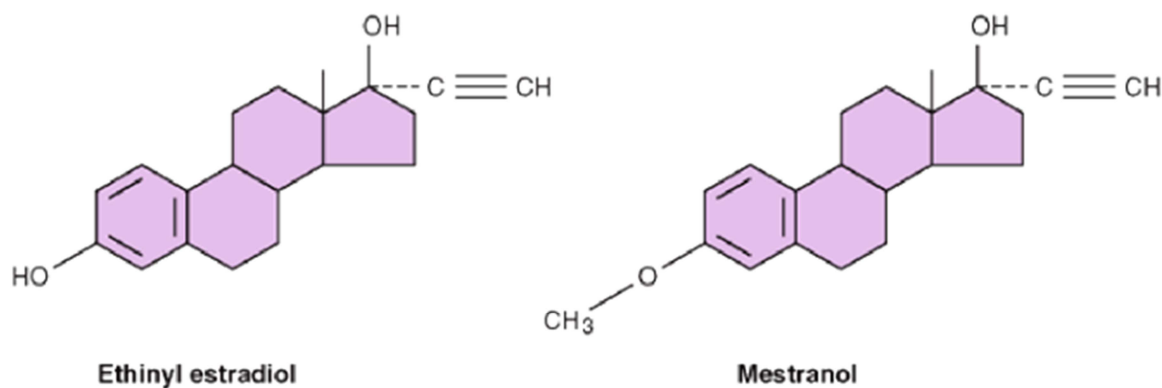
Estrogen-gestagení antikoncepce je dominantní hormonální antikoncepční metodou. Tato kombinovaná orální antikoncepce (COC, Combined Oral Contraception) je směsí estrogeneru a progestinu a mechanismus jejího účinku kombinuje vlastnosti obou složek. Mechanismy účinku preparátů COC spočívají primárně v inhibici ovulace ovlivněním zpětných vazeb v ose hypothalamus – hypofýza – ovarium. Sekundární účinek je zajištěn progestiny, které zpomalují motilitu vejcovodů a řasinkového epitelu, brání nidaci v endometriu, čímž zamezují pohybu a růstu potenciálně oplodněného vajíčka. Vlastní kontracepční účinnost je tak zaručena působením gestagenů, estrogeny řídí hlavně pravidelnost menstruačního cyklu (Kaunitz, 1998).

Antikoncepční účinek může být ovlivněn interakcí s dalšími léčivy. Tetracyklinová a cefalosporinová antibiotika poškozují střevní flóru, což má za následek sníženou dekonjugaci ethinylestradiolu a snížení jeho účinnosti omezením enterohepatálního oběhu, neboli snížení vstřebávání nekonjugovaného ethinylestradiolu. Tuberkulostatika a antikonvulziva ovlivňují aktivitu cytochromu P450 a indukují tak biotransformační enzymatické procesy v játrech, které vedou ke snížení hladiny ethinylestradiolu (Fait, 2008).

Kombinovanou hormonální antikoncepci (COC) lze rozdělovat podle dávky estrogeneru a progestinu v jednotlivých tabletách měsíčního balení. Pokud jsou dávky obou složek konstantní, jde o jednofázový přípravek. Zvýšení dávky progestinu v druhé polovině cyklu je charakteristické pro dvofázový modul. Třífázové přípravky mění dávku dvakrát, případně současně mění dávku estrogeneru. V kombifázické konstrukci se v polovině cyklu změní hladina estrogeneru i progestinu. Nejčastěji jsou užívány přípravky jednofázové (Fait, 2008).

Ve většině dostupných kombinovaných antikoncepčních preparátů je jako estrogení složka použit ethinylestradiol (EE; viz. **Obrázek č. 2**), který zcela nahradil dříve používaný mestranol (3-methylester-ethinylestradiol; viz. **Obrázek č. 2**). Nástupci ethinylestradiolu by se měli stát estradiolvalerát, přirozený 17 $\beta$ -estradiol a estetrol, které

jsou již v některých preparátech obsaženy. Dle dávky EE lze dělit COC na vysokodávkovanou (40 – 50 µg na osobu), nízkodávkovanou (30 – 37,5 µg) a velmi nízkodávkovanou (15 – 20 µg). První preparát COC z roku 1959 (Enovid od firmy Searle) obsahoval 150 µg mestranolu v jedné tabletě (Unzeitig, 2005).



**Obrázek č. 2 – Schématický vzorec ethinylestradiolu a mestranolu**

(Převzato a upraveno podle Speroff a Fritz, 2005)

Pro ethinylestradiol je typický velmi silný efekt prvního průchodu (first pass effect) snižující jeho biologickou dostupnost v organismu, která při perorálním podání činí 38 - 48 %. V plasmě se EE váže na albumin a jen 1 % cirkuluje volně (Kuhl, 2005). Ethinylestradiol má výrazný vliv na proteosyntézu v játrech, který je způsoben přítomností ethinylové skupiny, ta je zodpovědná za prodloužený účinek a pomalejší metabolizaci. Zvýšená proteosyntéza v játrech zvyšuje indukci syntézy koagulačních faktorů, angiotensinogenu, zvyšuje tak aktivitu jaterních enzymů a ovlivňuje metabolismus lipidů. Klinicky velmi významným a nezastupitelným je především jeho příznivý vliv na zvyšování sérové hladiny proteinu vázajícího sexuální hormony (SHBG) a na aterogenní index vyjádřený poměrem LDL:HDL (Unzeitig, 2005). Větší pozornost je ethinylestradiolu věnována v dalších kapitolách.

Gestageny obsažené v COC také silně ovlivňují aktivitu jaterních enzymatických procesů, spojených především s inhibičním vlivem na činnost cytochromu P450. Tento specifický bílkovinný komplex se mimo jiné podílí na odbourávání estrogenů. Důsledkem inhibice je při opakovaném podání kumulace všech látek, které jsou tímto systémem běžně odbourávány (Unzeitig, 2005). Progestinovou složkou, ač je velmi významná a nelze ji

z celkového účinku na organismus opomíjet, neboť jedinečnost jednotlivých preparátů je založena právě na zvoleném progestinu, se tato práce nezabývá.

### **3.1.3. Rizika kombinované hormonální antikoncepce**

Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří bolesti hlavy, napětí a zvětšení prsou, změny nálady, podrážděnost až emoční labilita, kožní změny, nevolnost a hlavně retence tekutin, která je zaznamenána jako přibývání na váze. Vzácněji se vyskytují závažné komplikace, které jsou však život ohrožující a dlouhodobé užívání hormonální antikoncepce zvyšuje riziko jejich nástupu. Řadíme sem tromboembolickou nemoc, infarkt myokardu, cévní mozkovou příhodu, hypertenzi, rakovinu jater a cholestatickou žloutenku (Fait, 2008).

Nepříznivý vliv antikoncepce závisí na dávce estrogenu a progesteronu a na jejich poměru. Je prokázáno, že dávky steroidů (hl. estrogenové složky) v orálních kontraceptivech pozitivně korelují s poruchami srážlivosti krve a poruchami glukózového a lipidového metabolismu. COC způsobuje zvýšenou tvorbu prokoagulačních faktorů (fibrinogen) a sníženou tvorbu inhibitorů srážení (antitrombin) (Fait, 2008).

Mechanismus retence tekutin spočívá ve stimulaci renin – angiotensinového systému a aldosteronu estrogení složkou. Byly popsány známé efekty sexuálních steroidů na metabolismus, které mimo stimulace renin – angiotensinového systému, ovlivňují metabolismus sacharidů a snižují sekreci sérového cholecystokininu (Karlson, 1992).

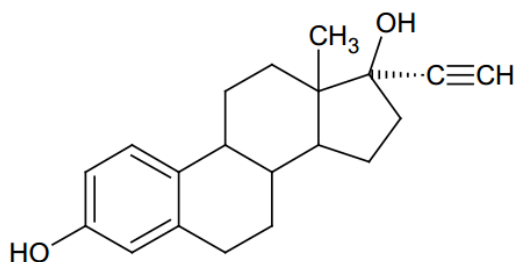
Orální kontraceptiva snižují tok žluči, zároveň zvyšují saturaci cholesterolu ve žluči a také zvyšují poměr kyseliny cholové ke kyselině chenodeoxycholové. Typická cholestáza se rozvíjí během prvních měsíců užívání COC a po vysazení ustupuje do 8 týdnů (Fait, 2008).

## 3.2. Estrogeny

Estrogeny jsou steroidní látky, které v organismu zajišťují hormonální regulaci reprodukčního systému. Kromě estrogenů živočišného původu a syntetických estrogenů, estrogeně působí také vícesytné fenoly rostlinného původu (fytoestrogeny).

Hlavními přirozenými estrogeny jsou estradiol, estron a estriol. Estradiol je hlavním sekrečním produktem vaječnicků a je hlavním lidským estrogenem. Oxidací estradiolu vzniká estron, hydratací estriol. Oba procesy probíhají v játrech, proto jsou játra hlavním místem syntézy těchto látek. Estrogeny se však mohou ještě syntetizovat v dalších periferních tkáních z androstendionu a dalších androgenů. Jde zejména o nadledviny a prsní tkáň, které jsou společně s játry hlavními místy syntézy estrogenů po menopauze (Katzung, 1995).

Zástupcem syntetických estrogenů je ethinylestradiol (viz. **Obrázek č. 3**), který je, jak již bylo předesláno v předcházející kapitole, složkou hormonální antikoncepce a vyskytuje se ve většině perorálně užívaných preparátů.



**Obrázek č. 3 – Schématický vzorec ethinylestradiolu**

(Převzato a upraveno podle Ferrer a Thurman, 2013)

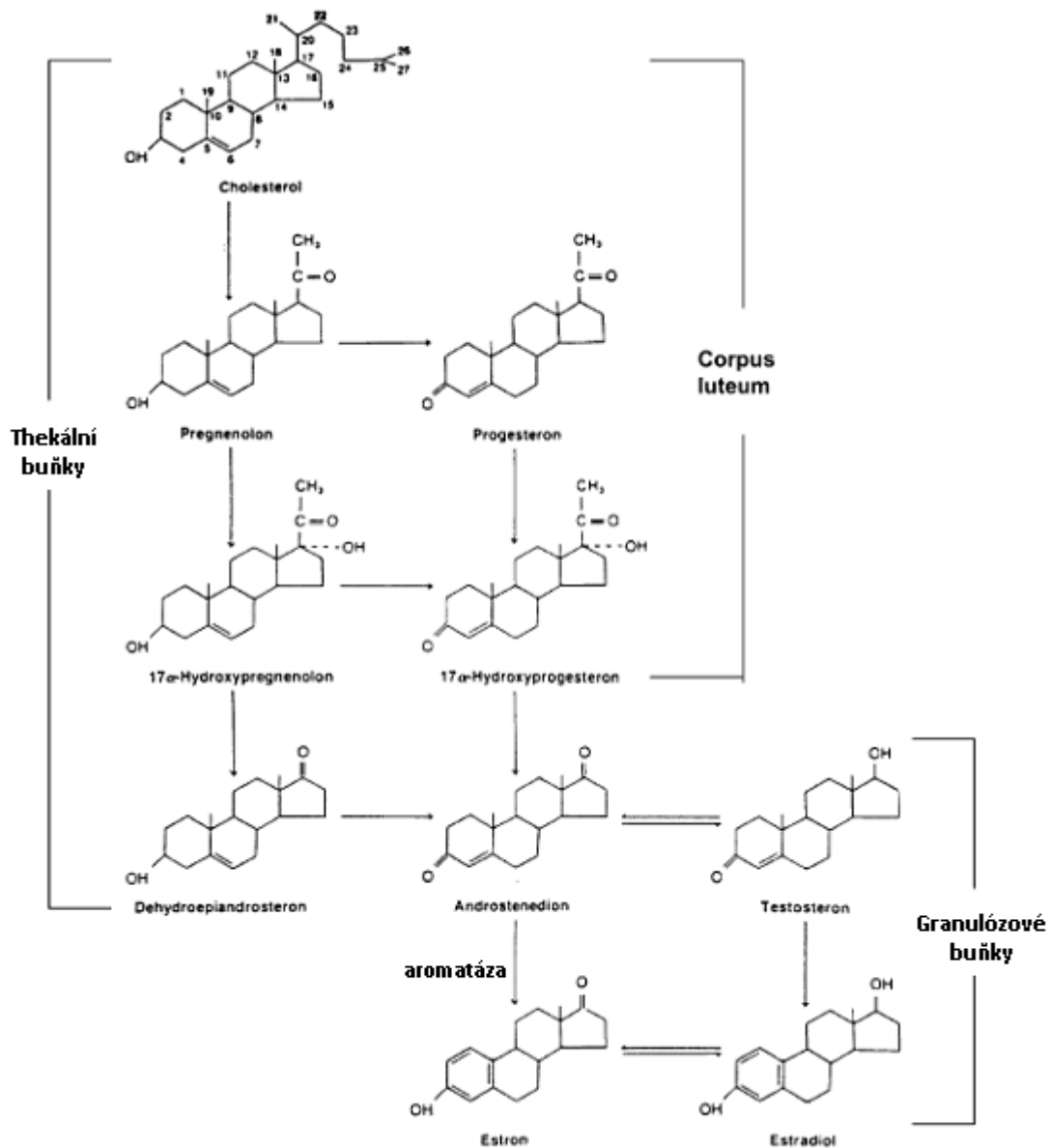
### 3.2.1. Biosyntéza estrogenů

Prekurzorem estrogenů, stejně tak progesteronu a androstendionu (C-19), je pregnenolon vznikající z cholesterolu (C-26). Ze strukturálního hlediska mají estrogeny základní 18-uhlíkatou strukturu s aromatickým kruhem a fenolickou hydroxylovou skupinou na uhlíku C<sup>3</sup> a v případě estradiolu další na C<sup>17</sup>. Estron má jako jediný na C<sup>17</sup> ketonovou skupinu místo hydroxylové (Parl, 2000).

Majoritní biosyntéza estrogenů probíhá v thekálním buňkách ovariálních folikulů v první části menstruačního cyklu. Po ovulaci jsou estrogeny i progesteron syntetizovány granulózovými buňkami žlutého tělíska (viz. **obrázek č. 4**). Plazmatická hladina estradiolu



kolísá během menstruačního cyklu v rozmezí hodnot od 50 pg/ml (183 pmol/l) do 350 - 850 pg/ml (1285 - 3120 pmol/l) (Katzung, 1995).



**Obrázek č. 4 – Hlavní biosyntetická dráha estrogenu ve vaječnících.**

Konverze cholesterolu na pregnenolon je limitujícím krokem steroidogeneze v ovariálních buňkách. Konverze androgenů na estrogeny je katalyzována enzymem aromatázou a probíhá v granulózových buňkách (Převzato z Hall a Philips, 2005).

Regulace biosyntézy je řízena hypothalamem, kde dochází k tvorbě hormonu uvolňujícího gonadopiny (GnRH), který v pulsech stimuluje sekreci hormonu stimujícího folikuly (FSH) a luteinizačního hormonu (LH). Luteinizační hormon působí

na thekální buňky ovariálních folikulů, kde stimuluje syntézu androstendionu. Hormon stimující folikuly působí na granulózové buňky, kde dochází ke konverzi androstendionu na estradiol za působení enzymu aromatázy (viz. **Obrázek č. 4**). Tvorba estradiolu působí negativně zpětnovazebně na nadřazená centra (viz. **Obrázek č. 1**) (Williams a Stancel, 1996).

### **3.2.2. Farmakokinetika estrogenů**

Estradiol má při perorálním podání vysoký efekt prvního průchodu (first pass effect) a biologickou dostupnost 2 – 5 %. Ethinylestradiol je odolnější vůči metabolizaci v játrech a jeho biologická dostupnost činí 40 – 60 % po perorálním podání. Estron a estriol, vznikající metabolizací estradiolu, mají nízkou afinitu k estrogenovým receptorům. Metabolizací estradiolu vzniká významné množství konjugovaných derivátů, které jsou vylučovány žlučí. V tenkém střevě mohou být ale hydrolyzovány a zpětně neabsorbovány. Tato enterohepatální cirkulace zajišťuje převahu jaterních účinků nad účinky v periférii, a tím pádem velký vliv estrogenů na játra, který se může projevit nežádoucími účinky. V krvi jsou estrogeny transportovány navázané na SHBG (globulin vážící sexuální hormony). Estradiol se silně váže na  $\alpha$ 2-globulin a má nízkou afinitu k albuminu. Navázané estrogeny nemohou prostupovat do buněk, takže fyziologicky aktivní je jen volná frakce (Katzung, 1995). Zajímavé je srovnání s progestiny, které jsou druhou složkou hormonální antikoncepce. Progestiny jsou rychle metabolizovány v játrech a nepodléhají enterohepatální cirkulaci (Shenfield, 1993).

Estrogeny interagují s dalšími lékovými přípravky. Inhibitory cytochromu P450 snižují metabolickou degradaci, a tak zesilují účinek estrogenů. Obdobně induktory cytochromu P450 zvyšují degradaci estrogenů, čímž snižují jejich účinek. Hladina estrogenů může být dále ovlivněna v souvislosti s narušením střevní flóry a sníženým množstvím vstřebávání nekonjugovaného EE (např. při užívání některých širokospektrých antibiotik).

### **3.2.3. Fyziologické účinky estrogenů**

Metabolické účinky estrogenů jsou mírně anabolické. Významná je retence vody a sodíku. Dále způsobují zlepšení resorpce vápníku indikací tvorby kalcitriolu a zvýšenou sekrecí kalcitoninu. Zvýšena je také syntéza kolagenu a stimulace osteoblastů. Estrogeny snižují resorpci kostní hmoty snížením aktivity osteoklastů a působení parathormonu, čímž zabraňují osteoporóze.

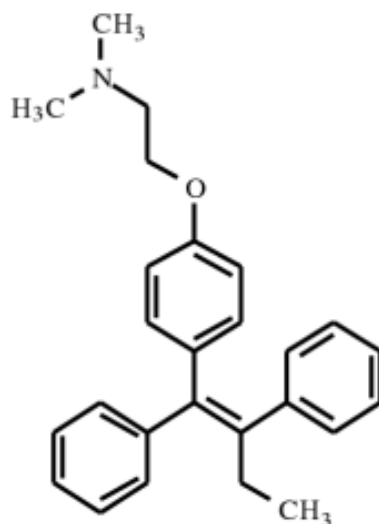
Estrogeny navozují změny ve složení plazmatických lipidů. Zvyšují hladinu lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL) a hladiny plazmatických triacylglyceridů, naopak navozují pokles plazmatických hladin cholesterolu a lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL). Estrogeny vedou ke zvýšení syntézy koagulačních faktorů (jaterního fibrinogenu), a tedy ke zvýšení srážlivosti krve. Dále v játrech mění metabolismus dalších proteinů a ovlivňují aktivitu enzymů vedoucí ke zvýšení cirkulující hladiny globulinu vázajícího tyroxin, globulinu vázajícího pohlavní hormony (SHBG), růstových faktorů a transferinu. Následkem se zvyšuje hladina tyroxinu, estrogeneru, testosteronu, železa a mědi v cirkulaci. Estrogeny snižují motilitu střeva, čímž ovlivňují střevní absorpci. Estrogeny navozují syntézu progesteronových receptorů.

Estrogeny mají důležitou funkci v mnoha částech lidské kůže zahrnující epidermis, dermis, mazové, ekkrinní i apokrinní žlázy. Mají významnou roli v udržení normální struktury kůže, stárnutí kůže, pigmentaci, růstu vlasů a produkci mazu. Estrogeny jsou také podstatné pro správnou funkci krevních cév (Thornton, 2002). Estrogen zvyšuje hladinu TGFβ1 cytokinu a snižuje chemotaxi a adhezi neutrofilů.

Mezi nežádoucí účinky estrogenů patří edémy vzniklé retencí vody a sodíku, napětí prsů, migrenózní bolesti hlavy, hyperpigmentace, tvorba žlučových kamenů, cholestáza, hyperkoagulace – trombotické stavy, růst hormonálně dependentních nádorů. Vztah mezi výskytem karcinomu prsu a terapií estrogeny je stále předmětem výzkumu, neboť dosavadní výsledky jsou rozporuplné (Feigelson a Henderson, 1996; Chen a kol., 2006; Groenendijk a kol., 2013). Avšak dle International Agency for Research on Cancer (IARC) jsou provedené experimenty na zvířatech dostatečným důkazem kancerogenního vlivu estrogenů (IARC, 1979). Dlouhodobé vystavení estrogenům vede k abnormální hyperplazii endometria, pokud není koordinováno progesterony. Pokud jsou estrogeny podávány v těhotenství, mohou mít teratogenní vliv (Katzung, 1995).

#### **3.2.4. Inhibitory estrogenů**

Inhibitorem neboli antiestrogenem je tamoxifen (viz. **Obrázek č. 5**), látka nesteroidní struktury s výraznou afinitou k estrogenovým receptorům. Tamoxifen má nízkou vnitřní aktivitu a inhibuje estrogeny mechanismem kompetitivního antagonismu. Tamoxifen se využívá v léčbě karcinomu prsu u žen v menopauze, k indukci ovulace při sterilitě a k léčbě autoimunitní estrogenové dermatitidy (Schillinger a Oettel, 1999). Inhibice estrogenů může být také dosaženo inhibicí aromatázy, čímž bude zamezeno konverzi androstendionu na estradiol.



Tamoxifen

**Obrázek č. 5 – Schématický vzorec tamoxifenu**

(Převzato a upraveno podle Rahman a Reitz, 2005)

**3.2.5. Estrogenové receptory**

**3.2.5.1. Jaderné receptory**

Estrogeny vstupují do buněk, kde se váží na cytoplazmatické estrogenové receptory. Estrogenové receptory (ER) patří do superrodiny jaderných receptorů pro steroidní a thyroïdní hormony, vitamín D3 a kys. retinovou (Evans, 1988). Vzniklý komplex se váží na adekvátní místa genů v jádře – estrogen responsivní jednotky (Estrogen Response Elements; EREs), čímž ovlivňuje genovou transkripci. Fyziologické účinky vyvolané estrogeny tak mohou být způsobeny přímými důsledky zvýšené proteosyntézy nebo také projevem parakrinního působení, které je závislé na růstových faktorech a cytokinech uvolněných sousedními buňkami.

V případě nepřítomnosti ligandu je ER asociován s inhibičním Heat Shock Proteinem (HSP 90) v cytoplasmě (Sanchez a kol., 1990). Po navázání ligandu na receptor dochází ke konformační změně vedoucí k disociaci HSP, tvorbě komplexu ligand-receptor a vytvoření dimeru ER (Kumar a Chambon, 1988). Tyto ligandem aktivované dimery se translokují do jádra a asociují se specifickou sekvencí DNA neboli s EREs, kde fungují jako transkripční faktory. EREs se skládají z 15 párů bází palindromicky umístěných v regulační oblasti cílového genu. Komplex steroidního receptoru interaguje s dalšími

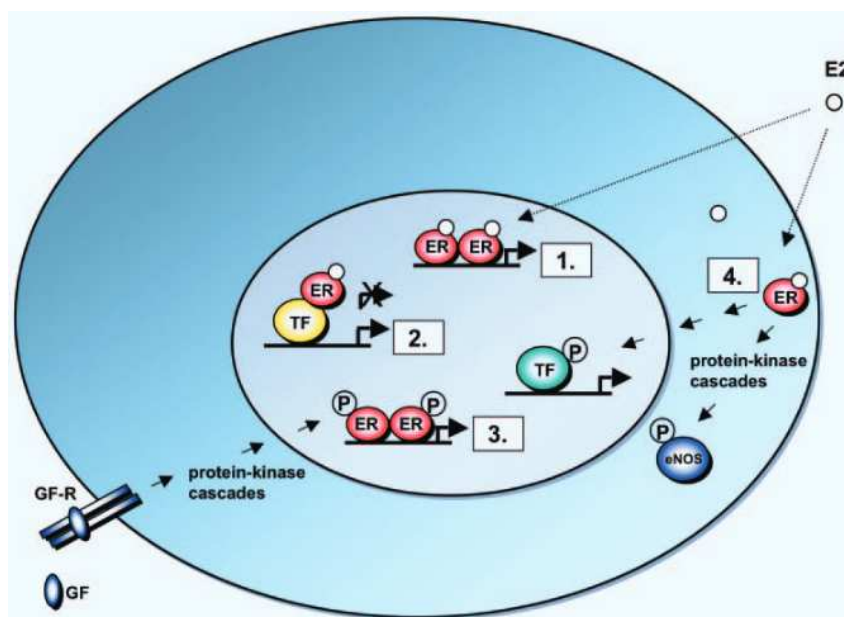
buněčnými komponenty a aktivuje či potlačuje transkripci cílového genu v promotoru (Tora a kol., 1989).

Estrogenové receptory byly objeveny v 60. letech 20. století. Green a kol. (1986) klonovali jako první estrogenový receptor (ER), který je dnes označován jako ER $\alpha$ . Později Kuiper a kol. (1996) objevili další estrogenový receptor, ER $\beta$ . Geny pro ER $\beta$  jsou u člověka lokalizovány na chromozomu 14 a pro ER $\alpha$  na chromozomu 6 (Enmark a kol., 1997). Oba receptory mají stejnou afinitu k estradiolu (Kuiper a kol., 1997), ale rozdílnou afinitu k EREs (Hyder a kol., 1999). ER $\alpha$  se vyskytuje převážně v reprodukčních tkáních, hlavně v thekálních buňkách, prsní tkáni, kardiovaskulárním systému, kostech, játrech, adipocytech a v různých oblastech mozku. Vedle toho se ER $\beta$  nalézá opět v reprodukčních tkáních, ale spíše v granulózových buňkách, v plicích, žlučníku, kardiovaskulárním systému, nadledvinách, ledvinách, brzlíku, kůži a v různých oblastech mozku (Couse a kol., 1997; Dahlman-Wright, 2006). Rozdílná exprese ER receptorů v různých tkáních poukazuje na jejich rozdílnou roli. Navíc mohou heterodimerizovat. Existuje také několik tkáňově specifických izoform ER, které vznikají alternativním sestřihem (Cowley a kol., 1997).

Estrogenový receptor se skládá z funkčně odlišných domén. Doména vázající DNA je nutná pro vazbu na EREs, zatímco doména vázající ligand zajišťuje jadernou lokalizaci, dimerizaci a transkripční aktivaci (Giguere a kol., 1998).

Mnoho genů je indukováno estrogeny bez přítomnosti EREs, např. epidermální růstové faktory. Komplex ligand – receptor může genomicky působit nezávisle na EREs, a to vazbou protein – proteinovými interakcemi na transkripční faktor na promotoru a ovlivněním transkripce genů. Další mechanismus genomického působení ER je nezávislý na ligandu. V tomto případě dochází k aktivaci signální kaskády růstovými faktory, což vyústí ve fosforylaci a aktivaci ER a EREs (El-Tanani a Green, 1997).

Estrogeny mohou také ovlivnit buňku mechanismy nezahrnujícími genovou expresi/transkripci přes aktivaci cytoplazmatických signálních drah jako je Src/Shc/ERK. Tito druzí poslí jsou aktivováni mnoha transmembránovými tyrosinkinázovými receptory pro růstové faktory, jejichž aktivaci mohou právě estrogeny zesilovat (Kousteni a kol., 2001). Všechny způsoby působení estrogenových receptorů přehledně shrnuje následující **obrázek č. 6**.



**Obrázek č. 6 – Schematická ilustrace signálního mechanismu estrogenových receptorů:** **1.** Klasický mechanismus působení estrogenových receptorů. Vazba komplexu ligand-receptor na EREs v promotoru cílových genů; **2.** Genomické působení nezávislé na EREs. Vazba komplexu ligand-receptor na transkripční faktor v promotoru cílových genů; **3.** Genomické působení nezávislé na ligandu. Růstové faktory aktivují signální kaskádu vedoucí k fosforylaci a aktivaci ER na EREs; **4.** Negenomické působení. Komplex ligand-receptor aktivuje signální dráhy vedoucí k regulaci genové exprese přes fosforylaci a aktivaci transkripčních faktorů (TF) (Převzato z Björnström a Sjöberg, 2005).

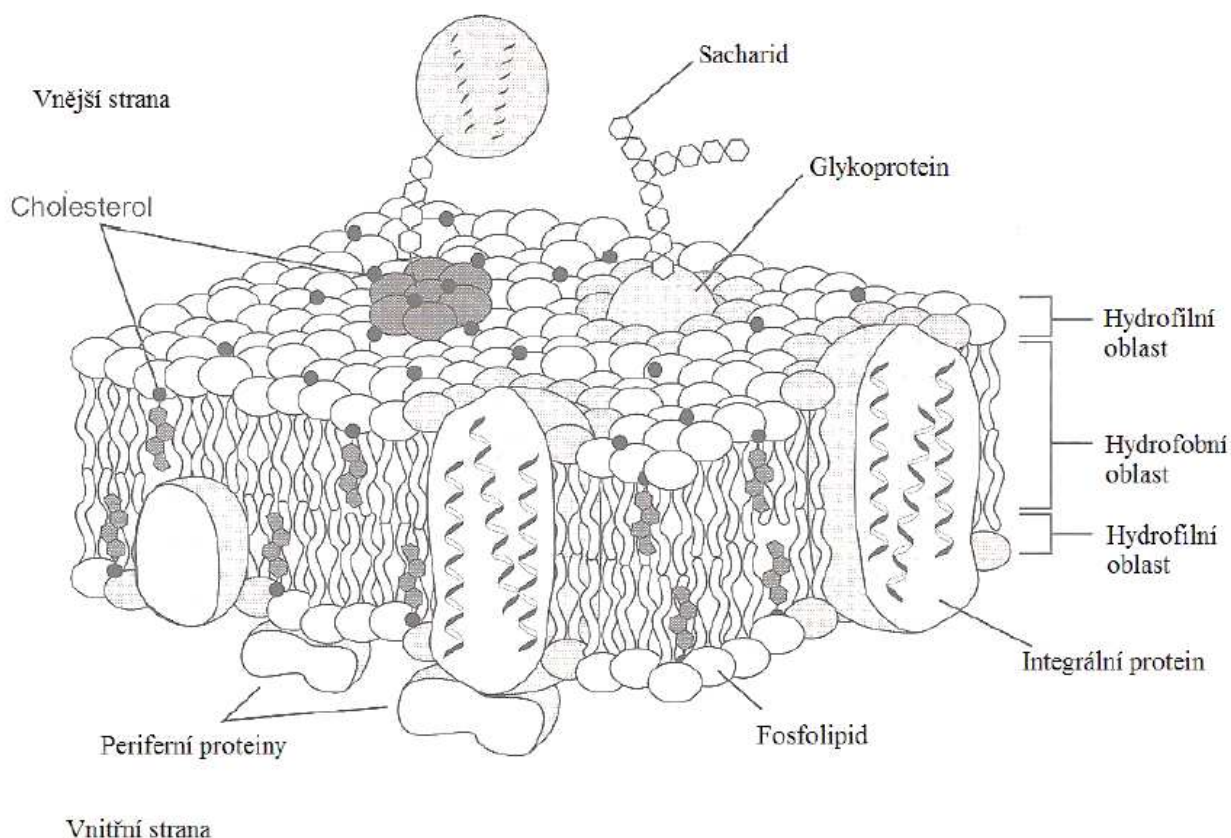
### 3.2.5.2. Membránové receptory

Estrogenový receptor vázaný na membránu je označován jako GPER1. Jde o receptor spřažený s G-proteiny, který má 7 transmembránových segmentů. Jeho kódující gen se nachází na krátkém raménku chromozomu – 7p22 (Carmeci a kol., 1997). Expze GPER1 zvyšuje účinek estrogenů v buňkách neexprimujících cytosolické ER (Thomas a kol., 2005). U GPER1 knock-outovaných myší byla pozorována zhoršená činnost thymu, tolerance glukózy a byl omezen růst kosti. GPER1 také hraje roli v regulaci buněčné proliferace (Prossnitz a Barton, 2009). Aktivace GPER1 receptorů zprostředkovaně neovlivňuje pouze genovou expresi, ale současně vede k aktivaci řady kináz, zejména MAPK kaskády (MAPK, Mitogen Activated Protein Kinases). Dochází také k stimulaci fosfolipázy C (PLC), aktivaci vápníkového toku, syntéze cAMP a I<sub>3</sub>P, vedoucí ke stimulaci proteinkinázy C (PKC) a proteinkinázy A (PKA) (Levin, 2002).

### 3.3. Plazmatická membrána

Buněčné membrány jsou důležitou dynamickou strukturou, která ohraničuje buňky a zároveň se účastní buněčného transportu, signalizace, energetického metabolismu a dalších buněčných pochodů nezbytných pro jejich správnou funkci. Základní strukturou buněčných membrán je dvojvrstva protilehle umístěných amfipatických molekul lipidů (viz. **Obrázek č. 7**). Jedním z klíčových modelů biologických membrán se stal model tekuté mozaiky, který popisuje lipidovou dvojvrstvu společně s integrálními a periferními proteiny včetně asymetrie složení obou vrstev (Singer a Nicolson, 1972).

Plazmatická membrána je selektivně propustná pro ionty a organické látky, čímž reguluje jejich transport přes membránu. Přenos látek může probíhat pasivně či aktivně. Mezi pasivní transport řadíme usnadněnou difúzi a osmózu, které probíhají ve směru koncentračního gradientu. Aktivní transport vyžaduje spotřebu energie, neboť probíhá proti směru koncentračního gradientu. Tento druh transportu je zprostředkován přes iontové kanály, přenašeče a pumpy (Sperelakis, 2012).



**Obrázek č. 7 – Struktura plazmatické membrány eukaryotické buňky**

(Převzato a upraveno podle Dowhan a Bogdanov, 2002)

### 3.3.1. Membránové lipidy

Membránové lipidy jsou amfipatické molekuly. Hydrofobní řetězce nasycených nebo nenasycených mastných kyselin tvoří hydrofobní vnitřní vrstvu membrány. Hydrofilní část tvoří polární hlavička, která je zastoupena cholinem, serinem, ethanolaminem nebo inositolem připojeným k fosfátové skupině, a která je v kontaktu s vodním extracelulárním prostředím. Nejdůležitějšími membránovými lipidy jsou glycerofosfolipidy, sfingolipidy a steroly, z posledně jmenovaných zejména cholesterol. Lipidové zastoupení v obou vrstvách membrány je výrazně asymetrické. Vnější list tvoří převážně fosfatidylcholin společně se sfingolipidy, zejména sfingomyelinem. V cytosolickém listu membrány se nachází fosfatidylserin, fosfatidylethanolamin a fosfoinositol. Cholesterol je obsažen v obou listech membrány zhruba podobně.

Cholesterol je převážně hydrofobní, avšak přítomnost jedné hydroxylové skupiny s hydrofilním charakterem mu dává amfipatické vlastnosti. Cholesterol ovlivňuje strukturní i fyzikální vlastnosti membránové dvojvrstvy, kde je lokalizován mezi řetězci mastných kyselin fosfolipidů. Sterolové jádro snižuje pohyblivost fosfolipidů ve svém bezprostředním okolí, čímž snižuje fluiditu membrány, neboli zvyšuje rigiditu membrány. Membrány s vyšším obsahem cholesterolu se vyznačují nižší propustností, větší tloušťkou membránové dvojvrstvy, těsnějším uspořádáním fosfolipidů a vyšší rigiditou. Vliv cholesterolu na receptor může být obecně přímý a nepřímý. Přímým vlivem se rozumí vazba cholesterolu na receptor, která má za následek konformační změnu receptoru. Nepřímým vlivem je myšlena změna v membránovém složení (Burger a kol., 2000).

Fluidita membrány je funkcí teploty a zastoupení alkylových řetězců. Fluidita roste úměrně s teplotou, se zvyšujícím se počtem nenasycených či rozvětvených řetězců a se zkracující se délkou alkylových řetězců mastných kyselin. Specifické protein-lipidové interakce závisí na chemické a strukturální anatomii lipidů (délnka alkylového řetězce, stupeň saturace, chiralita atp.) a jsou nezbytné pro správnou funkci membránových proteinů. Tyto vlastnosti lipidů ovlivňují fluiditu, tloušťku a tvar membránových struktur (Dowhan a Bogdanov, 2002).

### 3.3.2. Membránové proteiny

Membránové proteiny zajišťují transport látek a komunikaci buňky s okolním prostředím. Hrají zásadní roli v signalizaci, transportu iontů, endocytóze, buněčné adhezi a dalších buněčných procesech. Membránové proteiny dělíme na periferní a integrální.



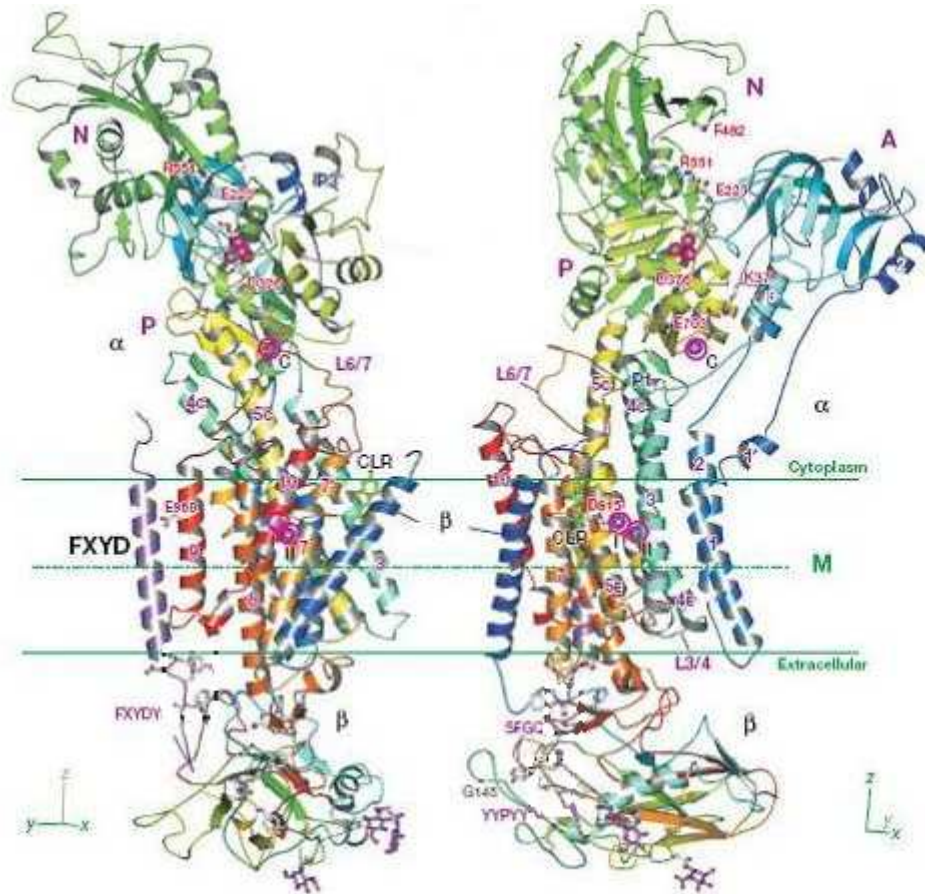
Periferní membránové proteiny jsou připojeny k membráně pomocí lipidových a terpenových kotev, posttranslačním připojením mastné kyseliny nebo nekovalentní vazbou na integrální proteiny. Vedle toho integrální membránové proteiny procházejí membránou (transmembránové proteiny) nebo jsou do ní částečně zanořeny. Průchod membránou vyžaduje energeticky výhodné rozložení aminokyselin tak, aby bylo v souladu s hydrofobní a hydrofilní vrstvou membrány. Z hlediska sekundární struktury jde o  $\alpha$ -helix či  $\beta$ -list. Transmembránové proteiny se účastní transportních mechanismů, a to jako membránové receptory, pumpy, kanály nebo přenašeče. Pole působnosti těchto proteinů je nezměrné a z toho důvodu jim byla ponechána celá následující kapitola, která se zaměřuje na jednu z nejběžnějších membránových pump živočišných buněk -  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázu (Sperelakis, 2012).

### 3.4. $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ - ATPáza

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPáza (E.C. 3.6.1.3) je sodíkem a draslíkem aktivovaná, na hořečnatých iontech závislá a ouabainem inhibovatelná adenosintrifosfát hydroláza (Skou, 1957). Sodno-draselná pumpa (viz. **Obrázek č. 8**) patří do skupiny transportních bílkovin plazmatické membrány, které se označují jako přenašečové adenosintrifosfatázy, neboli ATPázy (Skou a Esmann, 1992). Mezi nejdůležitější dvě rodiny ATPáz patří  $\text{F}_0\text{F}_1$  ATPázy a P – ATPázy. Protonové  $\text{F}_0\text{F}_1$  ATPázy fungují zpravidla jako ATP syntázy a vyskytují se ve vnitřní mitochondriální membráně, plazmatické membráně bakterií a v membránách thylakoidů. Vedle toho P – ATPázy fungují zpravidla jako ATP hydrolázy a řadíme sem  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPázu endoplazmatického retikula a plazmatické membrány,  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázu vyskytující se v žaludku a střevě a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPázu, která je přítomna v plazmatických membránách všech živočišných buněk (Glynn, 1985, Lingrel a Kuntzweiler, 1994). Mezi transmembránovými sekvencemi  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPázy existuje přibližně 40% podobnost (Ogawa a Toyoshima, 2002). Mezi tkáně s největším výskytem  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy patří mozek (Sweadner, 1979), vnější dřevě ledvin, elektrická tkáň úhoře, rektální žláza máčky skvrnitě a solná žláza mořských ptáků (Post a kol., 1964).

#### 3.4.1. Funkce $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ - ATPázy

Sodno-draselná pumpa se účastní aktivního transportu sodných a draselných iontů přes plazmatickou membránu. K překonání koncentračního gradientu iontů a jejich následnému transportu je využita energie pocházející ze štěpení molekul ATP. Transport iontů je v podstatě transformací energie, získané hydrolýzou ATP do energie elektrochemického gradientu, která vzniká na základě nerovnoměrného rozložení iontů na obou stranách membrány. Transport iontů je elektrogenní – při rozštěpení 1 molu ATP přejdou přes membránu směrem ven z buňky 3 ionty sodné a směrem dovnitř 2 ionty draselné. Výsledkem transportu je zvyšování negativního buněčného potenciálu, vysoká nitrobuňková koncentrace draselných iontů a relativně nízká koncentrace iontů sodných (Thomas, 1972). Odhaduje se, že přibližně 23 % spotřeby ATP u člověka je využito na činnost této pumpy (Lingrel a Kuntzweiler, 1994).



**Obrázek č. 8 – Stužkový diagram architektury  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy**

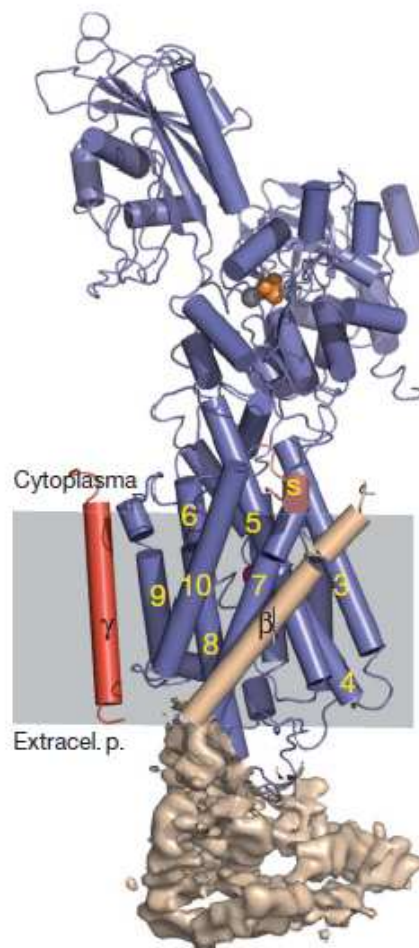
Amino-konec  $\alpha$ - i  $\beta$ -podjednotky je znázorněn modře, karboxylový konec červeně. Barva se postupně duhovitě mění od N-konce po C-konec. Podjednotka  $\gamma$  je zobrazena fialově.

(Převzato a upraveno podle Shinoda a kol., 2009)

Enzym se vytvářením elektrického gradientu podílí na udržování klidového membránového potenciálu (zejména transportem  $\text{K}^+$  iontů). Rovněž je základním regulačním enzymem vzrušivých tkání, neboť svou činností hyperpolarizuje nervové buňky neboli vyrovnává gradient iontů na membráně po proběhnutém akčním potenciálu (Thomas, 1972; Post a kol., 1972). Dále se enzym podílí na osmotické regulaci buňky, čímž současně zajišťuje regulaci buněčného objemu. Gradient sodných iontů je využit k řadě transportních procesů, zejména k importu glukózy a aminokyselin do buňky (Glynn 1985; Lingrel a Kuntzweiler, 1994). Svalová kontraktilita je ovlivněna činností  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy, která je úzce spojena s činností  $\text{Na}^+$ /  $\text{Ca}^{2+}$  - přenašeče. V ledvinách je  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPáza lokalizována na bazolaterální membráně epitelových buněk, kde se podílí na reabsorpci sodných iontů a zajišťuje tak kontrolu buněčného objemu a krevního

tlaku. Sodno-draselná pumpa se tak účastní velmi podstatných fyziologických pochodů, jako je renální reabsorpce sodných iontů, svalová kontraktilita a neuronální excitabilita. Pumpa je nezbytnou součástí transcelulárních transportních procesů zejména ve střevě, žlázách a ledvinách (Jorgensen a kol., 2003).

Transport iontů a sloučenin je umožněn cestou sekundárního aktivního transportu. Sekundární aktivní transport je v podstatě pasivní transport ve směru koncentračního gradientu, neboť ten je vytvořen činností sodno-draselné pumpy, jakožto primárního aktivního transportéru. Enzym také funguje jako významný signální přenašeč regulující celou řadu signálních kaskád od stimulace Src kinázy po spuštění MAPK dráhy (Xie a Askari, 2002).



**Obrázek č. 9 – Struktura Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy**

Podjednotka α je znázorněna fialově, β béžově a γ červeně.

(Převzato a upraveno podle Morth a kol., 2007)

Ke správné aktivitě enzymu je nezbytná přítomnost membránových lipidů, jejichž odstranění vede k inaktivaci enzymu, ale po zpětném přidání se aktivita enzymu obnovuje (Ottolenghi, 1979). Minimálně 40 molekul cholesterolu a 50 molekul fosfolipidů je schopno zajistit ATPázovou aktivitu. Dále je požadována přítomnost fosfolipidů se záporným nábojem, např. fosfatidylinositolu (Cornelius a Skou, 1984), či fosfatidylserinu a fosfatidylglycerolu (Kimmelberg a Papahadjopoulos, 1972).

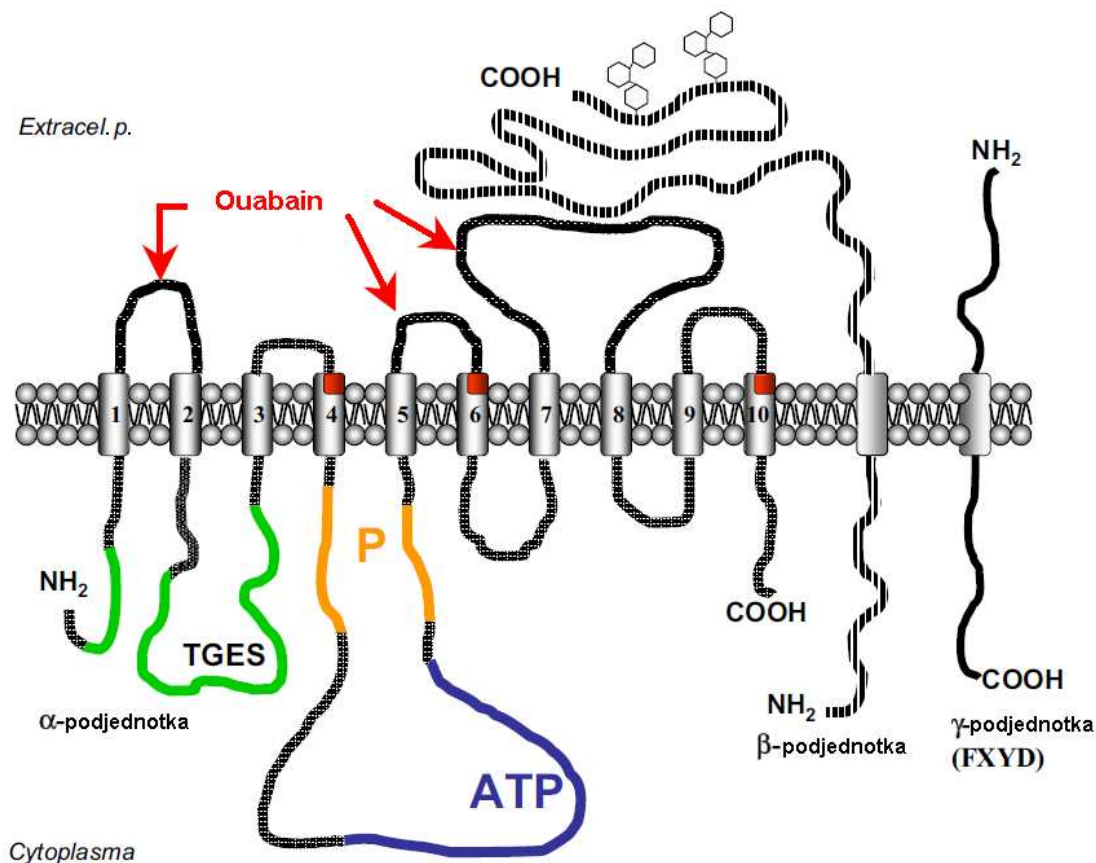
### 3.4.2. Struktura $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ - ATPázy

Sodno-draselná pumpa je integrálním oligomerním proteinem skládajícím se ze 3 podjednotek (viz. **Obrázek č. 9**). Transmembránová část ATPázy typu P se odlišuje od iontových kanálů absencí otevřeného transportního kanálu vyplněného vodou. Tento rozdíl poukazuje na odlišnost mezi aktivním a pasivním transportem iontů (Jorgensen a kol., 2003).

Model krystalu se skládá z aminokyselinových zbytků 19 – 1016 pro podjednotku  $\alpha$  (kompletní C-konec 998 zbytků), 28 – 73 zbytků  $\beta$ -podjednotky (46 zbytků tvoří transmembránový segment) a 23 – 51 zbytků  $\gamma$ -podjednotky. Asymetrické jednotky krystalové mřížky se skládají z dimeru  $\alpha\beta\gamma$ -podjednotek, které jsou ve vzájemném kontaktu v oblasti A domén.  $\alpha$ -podjednotky se nikterak nedotýkají v transmembránové části.  $\beta$ -podjednotky se dotýkají v transmembránovém úseku, avšak tato interakce neexistuje v nativních membránách (Morth a kol., 2007).

#### 3.4.2.1. Podjednotka $\alpha$

Podjednotka  $\alpha$  o molekulové váze 110 kDa je tvořena deseti transmembránovými segmenty (dále  $\alpha\text{TM}$ ). Velká část  $\alpha$ -podjednotky je exponována do intracelulárního vodného prostředí a jen malá část komunikuje s extracelulárním prostorem (viz. **Obrázek č. 10**). Podjednotka  $\alpha$  obsahuje katalytické centrum enzymu, a to v hydrofilní části exponované do intracelulárního prostoru. Na extracelulární straně obsahuje vazebná místa pro sodné ionty a kardiotonické steroidy a na intracelulární straně pro ATP a draselné ionty. Alfa podjednotka je tím pádem aktivní podjednotkou a zajišťuje hydrolýzu ATP a stejně tak i vazbu monovalentních iontů (Lingrel, 1992).



**Obrázek č. 10 – Struktura Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy**

Na obrázku je patrná struktura  $\alpha$ -podjednotky skládající se z 10 transmembránových helixů. Červeně jsou znázorněna extracelulární vazebná místa pro ouabain, která se skládají z extracelulárních smyček mezi segmenty TM1-2, 5-6, 7-8 a transmembránových úseků TM4, 6 a 10. Vazebné místo pro ATP je na intracelulární smyčce TM4-5 a je znázorněno modře. Fosforylační doména P, vyobrazena oranžově, je lokalizována na proximální a distální části intracelulární smyčky TM4-5. Zeleně znázorněná doména A, speciálně její TGES motiv, je tvořena NH<sub>2</sub>-koncem a intracelulární smyčkou TM2-3. Dále je vyobrazena podjednotka  $\beta$  včetně glykosylace. Extracelulární část  $\beta$ -podjednotky interaguje s extracelulární smyčkou mezi segmenty TM7-8  $\alpha$ -podjednotky. V pravé části obrázku je také zobrazena podjednotka  $\gamma$  (Převzato a upraveno podle Bagrov a kol., 2009)

Podjednotka  $\alpha$  je tvořena 3 doménami v cytoplazmatické části – N, A, P (Jorgensen a kol., 2003). Doména N obsahuje vazebné místo pro nukleotid – ATP. Vazebné místo pro ATP se nachází na cytoplazmatické smyčce mezi segmenty  $\alpha$ TM4 a  $\alpha$ TM5 (Croyle a kol., 1997). Doména A je výkonnou doménou, která po fosforylaci mění konformaci a umožňuje přístup iontů. Je tak zodpovědná za defosforylační krok cyklu a je tvořena

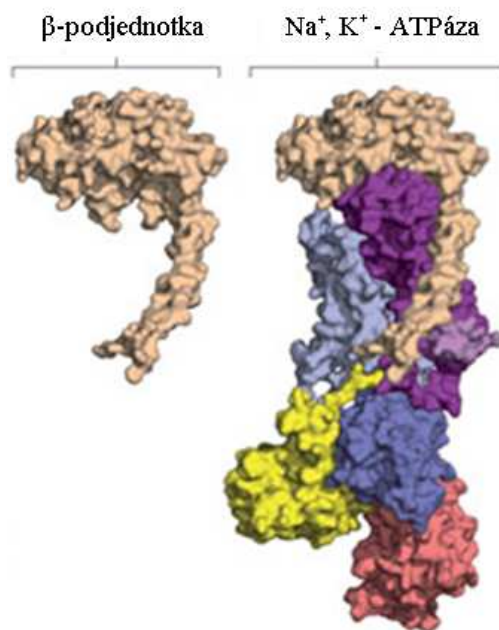
NH<sub>2</sub>-koncem a intracelulární smyčkou mezi segmenty  $\alpha$ TM2 a  $\alpha$ TM3 (Bagrov a kol., 2009). Zároveň je také nejmenší cytoplazmatickou doménou  $\alpha$ -podjednotky a je v těsném kontaktu s N doménou, neboť jsou oddělené pouhým jediným solným můstkem (Shinoda a kol., 2009). Doména P na intracelulární smyčce  $\alpha$ TM4 a  $\alpha$ TM5 obsahuje fosforylační místo, které obsahuje Asp<sup>710</sup>, který je nezbytný pro vazbu Mg<sup>2+</sup> a fosforylaci E<sub>1</sub>P konformace Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy (Penderson a kol., 2000). Karboxylový konec  $\alpha$ -podjednotky zasahuje mezi transmembránové helixy a je pokládán za regulační element kontrolující afinitu sodíkových iontů, který je pravděpodobně ovlivněn membránovým potenciálem.

Vazebná místa pro sodné ionty se nachází mezi transmembránovými segmenty TM4, TM5, TM6, TM8 a TM9 (Ogawa a Toyoshima, 2002), pro draselné ionty mezi transmembránovými helixy TM4, TM5 a TM6. Transmembránové helixy  $\alpha$ TM4 a  $\alpha$ TM6 jsou ve svém středu odvinuty a vytváří tak prostor pro ionty (Morth a kol., 2007). Poziční změny P domény, vzhledem k  $\alpha$ TM4 a  $\alpha$ TM5 během změn konformačních stavů E1 a E2, ovlivňují vzdálenosti mezi aminokyselinovými zbytky regulujícími transport kationtů. Těmito změnami dochází k adaptaci vazebných míst selektivních pro Na<sup>+</sup> ionty na vazebná místa pro vazbu K<sup>+</sup> iontů (Jorgensen a kol., 1997).

#### 3.4.2.2. Podjednotka $\beta$

$\beta$ -podjednotka je glykoprotein o molekulové váze 30 - 60 kDa podle stupně glykosylace v různých tkáních (Blanco a Mercer, 1998). Skládá se z jednoho transmembránového segmentu ( $\beta$ TM) a velké extracelulární části připojené na vrchol extracelulární části  $\alpha$ -podjednotky.  $\beta$ -podjednotka má regulační funkci a je zásadní pro transport K<sup>+</sup> iontů (Lutsenko a Kaplan, 1993). Funguje také jako chaperon stabilizující správné složení polypeptidu  $\alpha$  a jeho transport k plazmatické membráně (Chow a Forte, 1995). Podjednotce  $\beta$  je přičítán vliv na transport draselných iontů, protože její extracelulární část zakrývá extracelulární smyčky mezi segmenty  $\alpha$ TM5-6 a  $\alpha$ TM7-8 způsobem podobným víčku, jak je zobrazeno na **obrázku č. 11** (Lutsenko a Kaplan, 1993).  $\beta$ -podjednotka je připojena k  $\alpha$ -podjednotce přes  $\alpha$ TM7 a  $\alpha$ TM10. Podjednotka  $\beta$  prochází membránou pod úhlem 45° a vytváří tak přímý kontakt s  $\alpha$ TM7 a  $\alpha$ TM10.  $\beta$ TM je nejbližší  $\alpha$ TM7 a  $\alpha$ TM10 se dotýká pouze v blízkosti extracelulárního konce (Morth a kol., 2007).





**Obrázek č. 11 – Struktura  $\beta$ -podjednotky a její interakce s podjednotkou  $\alpha$**

(Převzato a upraveno z Morth a kol., 2010)

#### 3.4.2.3. Podjednotka $\gamma$

Jako podjednotka  $\gamma$  jsou označovány malé membránové proteiny rodiny FXYD (Sweadner a Rael, 2000), zejména prvně objevený FXYD2 dominantně exprimovaný v ledvinách (Mercer a kol., 1993), které mají regulační funkci pro transport iontů a jsou koexprimovány s podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta$ . Není integrální součástí sodno-draselné pumpy, avšak je s ní asociována a moduluje katalytické vlastnosti enzymu (Bagrov a kol., 2009). Tento protein je tvořen jedním transmembránovým segmentem s C-koncem umístěným do cytosolu. Skládá se z přibližně 30 aminokyselin s převážně helikální strukturou (Morth a kol., 2007). Všechny FXYD proteiny obsahují konzervovanou sekvenci 6 aminokyselin zahrnující FXYD motiv na extracelulárním  $\text{NH}_2$ -konci, k tomu 2 glycinové a 1 serinový zbytek v transmembránové části (Crambert a Geering, 2003). Molekulová váha  $\gamma$ -podjednotky činí 8 - 14 kDa a vyznačuje se vysokým stupněm mezidruhové homologie (Blanco a Mercer, 1998). Extracelulární část  $\gamma$ -podjednotky je v kontaktu s  $\beta$ -podjednotkou. K  $\alpha$ -podjednotce je  $\gamma$ -podjednotka připojena přes  $\alpha\text{TM9}$  (Morth a kol., 2007). Interakce FXYD proteinů s  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotkami enzymu nezpůsobuje žádnou změnu v jejich expresi, jako je tomu u některých hormonů, ale modifikuje jejich transportní činnost způsobem tkáňově specifickým (Geering, 2006). Na základě



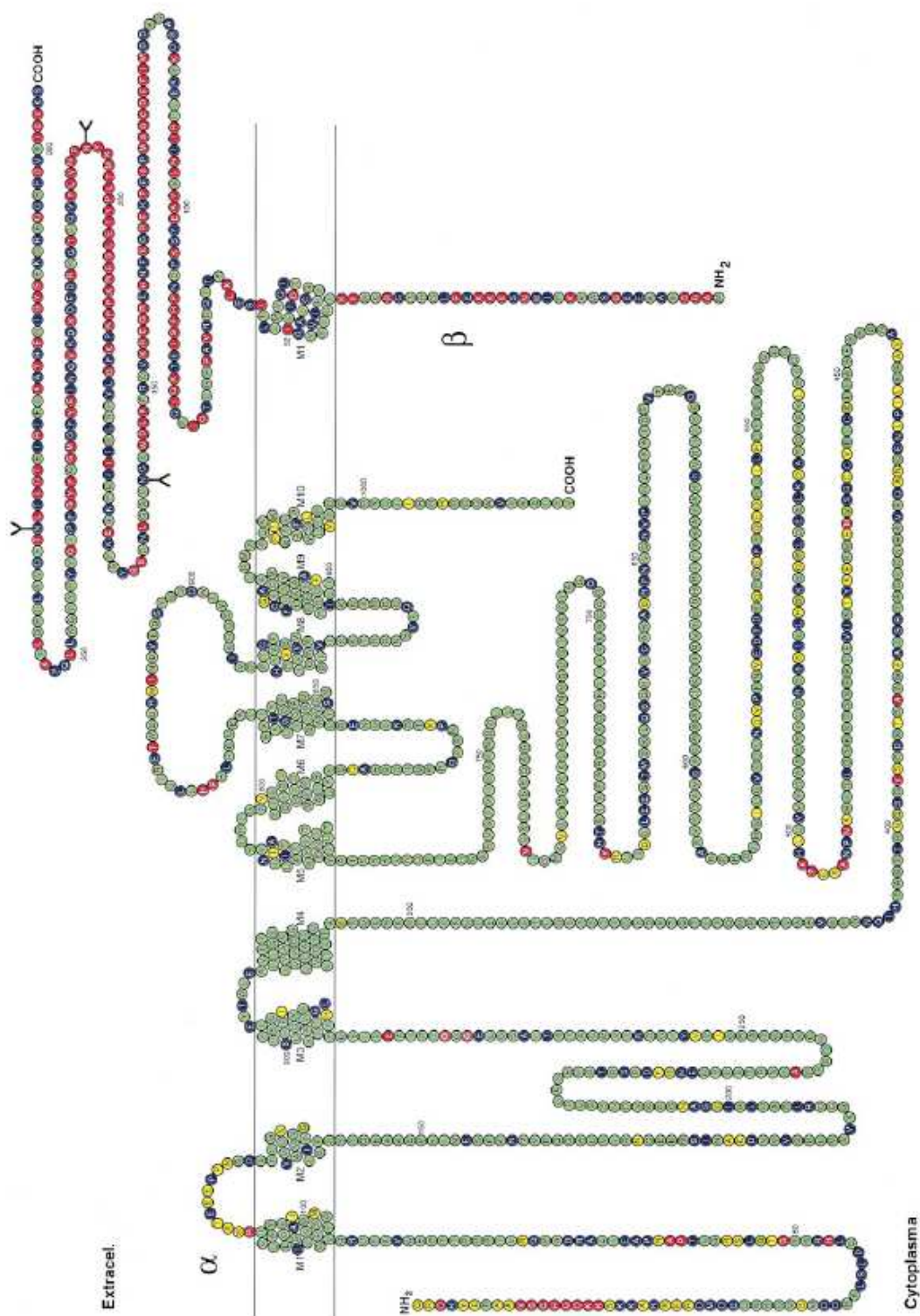
denaturačních experimentů bylo zjištěno, že FXVD2 interaguje s transmembránovými segmenty  $\alpha$ TM8 – 10 (Donnet a kol., 2001).

### 3.4.3. Izoformy $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ - ATPázy

Byly identifikovány 4 izoformy  $\alpha$ -podjednotky a 3 izoformy  $\beta$ -podjednotky  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy. Jejich kombinacemi vzniká řada různých izozymů  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy, které jsou v tkáních exprimovány v různém zastoupení (viz. **Obrázek č. 12**). Tato skutečnost vysvětluje tkáňovou specifitu  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy a rozdílnou citlivost ke kardiotonickým steroidům (Sweadner, 1979; Jorgensen a kol., 2003). Za izoformy citlivé k ouabainu jsou považovány  $\alpha 2$  a  $\alpha 3$ , málo senzitivní je  $\alpha 1$ . Exprese izoforem  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy závisí na vývojovém stupni, stejně tak na hormonální regulaci, přičemž může být ovlivněna onemocněním organismu. V souvislosti s poslední zmiňovanou závislostí byl sledován vztah exprese izoforem k hypertrofii myokardu (Charlemagne a kol., 1994).

Izoforma  $\alpha 1$  je hlavní izoformou exprimovanou v ledvinách (Skou a Esmann, 1992). Komplex  $\alpha 1\beta 1$  se nachází v každé tkáni a často je majoritní formou enzymu (Lingrel, 1992). Izoforma  $\alpha 2$  je exprimována v srdci, mozku, kosterních svalech, adipocytech a kostech. Izoforma  $\alpha 3$  je exprimována většinou ve vzrušivých tkáních a srdci (Blanco a Mercer, 1998). Izoforma  $\alpha 4$  se vyskytuje pouze ve varlatech (Shamraj a Lingrel, 1994).

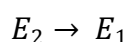
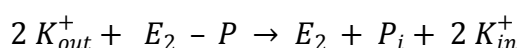
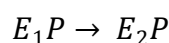
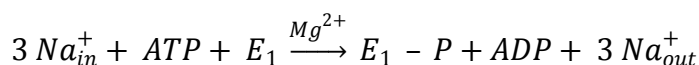
Izoforma  $\beta 2$  je přítomna v kosterním svalstvu, epifýze a nervových tkáních, zatímco  $\beta 3$  se objevuje ve varlatech, retině, játrech a plicích (Blanco a Mercer, 1998).



**Obrázek č. 12 – Schém a membránové topologie  $\alpha$ - a  $\beta$ -izoforn  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPázy.** Znázměna je sekvence  $\alpha$ 1- a  $\beta$ 1-izoforn z potkana. Aminokyselínové zbytky jsou vybarveny podle stupně homologie mezi izofornami  $\alpha$  ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4) a  $\beta$  ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3). Zelená barva značí absolutní shodu, modrá větší novou, žlutá částečnou a červená žádnou. Převzato a upraveno podle Blanco a Mercer, 1998.

### 3.4.4. Katalytický cyklus Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy

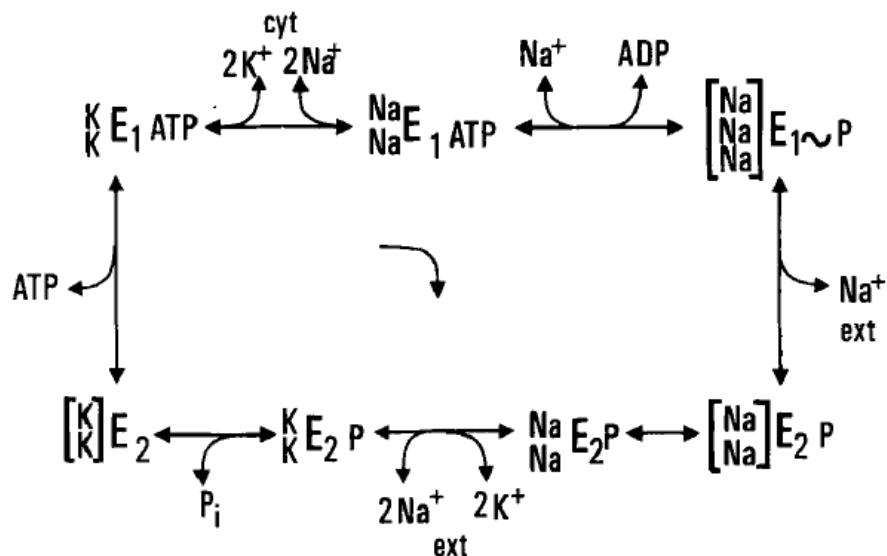
Katalytickou činnost Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy lze popsat jako cyklicky sprzęžený proces Na-dependentní fosforylace a K-dependentní defosforylace enzymu (viz. **Obrázek č. 13**). V první fázi se sodné ionty na vnitřní straně membrány váží na enzym v konformaci E<sub>1</sub>. Posléze vzniká za přítomnosti ATP intermediát E<sub>1</sub>-ATP-Na. Následně dochází k rozštěpení ATP a vzniku fosforylovaného intermediátu E<sub>1</sub>-P-Na, který prochází rychlou změnou konformace, při které uvolní navázané sodné ionty do extracelulárního prostoru. Tato vysokoenergetická E<sub>1</sub>P forma enzymu je následována nízkenergetickým E<sub>2</sub>P stavem. Přítomnost draselných iontů katalyzuje defosforylaci enzymu, dochází k uvolnění anorganického fosfátu a vzniku intermediátu E<sub>2</sub>-K. Tento intermediát po interakci s nitrobuněčným ATP, které navozuje konformační přeměnu E<sub>2</sub>-E<sub>1</sub>, uvolňuje draslík na vnitřní straně membrány. Poté vzniká intermediát E<sub>1</sub>-ATP, který opět váže sodné ionty a cyklus se uzavírá. Výsledkem tohoto cyklu je transport 3 Na<sup>+</sup> iontů ven z buňky, 2 K<sup>+</sup> iontů do buňky a hydrolýza jedné molekuly ATP (Post a kol. 1972). Pro přehlednost slouží následující rovnice:



(Převzato a upraveno podle Post a kol., 1972)

Konformace E<sub>1</sub> a E<sub>2</sub> se liší orientací a specifitou pro Na<sup>+</sup> a K<sup>+</sup> ionty. Přizpůsobení se kationtového místa z E<sub>2</sub>-2K formy specifické pro K<sup>+</sup> na E<sub>1</sub>-ATP formu specifickou pro Na<sup>+</sup> je doprovázeno změnami počtu a vzdáleností koordinačních skupin navázaných kationtů. Otáčení a naklánění intramembránových helixů přizpůsobuje vazebná místa. V konformaci E<sub>2</sub>-2K je jejich rozmístění vhodné pro navázání 2 dehydrovaných K<sup>+</sup> iontů za současné orientace do extracelulárního prostoru. V konformaci E<sub>1</sub>-ATP umožňuje geometrie helixů navázání 3 dehydrovaných Na<sup>+</sup> iontů a orientaci do cytoplasmy.

Kationtová specifita dvou konformačních stavů je odvoditelná z afinity pro dané ionty v cytoplazmatické a extracelulární části (Jorgensen a kol, 2003).



Obrázek č. 13 – E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub> katalytický cyklus Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPázy

Základní schéma cyklu podle Albers-Post.

(Převzato z Jorgensen a kol., 1997)

Tento proces je základní a fyziologicky nejvýznamnější činností Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy. Za abnormální situace v iontových koncentracích může enzym fungovat i jiným způsobem. V nepřítomnosti extracelulárního draslíku probíhá Na<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> výměna, která vyžaduje přítomnost ATP a ADP, avšak nevyžaduje hydrolýzu ATP. Na<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> výměna může probíhat dalším odlišným způsobem závislým na hydrolýze ATP, který je inhibován přítomností ADP a je elektrogenní, neboť za každou hydrolyzovanou molekulu ATP jsou přeneseny 3 Na<sup>+</sup> ven z buňky a 2 Na<sup>+</sup> do buňky. V tomto případě se 2 Na<sup>+</sup> ionty přenášené do buňky pravděpodobně váží do míst pro transport K<sup>+</sup> iontů. Dalším atypickým příkladem transportu je reverzní děj probíhající v nepřítomnosti extracelulárního K<sup>+</sup>, kdy je transportován Na<sup>+</sup> dovnitř a K<sup>+</sup> vně za současné syntézy ATP z intracelulárního ADP+Pi (Glynn a Karlish, 1975).

### 3.4.5. Inhibitory Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy

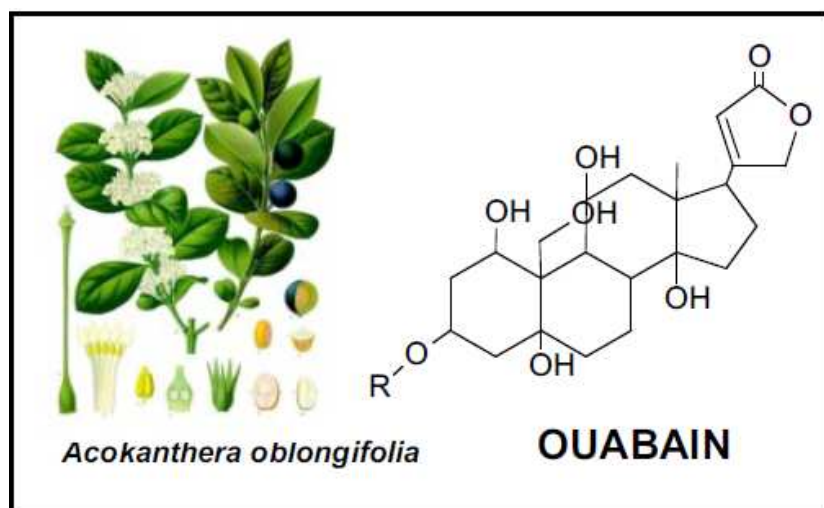
Jednou z důležitých vlastností Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy je její schopnost specificky vázat kardioaktivní glykosidy, zejména ouabain, který inhibuje její sodno-draselný aktivní transport (Sweadner, 1979). Kardioaktivní glykosidy (např. strofantin, strofantidin,

ouabagenin atd.) jsou skupinou přírodních alkaloidů s klinicky velmi významným efektem na myokard. Jejich vliv lze popsat jako pozitivně inotropní (zvýšení síly stahu) a chronotropní (zvýšení frekvence stahu). Podstatou mechanismu tohoto vlivu je ovlivnění  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -přenašeče, který je v těsné spolupráci s  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPázou, která je ouabainem inhibovatelná. Specifita inhibice  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPázy je velmi výrazná, neboť na jiné membránové ATPázy či buněčné enzymy obecně nepůsobí (Forbush, 1983). Kardioaktivní steroidy inhibují  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPázu snížením rozdílu mezi konformačními energiemi fosforylované a defosforylované formy enzymu.

#### 3.4.5.1. Ouabain

Nejpoužívanějším kardioaktivním glykosidem je hydrofilní **ouabain** (g-strophanthin). Ouabain je obsažen v semenech *Strophantus gratus* a listech a kůře *Acokanthera oblongifolia*. Struktura ouabainu se skládá z pětičlenného laktonového kruhu, steroidního jádra s pěti hydroxylovými skupinami a rhamnózového zbytku (viz. **Obrázek č. 14**).

Vazebné místo pro ouabain (viz. **Obrázek č. 15**) se skládá z extracelulárních smyček mezi segmenty  $\alpha\text{TM}1-2$ ,  $\alpha\text{TM}5-6$ ,  $\alpha\text{TM}7-8$  a transmembránových úseků  $\alpha\text{TM}4$ ,  $\alpha\text{TM}6$  a  $\alpha\text{TM}10$  (Bagrov a kol., 2009). Většina těchto segmentů,  $\alpha\text{TM}5-7$  (Croyle a kol., 1997) tvoří též vazebná místa pro kationty, takže je možné, že ouabain přímo blokuje přístup iontů k jejich vazebným místům (Reyes a Gatsby, 2006). Oba koncové úseky  $\alpha$ -podjednotky, C- i N-konec, jsou úseky určující senzitivitu k ouabainu. Nejvýznamnější jsou úseky  $\alpha\text{TM}1-2$  a  $\alpha\text{TM}4-8$ . Další úseky určující citlivost k ouabainu jsou lokalizovány na  $\alpha\text{TM}4$ ,  $\alpha\text{TM}10$  a na cytoplazmatické smyčce mezi  $\alpha\text{TM}4$  a  $\alpha\text{TM}5$  segmentem. Mezidruhovou specifitu zajišťuje extracelulární smyčka mezi  $\alpha\text{TM}1$  a  $\alpha\text{TM}2$  (Croyle a kol., 1997). Vazba ouabainu probíhá se stechiometrií 1:1, tedy jedna molekula  $\alpha$ -podjednotky  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPázy váže jednu molekulu ouabainu. Pro vazbu je nezbytná přítomnost  $\text{Mg}^{2+}$  iontů a fosforylace enzymu (Post a kol., 1964).  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPáza je tedy vždy  $\text{K}^+$  senzitivní v E2-P konformaci. Vazba ouabainu nikterak nemodifikuje fosforylační místo, ale stabilizuje enzym v konformaci E<sub>2</sub>P (Laursen a kol., 2013).

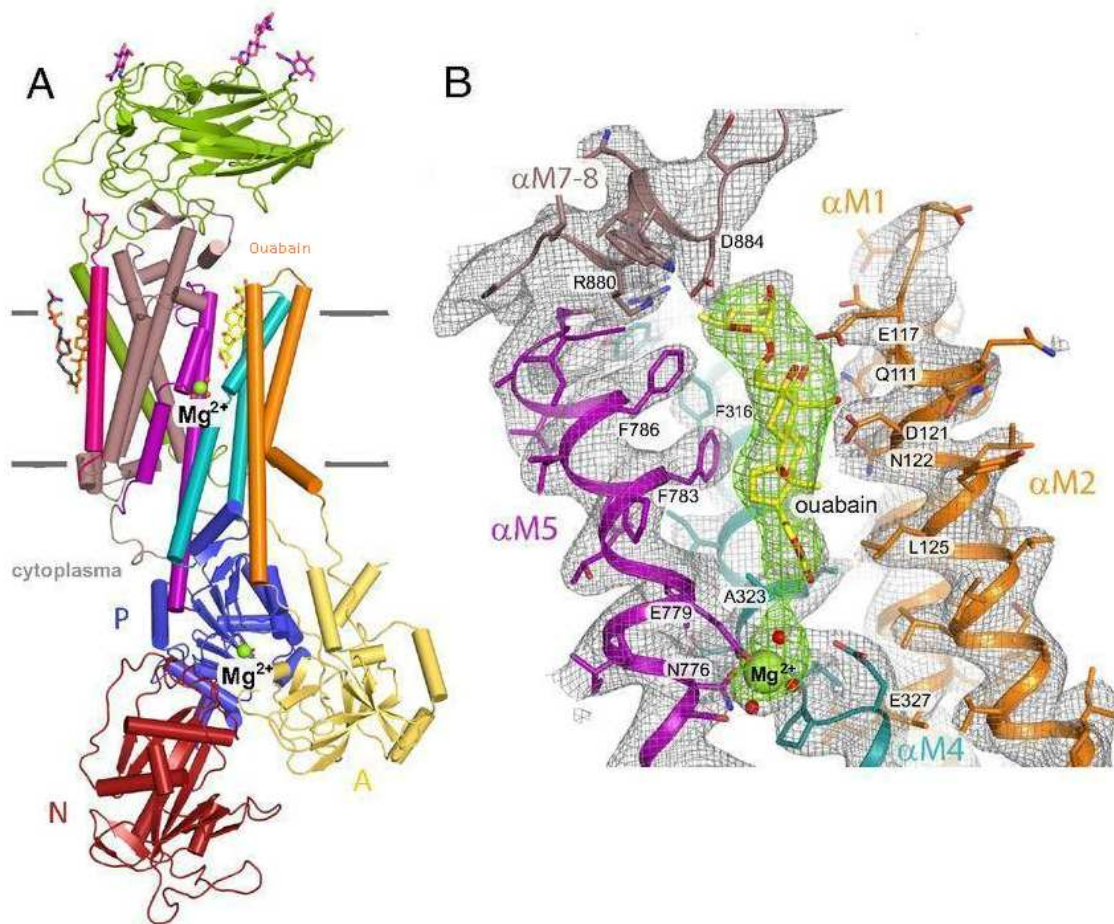


**Obrázek č. 14 – Strukturní vzorec ouabainu**

(Převzato a upraveno podle Bagrov a kol., 2009)

Podle recentních výsledků existují dvě vazebná místa pro ouabain na  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPáze. Nízkoafinní vazebné místo se vyskytuje uvnitř iontového póru, jehož umístění bylo určeno rentgenovou krystalografií (Ogawa a kol., 2009). Vedle tohoto vazebného místa se ještě vyskytuje vysokoafinní místo, uložené hlouběji v póru. Je pravděpodobné, že se ouabain váže nejprve do nízkoafinního místa a až poté se naváže do vysokoafinního (Sandtner a kol., 2011). Podle Sandtner a kol. (2011) je molekula ouabainu umístěna laktonovým kruhem vně, avšak podle Laursen a kol. (2013) je umístěna laktonovým kruhem směrem dolů, zatímco rhamnózový zbytek je lokalizován směrem k extracelulárnímu prostředí a je lemován polárními aminokyselinovými zbytky (Laursen a kol., 2013). Orientace molekuly ouabainu ve vazebném místě je tak stále předmětem diskuze a experimentů. Zajímavé je, že vazebné místo pro ouabain na  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPáze vykazuje sekvenční podobnost s vazebným místem steroidních receptorů (Tanenbaum a kol., 1998).





**Obrázek č. 15 – Struktura  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy včetně navázaného ouabainu a vazebné místo pro ouabain** A) Vysokoafinní komplex  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPáza  $\text{E}_2\text{P}$  – ouabain. Na obrázku jsou znázorněny domény  $\alpha$ -podjednotky – doména N červeně, A žlutě a P modře. Molekula ouabainu je vyobrazena žlutě B) Detail vazebného místa pro ouabain. Ouabain znázorněn žlutě. Na obrázku je také zobrazen hořčnatý iont a 3 molekuly vody nezbytné pro správnou vazbu (Převzato a upraveno podle Laursen a kol., 2013)

#### 3.4.5.2. Vazba ouabainu

Z experimentálního hlediska existují **2 základní typy ouabainové vazby** (Forbush, 1983). Za přítomnosti ATP se měří tzv.  $\text{ATP}+\text{Mg}^{2+}+\text{Na}^+$  dependentní vazba (forward) a za přítomnosti anorganického fosfátu se měří  $\text{Mg}^{2+}+\text{Pi}$  dependentní vazba (backward). V obou případech je pro vazbu ouabainu nezbytná přítomnost hořčnatých iontů (Post a kol., 1964). V prvním případě  $\text{ATP}+\text{Mg}^{2+}+\text{Na}^+$  dependentní vazby, vzniká  $\text{E}_2\text{-P}$  konformace přirozeným způsobem, tedy fosforylací z ATP. Vazba je zvyšována přítomností  $\text{Na}^+$  iontů a ouabain se váže s vysokou afinitou. Fosforylaci  $\text{E}_2\text{-P}$  intermediátu lze navodit rovněž reakcí v opačném sledu (backdoor fosforylace), kdy při velmi vysoké

koncentraci anorganického fosfátu v inkubačním mediu lze obrátit hydrolýzu E<sub>2</sub>-P intermediátu a fosforylovat Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázu na nízkoenergetické hladině s pomocí Pi.

Draselné ionty byt' jen v minimální koncentraci blokují vazbu ouabainu (Baker a Willis, 1972). Mechanismem této inhibice je defosforylace E<sub>2</sub>-P intermediátu, katalyzovaná K<sup>+</sup> ionty. Sodné ionty ve velmi vysokých koncentracích (100mM) inhibují Mg+Pi dependentní typ ouabainové vazby. Rozdílné působení sodných iontů na oba typy ouabainové vazby je vysvětlováno pomocí vysoko a nízko afinitních míst pro sodné ionty na molekule Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy (Forbush, 1983). Inhibice vazby ouabainu draselnými ionty je také možná z důvodu těsného kontaktu vazebných míst pro ouabain a pro K<sup>+</sup> ionty (Ogawa a kol., 2009), protože vazbu ouabainu také inhibuje obecně přítomnost monovalentních kationtů na transportních místech pro kationty.

Disociační konstanta K<sub>i</sub> (tj. rovnovážná disociační konstanta kompetujícího ligandu) je pro ouabainovou inhibici řádově v rozmezí 10<sup>-7</sup> – 10<sup>-5</sup> M. Konkrétní hodnota se silně liší v závislosti na původu a čistotě enzymového preparátu. Ouabain indukuje heterogenní inhibici Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy, kde se hodnoty K<sub>i</sub> pohybují od 0,1 μM v mozku do 100 μM v ledvinové tkáni (Marks a Seeds, 1978).

Při porovnání specifické vazby ouabainu s aktivitou Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy v různých tkáních je patrná nápadná podobnost mezi specifickou aktivitou Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy a velikostí vazby ouabainu (Baker a Willis, 1972).

Citlivost sodno-draselné pumpy k ouabainu je ovlivněna dalšími mechanismy. Určité peptidické hormony a neurotransmitery stimulují proteinkinázy PKA a PKC, které následně fosforylují α-podjednotku Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy tkáňově specificky, podle typu izofomy. Působením proteinkináz jsou ovlivněny transportní vlastnosti Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy a její distribuce na plazmatické membráně (Férraille a Doucet, 2001) včetně sensitivity k ouabainu. Aldosteron a thyroïdní hormony ovlivňují transkripci genů kódujících α a β podjednotku Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy. Důsledkem tohoto vlivu je zvýšená exprese podjednotek enzymu (Forbush a kol., 1978; Férraille a Doucet, 2001).



### 3.5. Fyziologický vliv ethinylestradiolu

Většina publikovaných experimentů sledující vliv ethinylestradiolu probíhala v rozmezí 1 – 7 dní, ethinylestradiol byl rozpuštěn v propylenglykolu a denně subkutánně injikován experimentálním zvířatům, což byli v převážné většině potkani (Reichen a Paumgartner, 1977; Davis a kol., 1978; Bossard a kol., 1993; Kitani a Zs-Nagy, 1996).

Koncentrace ethinylestradiolu byla v mnoha případech 5 mg/kg váhy potkana (Reichen a Paumgartner, 1977; Davis a kol., 1978; Keefe a kol., 1979; Bossard a kol., 1993; Kitani a Zs-Nagy, 1996). Tato dávka je velmi vysoká a mnohem vyšší než dávka obsažená v antikoncepčních preparátech, kde je přibližně 1 µg/kg váhy člověka.

#### 3.5.1. Vliv na hmotnost jater a celkovou hmotnost

Působení farmak na organismus se odráží na mnoha faktorech. Jedním z nejnanežněji určitelných je změna váhy, a to jak celkové, tak jednotlivých orgánů. Jelikož jsou játra orgánem, kde probíhá většina biotransformačních a detoxikačních procesů, bývají často výrazně ovlivněny v souvislosti s podáním nejrůznějších farmak.

Pětiddenní podávání ethinylestradiolu (5mg/kg) způsobilo nárůst váhy jater (Rosario a kol., 1988; Kitani a Zs-Nagy, 1996) o 67 % (Bossard a kol., 1993) a signifikantně snížilo tělesnou váhu potkanů (Rosario a kol., 1988) o 11,5 % (Keefe a kol., 1979). Již po jednom dni podávání ethinylestradiolu se objevil nápadný nárůst poměru hmotnosti jater a celkové hmotnosti, který byl po 5 dnech umocněn úbytkem na váze (Kitani a Zs-Nagy, 1996).

Denní dávky ethinylestradiolu o koncentraci 0,5 mg/kg váhy potkana podávané subkutánně po dobu 7 dní způsobily výrazný nárůst váhy jater (21%), jejíž příčinou byla parenchymální hyperplazie. Zaznamenán byl také nárůst obsahu DNA (32 %), RNA (33 %) a proteinů (14 %) v játrech svědčící o zvýšené buněčné replikaci. Tělesná hmotnost zůstala nezměněna od počátku pokusu, ale oproti kontrolám se snížila, neboť kontrolním potkanům mezitím stoupla váha o 10 %. Negativní vliv na játra roste lineárně podle logaritmičky se zvyšujících se dávek. Příčinnou vlivu na játra ale nebyl pokles příjmu potravy u exponované skupiny, jak potvrdila kontrolní pair-fed skupina zvířat. Pair-feeding je experimentální metoda, ve které je množství potravy podávané zvířatům limitováno a je synchronizováno s příjmem potravy experimentálních skupin, čímž je vyloučen vliv rozdílného množství přísunu potravy (Ochs a kol., 1986).

### **3.5.2. Vliv na morfologii tkání a buněčných organel**

Ethinylestradiol způsobuje u mladých potkanů změny v morfologii jater, čímž vážně ovlivňuje jejich funkci (Kitani a Zs-Nagy, 1996). Vznik tumoru jater u potkanů, kterým byl dlouhodobě podáván ethinylestradiol, souvisí s kancerogenním působením této látky. Samice potkana byly exponovány různým dávkám ethinylestradiolu, včetně dávky obsažené v preparátech hormonální antikoncepce, která je přibližně 1 µg/kg (Ochs a kol., 1986).

Dále se objevily změny v počtu a struktuře jader buněk ledvin a jater, akumulace lysosomů, změna struktury mitochondrií a hladkého endoplazmatického retikula. Následně také změna aktivity ledvinových enzymů, poukazující na možné metabolické poruchy na buněčné úrovni. Nebyly však prokázány žádné morfologické změny na ledvinách (Nowaczyk-Dura a Czekaj, 1998).

### **3.5.3. Vliv na funkci jater a tok žluče**

Cholestáza označuje poruchu vylučování žluči do duodena. Žluč je isoosmotická tekutina, která obsahuje vodu, elektrolyty, žlučové kyseliny, bilirubin, cholesterol, fosfolipidy, mastné kyseliny a proteiny. Žlučové kyseliny jsou syntetizovány v hepatocytech z cholesterolu. Ethinylestradiol inhibuje syntézu lipoproteinů a žlučových kyselin (Davis a kol., 1978). Primární žlučové kyseliny (kyselina cholová a chenodeoxycholová) jsou konjugovány s glycinem nebo taurinem za vzniku sodných či draselných solí, které jsou vyloučeny do žluče. Hepatocyty sekretují žluč částečně v závislosti na exkreci žlučových kyselin a částečně nezávisle na ní. Tento druhý způsob sekrece je méně významný než ten první a je zajištěn osmotickou hnací silou organických látek, zejména glutationu (Erhmann a kol., 2010).

Denně se vytvoří 900 ml žluči v těle člověka. Přibližně polovina jaterní žluči se odděluje do žlučníku, kde dochází ke zpětné resorpci vody a ke zvýšení koncentrace hlavních složek žluči. V případě intrahepatální cholestázy dochází k narušení transportního systému v hepatocytech, a to na jejich sinusoidální membráně, na úrovni intracelulárního transportu a na úrovni exkrece látek přes membránu kanalikulu. Cholestatická játra jsou zvětšená. Dochází v nich k hepatocelulárnímu poškození, které je pravděpodobně dáno zvýšenou koncentrací žlučových kyselin a dalších toxických produktů. Jejich vyšší koncentrace vede ke zvýšení kyslíkových radikálů a následné apoptóze či v horším případě nekróze (Erhmann a kol., 2010). Mezi léky, které jsou příčinou rozvoje cholestázy u lidí

a laboratorních zvířat, patří některá antibiotika, anabolické steroidy, chlorpromazin a hormonální antikoncepce obsahující ethinylestradiol (Plaa a Priestly, 1976).

Klinické studie potvrzují, že podávání ethinylestradiolu snižuje tok žluči (Reichen a Paumgartner, 1977), způsobuje supersaturaci žluči cholesterolem a snižuje její kapacitu pro exkreci organických aniontů. Toto zjištění částečně vysvětluje vyšší riziko onemocnění žlučníku u žen užívajících perorální hormonální antikoncepci obsahující ethinylestradiol (Bennion a kol., 1980).

Denní dávka ethinylestradiolu (5 mg/kg váhy) podávaná potkanům po dobu 5 dní snížila tok žluči (Davis a kol., 1978; Keeffe a kol., 1979; Kitani a Zs-Nagy, 1996). Zaznamenán byl pokles o 35 % (Reichen a Paumgartner, 1977) a 40 % (Bossard a kol., 1993), včetně 70% poklesu sérového cholesterolu (Bossard a kol., 1993).

#### **3.5.4. Vliv na aktivitu Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy**

Pětidenní podávání ethinylestradiolu o koncentraci 5 mg/kg způsobilo snížení aktivity Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy o 43 % (Reichen a Paumgartner, 1977), o 26 % (Keeffe a kol., 1979) a 50 % (Davis a kol., 1978) oproti kontrolním zvířatům. Nižší dávky ethinylestradiolu (0,01 mg/kg) obdobně snížily aktivitu Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy (Rosario a kol., 1988).

Ethinylestradiol způsobuje mírný pokles exprese proteinů o 10 % a aktivity Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy na 90 %. Tyto výsledky - snížení o 10 % v proteinové expresi a aktivity enzymu - jsou ale nesignifikantní (Landmann a kol., 1998). Podobné nesignifikantní výsledky byly publikovány v práci Bossarda a kol., 1993. Naproti tomu byla signifikantně snížena aktivita Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy v jaterním homogenátu na 28 % a sinusoidálních (laterálních) membránách hepatocytů na 32 % (Rosario a kol., 1988).

Snížená aktivita Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy může být výsledkem snížené funkce enzymů nebo jejich sníženým počtem. Avšak počet jednotek enzymu není pravděpodobně ovlivněn ethinylestradiolem (Simon a kol., 1996), jak bylo potvrzeno vazebnými studii s [<sup>3</sup>H]ouabainem, když byly z assaye odstraněny sodné i draselné ionty, čímž byla zajištěna ouabainová inhibice celkové aktivity enzymu (Davis a kol., 1978). Stejných výsledků bylo dosaženo ve studii membrány erytrocytů, kde aktivita Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy byla snížena, avšak počet vazebných míst pro [<sup>3</sup>H]ouabain byl nezměněn (Reichen a Paumgartner, 1977). Studie plazmatické membrány hepatocytů využívající metody vazebných pokusů s [<sup>3</sup>H]ouabainem ukazuje, že působením ethinylestradiolu nedochází ke změně počtu jednotek enzymu. Proto snížení aktivity Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy nastává

důsledkem změn struktury plazmatické membrány (lipidové složení) a snížení její fluidity (Davis a kol., 1978).

Oproti tomu estradiol, přirozený estrogen, stimuluje aktivitu  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy. V příkladném experimentu byla použita koncentrace estradiolu 100 ng/ml a jako plazmatické membrány byly použity membrány erytrocytů (Golden a kol., 1999). V dalším experimentu byl experimentálním zvířatům podáván estradiol o koncentraci 0,5 mg/kg a jako experimentální vzorek byly použity membrány srdeční sarkolemy (Džurba a kol., 1997).

### **3.5.5. Vliv na aktivitu dalších enzymů**

Dlouhodobé (6 měsíců – 36 cyklů) perorální podávání nízkých dávek antikoncepčních steroidů potkanům v různých poměrech, které odpovídaly dávkám použitým v antikoncepčních preparátech, vedlo ke snížení aktivity sukcinyldehydrogenázy, NADPH-tetrazolium reduktázy,  $\text{Mg}^{2+}$  - ATPázy a alkalinfosfatázy v ledvinách. NADPH-tetrazolium reduktáza je v endoplazmatickém retikulu donor elektronů monooxygenázového systému, který je zodpovědný za metabolizaci xenobiotik a steroidních hormonů. V mitochondriích je aktivita NADPH-tetrazolium reduktázy odrazem míry oxidačně – redukčních procesů. Snížená aktivita  $\text{Mg}^{2+}$  - ATPázy a alkalinfosfatázy je následkem snížené produkce energie, což odráží snížená aktivita sukcinyldehydrogenázy, nebo indikuje poškození mitochondriálních membrán (Nowaczyk-Dura a Czekaj, 1998).

Dále bylo naopak zaznamenáno zvýšení laktát dehydrogenázy, acidfosfatázy a glukóza-6-fosfatázy v ledvinách. Tyto změny vypovídají o inhibici oxidačních procesů asociovaných s mitochondriálním elektronovým transportem, o kompenzačním nárůstu anaerobních procesů a glukoneogeneze, o inhibici transportních procesů a zvýšeném buněčném katabolismu (Nowaczyk-Dura a Czekaj, 1998).

### **3.5.6. Vliv na plazmatickou membránu**

Fluidita membrány je dána poměrně velkou škálou faktorů, které ji ovlivňují. Hlavními determinanty membránové fluidity jsou teplota, obsah cholesterolu a složení mastných kyselin. Velký význam se také se přikládá obsahu sfingomyelinu. Vlastnosti membrány, a tedy i fluidita, jsou klíčové pro správnou funkci membránových proteinů a správný průběh dějů odehrávajících se na membráně, které ovlivňují intracelulární procesy a mají tak dopad na celou buňku. Změna membránové fluidity po podávání

ethinylestradiolu je přičítána změně lipidového složení membrány, přesněji nárůstu cholesterolu a esterů cholesterolu (Davis a kol., 1978; Keeffe a kol., 1979).

Podávání ethinylestradiolu způsobilo v několika případech nárůst hladiny cholesterolu. Provedení nejrozšířenějšího modelu experimentu, tedy denní dávky ethinylestradiolu (5 mg/kg váhy potkana) po dobu 5 dní, zaznamenalo změny zastoupení cholesterolu v membráně. Zvýšení hladiny cholesterolu bylo způsobeno aktivací hepatické mikrosomální cholesterol acyl-CoA transferázy (Davis a kol., 1978). Detekován byl nárůst podílu volného cholesterolu na 130 % (Davis a kol., 1978). Avšak v jiné studii užívající stejného experimentálního schématu nebyla zaznamenána žádná signifikantní změna obsahu volného cholesterolu (Rosario a kol., 1988; Bossard a kol., 1993). Vedle toho ani pětidenní podání ethinylestradiolu v dávkách 10 a 25 µg/kg signifikantně neovlivnilo obsah membránového cholesterolu oproti kontrolním zvířatům (Rosario a kol., 1988).

Dále byl zaznamenán výrazný nárůst hladiny esterů cholesterolu, a to na 400 % (Davis a kol., 1978) a v dalším případě byl detekován dokonce pětinasobný nárůst hladiny esterů cholesterolu (Bossard a kol., 1993). Zvýšená koncentrace esterů cholesterolu, způsobuje nárůst lipidové viskozity.

Dalším důležitým parametrem ovlivňujícím fluiditu membrány je zastoupení fosfolipidů a jejich poměr k obsahu cholesterolu (Cooper, 1977). Změny poměru membránového cholesterolu a fosfolipidů ovlivňují aktivitu integrálních membránových proteinů a biofyzikální vlastnosti membrány (Chen a kol., 1995). Zvýšení tohoto poměru vypovídá o vysoce organisované membráně se zvýšenou mikroviskozitou či sníženou fluiditou (Keeffe a kol., 1979). V této souvislosti podání ethinylestradiolu však v jednom případě nevyvolalo žádnou signifikantní změnu poměru membránového cholesterolu a fosfolipidů (Rosario a kol., 1988), ačkoliv v jiném případě bylo detekováno zvýšení zastoupení cholesterolu a změna poměru cholesterol:fosfolipidy (Cooper, 1977).

Změna množství fosfolipidů nebyla zaznamenána, avšak jejich kompozice byla pozměněna (Davis a kol., 1978; Bossard a kol., 1993). Obsah fosfatidylethanolaminu (PE) byl snížen o 16 % (Bossard a kol., 1993) a 24% (Rosario a kol., 1988), zatímco obsah fosfatidylserinu (PS) stoupl o 22 % (Bossard a kol., 1993) a 29 % (Rosario a kol., 1988). Zaznamenán byl také nárůst obsahu fosfatidylcholinu (PC) o 8 % (Rosario a kol., 1988) nebo nebyl změněn, stejně jako zastoupení sfingomyelinu (SM) a fosfatidylinositolu (PI) (Bossard a kol., 1993). Poměr PE/PC poklesl o 15% (Bossard a kol., 1993) a o 29 % (Rosario a kol., 1988), zatímco poměr SM/PC nebyl signifikantně ovlivněn (Rosario a kol., 1988; Bossard a kol., 1993).

Vliv ethinylestradiolu na fluiditu membrány byl měřen dalšími metodami. Metodou FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) byla měřena laterální difúzní konstanta lipidů ( $D_l$ ) a proteinů ( $D_p$ ) v plazmatických membránách hepatocytů po podávání ethinylestradiolu po dobu 1 a 5 dní. Laterální difúzní konstanta lipidů ( $D_l$ ) byla snížena o 43 % v porovnání s kontrolní skupinou a o 30 % oproti skupině s placebem (Kitani a Zs-Nagy, 1996).

Pro porovnání vlivu cholesterolu na fluiditu membrány byl vybrán následující experiment, ve kterém je demonstrován vliv diety s vyšším obsahem cholesterolu. Byla studována plazmatická membrána arteriálního hladkého svalu připravené z aorty, včetně analýzy obsahu volného cholesterolu, struktury membránové dvojvrstvy, složení fosfolipidů a aktivity  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy. Jako modelový organismus byli použiti králíci krmení dietou s vyšším obsahem cholesterolu (2 %). Po 8 týdnech obsahovaly membrány 67% nárůst obsahu volného cholesterolu a zároveň byl zaznamenán nárůst tloušťky membrány. Byl zaznamenán 16,4% nárůst obsahu fosfatidylcholinu, 19,3% pokles obsahu fosfatidylethanolaminu a 62,8% nárůst obsahu sfingomyelinu. Po 8 týdnech diety s vyšším obsahem cholesterolu byl detekován 67,1% nárůst obsahu volného cholesterolu oproti kontrolám. Po 10 týdnech diety s vyšším obsahem cholesterolu vzrostl obsah sérového cholesterolu 34x, esterů cholesterolu 40x a volného cholesterolu 23x (Chen a kol., 1995).

### **3.5.7. Vliv fluidity membrány na aktivitu $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ - ATPázy**

V souvislosti se změnou membránové fluidity po podání ethinylestradiolu je zaznamenána i změna aktivity membránových proteinů, přesněji pokles aktivity  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy (Reichen a Paumgartner, 1977; Cooper, 1977; Davis a kol., 1978; Keefe a kol., 1979; Simon a kol., 1996; Kitani a Zs-Nagy, 1996) a nárůst množství LDL částic (Kovanen a kol., 1979). Lipidová viskozita je určující pro enzymy navázané na membránu (Davis a kol., 1978). Přesněji řečeno, membránové lipidy ovlivňují aktivitu integrálních proteinů modulací konformace jednotlivých proteinů a multi-proteinových komplexů (Chen a kol., 1995). Inhibice aktivity  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy je celková v případě satureovaných fosfolipidů, částečná u nesatureovaných fosfolipidů (Kimelberg a Papahadjopoulos, 1973).

Fluidita plazmatických membrán hepatocytů byla určena měřením mikroviskozity metodou polarizace fluorescence za použití sondy DPH (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien), která se inkorporuje do hydrofobní zóny membrány (Schachter a Shinitzky, 1977). Pokles aktivity  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy plazmatické membrány hepatocytů, který byl způsoben

podáváním ethinylestradiolu (5 mg/kg), uniformně koreluje se snížením membránové fluidity měřené pomocí metody rovnovážné polarizace fluorescence s použitím membránové sondy DPH (Keeffe a kol., 1979). Vedle rovnovážné polarizace fluorescence byla využita i metoda dynamické depolarizace k studiu struktury membránových lipidů, která potvrdila, že působení ethinylestradiolu vedlo k nárůstu rigidity sinusoidální membrány (Rosario a kol., 1988). V dalších studiích byla fluidita plazmatické membrány určena za použití elektron-spinové rezonance, která demonstrovala pokles fluidity současně s poklesem aktivity  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy po podání ethinylestradiolu v dávce 5 mg/kg potkana (Davis a kol., 1978).

Ethinylestradiol snižuje fluiditu membrány, jak potvrdilo měření anizotropie fluorescence, způsobuje akumulaci cholesterolu v membráně, čímž mění laterální difúzi celé membrány a zvyšuje její propustnost. Následkem tohoto vlivu na membránu je ovlivnění aktivity membránových enzymů včetně  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy, která je citlivá na lipidové složení plazmatické membrány (Cooper, 1977; Kitani a Zs-Nagy, 1996). Pokles aktivity  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy souvisí s nárůstem lipidové složky membrány, avšak zřejmě nesouvisí s nárůstem esterů cholesterolu, ačkoliv jeho obsah byl působením vysokých dávek ethinylestradiolu zvýšen (Davis a kol., 1978). Pětidenní expozice nižším dávkám ethinylestradiolu (< 0,1 mg/kg; 10 a 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) nezpůsobila signifikantní změnu hladiny esterů cholesterolu oproti kontrolním zvířatům, ale přesto snížila aktivitu  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy a zvýšila naměřené hodnoty polarizace. Proto se usuzuje, že nárůst esterů cholesterolu nezpůsobuje funkční změny  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy (Rosario a kol., 1988). Podobného výsledku dosáhla studie inhibice aktivity  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy taurocholátem, která poukazuje na to, že taurocholát způsobuje snížení aktivity  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy, ale nezpůsobuje současnou změny membránové fluidity (Keeffe a kol., 1979).

Jak bylo uvedeno v předchozí podkapitole (3.5.6.), vliv diety s vyšším obsahem cholesterolu ovlivňuje fluiditu plazmatické membrány. Toto působení ovlivňuje aktivitu  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy, což demonstruje, že vlivem diety bylo dosaženo podobného efektu jako při podání ethinylestradiolu. Tato skutečnost zároveň to podporuje hypotézu, že ovlivnění  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy probíhá přes změny fluidity plazmatické membrány a tedy i obsah cholesterolu v ní. Ve zmíněném experimentu s cholesterolovou dietou byla aktivita  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy snížena o 52,2%. Došlo také k 27,6% poklesu maxima vazebných míst  $B_{\text{max}}$ , ale hodnota disociační konstanta  $K_d$  zůstala nezměněna, jak bylo zjištěno stanovením vazby [ $^3\text{H}$ ]ouabainu. Pokles aktivity  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy souvisí s poklesem maximální vazebné kapacity pro ouabain. Snížená afinita ouabainu k enzymu se odráží v nárůstu

hodnoty  $K_d$ , která ale nebyla v tomto experimentu ovlivněna (Chen a kol., 1995). Závěrem tedy vyplývá, že jak aktivita  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázy, tak vazba ouabainu závisí a je ovlivněna integritou a fyzikálními vlastnostmi plazmatické membrány.



## 4. Cíle diplomové práce

Prvním cílem předkládané diplomové práce je analýza frakcí sacharózového gradientu připraveného z buněk linie HEK293 ovlivněné různými koncentracemi ethinylestradiolu a jejich porovnání s kontrolními vzorky.

Dalším cílem je stanovení vazby inhibitoru ouabainu na  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázu jako negativního standardu změn plazmatické membrány vlivem dlouhodobého podávání ethinylestradiolu a následné srovnání výsledné specifické vazby a vazebných parametrů [ $^3\text{H}$ ]ouabainu v kontrolních vzorcích a ve vzorcích ovlivněných různými koncentracemi ethinylestradiolu.

Třetím cílem je charakterizovat změnu fluidity plazmatické membrány pomocí rovnovážné anizotropie DPH.

## 5. Praktická část – Materiál a metody

### 5.1. Chemikálie a příslušenství

Tabulka I – Přehled použitých chemikálií a příslušenství

Chemikálie a příslušenství	Výrobce
[ <sup>3</sup> H]ouabain (specifická radioaktivita 17 Ci/ mmol)	Perkin-Elmer
17 $\alpha$ -ethinylestradiol	Sigma Aldrich
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Lach-Ner
DPH (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien)	Sigma Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, D6429)	Sigma Aldrich
EDTA	Sigma Aldrich
Ethanol	Sigma Aldrich
Folin-Ciocalteu's phenol reagent	Sigma Aldrich
Geneticin Selective Antibiotic (G418)	Life Technologies
MgCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Penta
NaOH	BDH
Newborn Calf Serum (NCS)	Life Technologies
Nunc Cell Culture Treated Flasks; Culture Area 80 cm <sup>2</sup>	NUNC
Ouabain	Sigma Aldrich
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma Aldrich
PMSF (fenylmetylsulfonylfluorid) – inhibitor proteáz	Serva
Propylenglykol	Penta
Sacharóza	Serva
Scintilační roztok Rotiszint EcoPlus	Carl Roth
Standard BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma Aldrich
Tris-HCl	Sigma Aldrich
Vinan sodno-draselný	Sigma Aldrich
Whatman Glass Microfiber Filters GF/C	Sigma Aldrich

### 5.1.1. Použité roztoky

10 % promývací pufr (25 ml 1M Tris-HCl, 2,5 ml 1M MgCl<sub>2</sub>, doplněno do 5 l dH<sub>2</sub>O)

Inkubační médium (50mM Tris-HCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,4)

STEM pufr (85,6 g sacharózy; 20 ml 1M Tris-HCl; 10 ml 100mM EDTA; 30 ml 100mM MgCl<sub>2</sub>; pH = 7,6)

Homogenizační pufr č. 1 (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 10mM EDTA, pH 8,0)

TE pufr (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,6)

### 5.1.2. Použité přístroje

Pístový homogenizátor teflon-sklo Elvehjm-Potter, B. Braun Biotech International

Centrifuga Hettich Universal 320, Schoeller

Ultracentrifuga Beckman Optima XL 100K, úhlový rotor Ti 70, výkyvný rotor SW 41

Ultracentrifuga Beckman Optima Max, rotor MLA80

Filtrovací přístroj Cell Harvester, Brandel

Třepací vodní lázeň, dílny ČSAV

Spektrofotometr Eppendorf BioPhotometer plus

Spektrofluorimetr PC1, ISS

## 5.2. Kultivace buněčné linie

### 5.2.1. Buněčná linie

Pro experimenty byly použity buňky odvozené z linie lidských embryonálních buněk ledvinového epitelu HEK293 (Human Embryonic Kidney) stabilně exprimující fúzní protein DOR-Gi<sub>1α</sub>, resistentní vůči pertussis toxinu a antibiotiku Geneticinu.

Buněčná linie HEK293 byla připravena v 70. letech 20. století transformací kultury lidských embryonálních buněk ledvinového epitelu fragmenty DNA adenoviru (Ad)5 (Graham a kol., 1977). Buněčná linie DOR-Gi<sub>1α</sub> byla připravena transfekcí HEK293 buněk cDNA pro fúzní protein mezi lidským δ-opioidním receptorem a Gα<sub>i1</sub> podjednotkou G-proteinu potkana, ve které byl cystein<sup>351</sup> zaměněn za izoleucin. Došlo tak ke ztrátě citlivosti k pertussis toxinu. Pertussis toxinem je možno zablokovat endogenní Gα<sub>i</sub> podjednotky, ale Gα<sub>i</sub> podjednotka ve fúzním exogenním konstruktu zůstává funkční (Moon a kol., 2001).

Tato buněčná linie byla vybrána jako vhodný modelový systém pro její snadnou a dobře charakterizovanou kultivaci.

### **5.2.2. Kultivační podmínky**

Buňky byly kultivovány v Dulbecco's modified Eagle's mediu (DMEM; Sigma Aldrich) obsahujícím 9% Newborn Calf Serum (NCS; Life Technologies). Do takto připraveného kultivačního média byl pravidelně přidáván Geneticin (G418; Life Technologies) tak, aby jeho výsledná koncentrace v médiu byla 0,8 mg/ml. Pro kultivaci byly použity kultivační lahve (153732, NUNC) o ploše 80 cm<sup>2</sup>. Kultivace probíhala v inkubátoru při teplotě 37°C v atmosféře s obsahem 5% CO<sub>2</sub>.

### **5.2.3. Pasážování buněk**

Po dosažení 70-90% konfluency byly buňky z jedné kultivační lahve rozděleny (pasážovány) do nových lahví. Z lahví s buňkami bylo odsáto kultivační médium a k buňkám byl přidán 1,5 ml roztoku 0,1% trypsinu a 0,5mM EDTA v PBS. Tímto roztokem byly buňky opláchnuty a roztok byl ihned odpipetován. Následně bylo k buňkám přidáno stejné množství roztoku 0,1% trypsinu a 0,5mM EDTA v PBS, ale buňky v něm nyní byly 2 minuty inkubovány. Během této krátké inkubace došlo k rozrušení buněčné vrstvy a oddělení buněk ode dna láhve. K takto vzniklé buněčné suspenzi bylo přidáno adekvátní množství kultivačního média, aby došlo k inaktivaci působení trypsinu. Buňky byly poté mechanicky resuspendovány opakovaným pipetováním. Buněčná suspenze byla rozdělena do nových kultivačních lahví pro další kultivaci.

### **5.2.4. Sklizení buněk**

Pro přípravu postnukleárního supernatantu a plazmatických membrán bylo potřeba napěstovat velké množství buněčného materiálu. Po dosažení konfluency 80-90 % byly buňky sklizeny z kultivačních lahví. Kultivační lahve s buňkami byly umístěny do ledové lázně. Pro sklizení bylo použito 5 ml 1x koncentrovaného roztoku vychlazeného fosfátového pufru (PBS, Sigma Aldrich), do kterého byly buňky mechanicky seškrábnuty škrabkou. Buněčné suspenze byly přeneseny do 50ml kónických zkušev, ve kterých byly centrifugovány po dobu 10 minut při 300 x g a teplotě 4°C. Vzniklý buněčný pelet byl převeden do 1,5ml mikrozkuševky, zamražen v tekutém dusíku, uskladněn při teplotě -80°C.

### 5.2.5. Příprava buněčných preparátů pro experimenty – inkubace s ethinylestradiolem

Buněčný materiál v kultivačních lahvích byl rozdělen do 3 skupin. První skupina byla určena jako kontrolní a k její kultivaci bylo použito pouze kultivační médium obohacené geneticinem. Druhá skupina byla kultivována v kultivačním médiu, do kterého bylo přidáno 10 µl sterilního roztoku ethinylestradiolu v ethanolu o koncentraci 10 ng/µl (0,34mM). Celková koncentrace ethinylestradiolu v kultivační lahvi s 10 ml kultivačního média činila 10 ng/ml. Tato koncentrace byla odvozena od nejvyšší dávky (50 µg) ethinylestradiolu používané v preparátech hormonální antikoncepce. Třetí skupina byla kultivována v kultivačním médiu, do kterého bylo přidáno 10 µl sterilního roztoku ethinylestradiolu v ethanolu o koncentraci 100 ng/µl. Celková koncentrace ethinylestradiolu v kultivační lahvi s 10 ml kultivačního média činila 100 ng/ml. Buněčné kultury byly inkubovány v médiu s přidaným ethinylestradiolem 24 hodin a poté byly sklizeny a uskladněny obvyklým způsobem. Pro přehlednost jsou koncentrace ethinylestradiolu použitého v inkubaci buněčných kultur uvedeny v následující **tabulce II**.

**Tabulka II – Aplikační schéma ethinylestradiolu buněčné linii**

	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3
Koncentrace ethinylestradiolu v kultivační lahvi	0	10 ng/ml	100 ng/ml
Finální koncentrace ethinylestradiolu	0	0,034 µM	0,34 µM

### 5.3. Podávání ethinylestradiolu potkanům – příprava experimentálního materiálu

#### 5.3.1. Chov potkanů

V experimentu bylo použito 30 samic potkana kmene Wistar. Stáří potkanů bylo 90 dní v den začátku pokusu a průměrná váha na začátku experimentu činila  $277 \pm 20$  g. Potkani byli krmeni standardní dietou. S přístupem k potravě a vodě *ad libitum* po celou dobu experimentu. Potkani byli umístěni v klimatizovaném zvěřinci v chovných nádobách s kovovým víkem po 3 - 4 jedincích v jedné nádobě. Ve zvěřinci byly udržovány standardní podmínky teplota 23°C, vlhkost 55%, cyklus den – noc 12:12. Zvířata byla rozdělena do 3 skupin po 10 jedincích. Dvě skupiny byly experimentální a jedna kontrolní.

### 5.2.2. Aplikované dávky ethinylestradiolu

V minulosti bylo provedeno mnoho pokusů na potkanech, kterým byl injekčně podáván ethinylestradiol. Ve většině případů šlo o pětidenní expozici dávkám ethinylestradiolu o koncentraci 5 mg/kg váhy potkana (Reichen a Paumgartner, 1977; Davis a kol., 1978; Keffe a kol., 1979; Bossard a kol., 1993; Kitani a Zs-Nagy, 1996). Roztok ethinylestradiolu, který byl potkanům aplikován, byl ve všech případech připraven rozpuštěním ethinylestradiolu v propylenglykolu (PG) a byl injikován subkutánně (Reichen a Paumgartner, 1977; Davis a kol., 1978; Keffe a kol., 1979; Bossard a kol., 1993; Kitani a Zs-Nagy, 1996). Vliv dávky ethinylestradiolu 5 mg/kg na orgány potkana je popsán v kapitole č. 3.5.1.

Pro experiment byly zvoleny 2 koncentrace dávkování ethinylestradiolu, které se více přibližují koncentraci ethinylestradiolu používané v preparátech hormonální antikoncepce. 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (Sigma Aldrich) byl rozpuštěn v propylenglykolu (Penta). Výsledný roztok byl připraven o dvou koncentracích, a to 0,1 mg/kg a 1 mg/kg, pro dvě experimentální skupiny potkanů.

### 5.2.3. Průběh experimentu

Roztok ethinylestradiolu v propylenglykolu, v případě kontrol samotný propylenglykol, byl subkutánně injikován potkanům po dobu 10 dní v dávce 0,3 ml. K podávání dávek docházelo každý den experimentu od 9 do 10 hodin dopoledne. Aplikační schéma shrnuje následující **tabulka III**.

Všechna zvířata byla usmrcena dekapitací v éterové narkóze 24 hodin po podání poslední desáté dávky. Byly vypreparovány následující tkáně: mozek (šedá kůra mozková), srdce (levá komora myokardu), játra a ledviny (kůra). Všechny vybrané tkáně byly zamrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při teplotě -80°C.

**Tabulka III – Aplikační schéma ethinylestradiolu potkanům**

	Aplikovaná látka	Dávka	Způsob podání	Délka experimentu
1. Skupina - CTR	Propylenglykol	300 $\mu$ l	subkutánně	10 dní (10 aplikací)
2. Skupina – EE 0,1 mg/kg	Ethinylestradiol v PG; 0,1 mg/kg	300 $\mu$ l	subkutánně	10 dní (10 aplikací)

3. Skupina – EE 1 mg/kg	Ethinylestradiol v PG; 1 mg/kg	300 µl	subkutánně	10 dní (10 aplikací)
----------------------------	-----------------------------------	--------	------------	-------------------------

## 5.4. Příprava postnukleárního supernatantu

### 5.4.1. Homogenizace sklizených buněk a centrifugace

K homogenizaci sklizených buněk byl použit homogenizační pufr připravený z 50 ml homogenizačního pufru č. 1 (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 10mM EDTA, pH 8,0), 250 µl 200mM PMSF a 1 tablety Complete (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets). Rozmražené sklizené buňky (1 ml) byly doplněny 4 ml připraveného homogenizačního pufru, aby výsledná koncentrace homogenátu byla 20 %. Směs byla 7 minut mechanicky homogenizována za použití pístového homogenizátoru teflon – sklo a současného chlazení ledem. Část vzniklého homogenátu byla použita na stanovení množství proteinů podle Lowryho metody. Většina homogenátu byla převedena do 15ml centrifugačních zkumavek s kulatým dnem a centrifugována 7 minut na centrifuze Hettich Universal 320 při 1160 x g a 4°C. Po centrifugaci byl odebrán postnukleární supernatant (dále PNS), ze kterého byla část odebrána na stanovení množství proteinů podle Lowryho metody a zbytek byl použit na přípravu sacharózového flotačního gradientu a pro pozdější měření vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu.

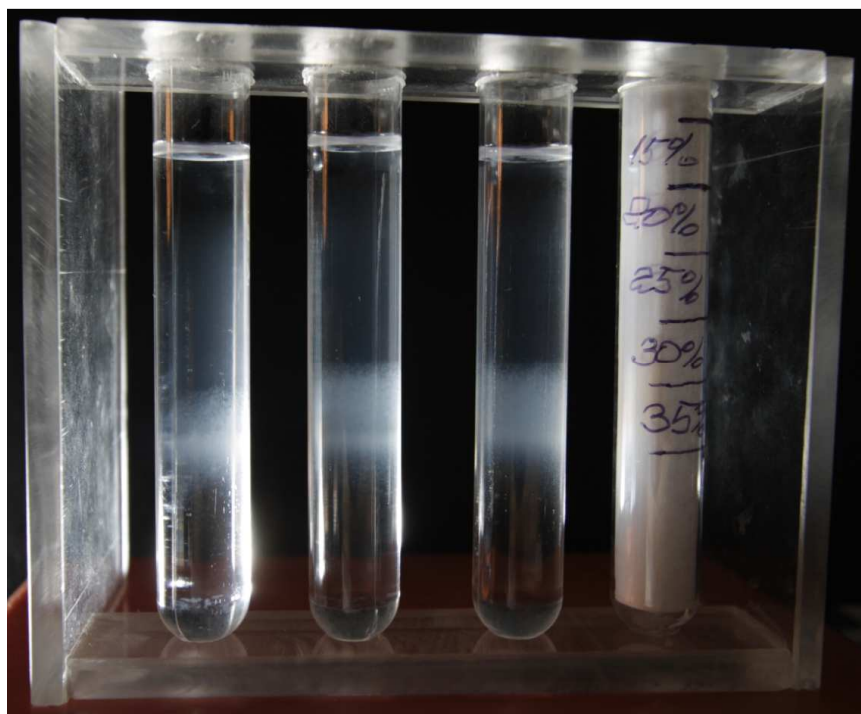
### 5.4.2. Homogenizace tkání potkana a centrifugace

K homogenizaci tkání z potkana byl použit homogenizační pufr připravený z 50 ml STEM pufru (85,6 g sacharózy; 20 ml 1M Tris-HCl; 10 ml 100mM EDTA; 30 ml 100mM MgCl<sub>2</sub>; pH = 7,6), 250 µl 200mM PMSF a 1 tablety Complete (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets). Rozmražené tkáně byl odvážen 1 g, který byl doplněn 10 ml připraveného homogenizačního pufru, aby výsledná koncentrace homogenátu byla 10 %. Směs byla 7 minut mechanicky homogenizována za použití pístového homogenizátoru teflon – sklo a současného chlazení ledem. Část vzniklého homogenátu byla použita na stanovení množství proteinů podle Lowryho metody. Většina homogenátu byla převedena do 15ml centrifugací zkumavek s kulatým dnem a centrifugována 7 minut na centrifuze Hettich Universal 320 při 1160 x g a 4°C. Po centrifugaci byl odebrán PNS, ze kterého byla část odebrána na stanovení množství proteinů podle Lowryho metody a zbytek byl zamražen v kapalném dusíku a uskladněn při -80°C pro pozdější měření vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu.

## 5.5. Frakcionace postnukleárního supernatantu pomocí gradientové centrifugace - sacharózový flotační gradient

### 5.5.1. Příprava gradientu a centrifugace

Nejprve byly připraveny roztoky sacharózy o koncentraci 15, 20, 25, 30, 35 a 80 %. Každý roztok obsahoval 5 ml 1M Tris-HCl, 1 ml 100mM EDTA, adekvátní množství sacharózy (15 g sacharózy pro 15% roztok) a vše bylo doplněno do 100 ml vysterilizovanou vodou. U všech roztoků bylo upraveno pH na 7,6 a roztoky byly vychlazeny. Do centrifugačních kyvet byly napipetovány 2 ml 80% sacharózy a 2 ml PNS připraveného ze sklizených buněk. Obsah centrifugační kyvety byl promíchán, čímž vznikla směs 40% sacharózy s PNS. Následně byl nad tuto směs navrstven gradient sacharózy o snižující se koncentraci od 35% do 15 %, a to vždy v 1,5ml vrstvách. Celý proces vrstvení gradientu probíhal na ledu. Centrifugační kyvety byly vyváženy a umístěny do vychlazeného rotoru SW41 a centrifugovány na ultracentrifuze Beckman 24 hodin při 197000 x g a 4°C.



**Obrázek č. 16 – Sacharózový flotační gradient**

Zleva: První zkumavka obsahuje plazmatické membrány z kontrolních buněk; druhá zkumavka z buněk kultivovaných v médiu s EE 10 ng/ml; třetí zkumavka z buněk kultivovaných v médiu s EE 100 ng/ml.



### 5.5.2. Rozebrání gradientu

Po centrifugaci byly patrné 2 ohraničené frakce (viz. **Obrázek č. 16**). Znatelný proužek obsahuje plazmatické membrány a v mlhovité oblasti nad ním jsou obsaženy lehké vezikuly. Kompletní obsah každé centrifugační zkumavky byl rozebrán do uzavíratelných mikrozkuvek po 1 ml tak, že bylo vytvořeno 11 frakcí. Lehké vezikuly byly obsaženy ve frakci č. 6 a plazmatické membrány ve frakci č. 7. Od každé z 11 frakcí byla část odebrána na stanovení množství proteinů podle Lowryho metody a zbytek byl zamražen v kapalném dusíku a uskladněn při  $-80^{\circ}\text{C}$  pro pozdější měření vazby [ $^3\text{H}$ ]ouabainu.

### 5.6. Stanovení koncentrace proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů v experimentálních vzorcích byla použita modifikovaná metoda podle Lowryho (Lowry a kol., 1951). Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA; Sigma Aldrich). Touto metodou byly vyhodnocovány vzorky PNS a frakce sacharózového flotačního gradientu připravené z buněčných kultur a tkání potkanů.

Byly použity následující roztoky:

- Roztok A: 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 0,1 M NaOH
- Roztok B: 2% Na, K – tartate (vinan sodno-draselný)
- Roztok C: 1%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- Folinovo reagens - čerstvě naředěno v poměru 1:1 s destilovanou  $\text{H}_2\text{O}$
- Standard BSA: 1 mg/ ml

Experimentální vzorky byly rozpuštěny při teplotě tajícího ledu. Kalibrační křivka byla připravena podle pipetovacího schématu uvedeného v následující **tabulce IV** na výsledný objem 0,5 ml.

**Tabulka IV – Pipetovací schéma standardu BSA při stanovení koncentrace proteinů Lowryho metodou**

Č. zkum.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BSA( $\mu\text{l}$ )	0	10	20	30	40	50	75	100	150	200
d $\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{l}$ )	500	490	480	470	460	450	425	400	350	300
BSA( $\mu\text{g}$ )	0	10	20	30	40	50	75	100	150	200

Byly připraveny alikvoty experimentálních preparátů. Za optimální objem alikvot pro stanovení je považováno 5 – 10  $\mu\text{l}$  homogenátu, PNS či membrán nebo 20 – 100  $\mu\text{l}$  jednotlivých frakcí gradientu. Vzorky o uvedených objemech byly doplněny opět do výsledného objemu 0,5 ml. Následně bylo do všech zkumavek (kalibrační křivky i vzorků) přidáno 1,5 ml roztoku A+B+C (50 ml A + 1 ml B + 1 ml C) a obsah zkumavek byl řádně promíchán. Po inkubaci 10 – 15 min při laboratorní teplotě bylo do všech zkumavek přidáno 150  $\mu\text{l}$  čerstvě naředěného Folinova reagens v 30s intervalech a obsah zkumavek byl opět řádně promíchán. Následovala 30min inkubace v laboratorní teplotě, po které byla změřena absorbance jednotlivých vzorků při vlnové délce 595 nm spektrofotometrem Eppendorf BioPhotometer plus. Stanovení bylo prováděno v duplikátech až triplikátech. Naměřená data byla vyhodnocena v programu GraphPad Prism 3.0. Kalibrační křivka byla získána nelineární regresí podle rovnice  $y=ax^2+bx+c$ . Koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích byla odečtena z kalibrační křivky.

## 5.7. Stanovení vazby [ $^3\text{H}$ ]ouabainu

### 5.7.1 Úvod

V přímé vazebné studii byl použit tritiem značený ouabain. Po vazbě radioligandu na receptor bylo měřeno množství navázaného [ $^3\text{H}$ ]ouabainu a stanoven počet vazebných míst a afinita ligandu pro receptor. Počet vazebných míst udává množství receptorů ve vzorku.

Při interakci ligandu s receptorem vzniká komplex ligand-receptor. Při rovnováze platí, že rychlost asociace je rovna rychlosti disociace.

$$[R] \cdot [L] \cdot k_1 = [RL] \cdot k_2,$$

kde R je receptor, L ligand, RL komplex ligand-receptor,  $k_1$  rychlostní konstanta asociace a  $k_2$  rychlostní konstanta disociace. Vazba ligandu na receptor může být silně ovlivněna pH a přítomností iontů ( $\text{Mg}^{2+}$ ).

Z předchozího vztahu vyplývá rovnice vyjadřující rovnovážnou disociační konstantu  $K_d$ , která vyjadřuje koncentraci ligandu, při které je polovina receptorů obsazena ligandem.

$$K_d = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]},$$

kde  $k_1$  je rychlostní konstanta asociace,  $k_2$  rychlostní konstanta disociace a  $K_d$  rovnovážná disociační konstanta. Čím je  $K_d$  nižší, tím je vyšší afinita ligandu k receptoru. Afinita je definována jako  $-\log(K_d) = \log(1/K_d)$ .

Saturačním vazebným stanovením se měří množství navázaného radioligandu v rovnovážných podmínkách v závislosti na stoupající koncentraci radioligandu. Při jednobodovém stanovení je měřeno množství vazebných míst v preparátu při jedné koncentraci radioligandu. Pro kvantitativní stanovení se určuje specifická vazba ligandu, která vyjadřuje afinitu látek k receptorům a schopnost se na ně vázat. Nеспецифická vazba je stanovena neznačeným ligandem, s nímž radioaktivně značený ligand soutěží o vazebné místo receptoru, a je lineární funkcí koncentrace ligandu. Celková vazba  $B_{tot}$  je dána součtem specifické vazby  $B_{sp}$ , která vyjadřuje vazbu radioligandu na specifický receptor, a nеспецифické vazby  $B_{nsp}$ , která představuje vazbu na jiná místa než na receptory našeho zájmu. Nеспецифická vazba lineárně roste podle koncentrace radioligandu a není tedy satureována. Saturační vazebná křivka poskytuje informace o hustotě receptorů, afinitě ligandů. Asymptotou k hyperbolické saturační křivce je hodnota  $B_{max}$ . Stanovením specifické vazby radioligandu je zjištěna vazebná kapacita, neboli maximální počet vazebných míst a afinita k receptorům.

Rovnice saturační křivky

$$B = \frac{B_{max} \cdot [F]}{K_d + [F]},$$

kde  $B$  je množství radioligandu navázaného na receptor,  $B_{max}$  je maximální vazebná kapacita neboli maximální počet vazebných míst,  $F$  je koncentrace volného radioligandu a  $K_d$  je rovnovážná disociační konstanta receptoru vyjadřující afinitu receptoru. Rovnice saturační křivky je prakticky analogická rovnici Michaelise - Mentenové pro enzymovou kinetiku

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}.$$

Maximální počet vazebných míst v daném vzorku a afinitu receptoru lze vypočítat z linearizované formy rovnice, Scatchardova výnosu, nebo nelineární regresi např. pomocí programu GraphPad Prism. Scatchardův výnos ve tvaru pro rovnici přímky ( $y = a - bx$ ):

$$\frac{B}{F} = \frac{B_{max}}{K_d} - \frac{1}{K_d} \cdot B.$$

Lineární regresí získáme  $B_{max}$  - průsečík přímky Scatchardova výnosu s osou x (pro  $B/F = 0$ ). Disociační konstantu vazebné reakce získáme vydělením hodnoty  $B_{max}$  průsečíkem přímky Scatchardova výnosu s osou y, tedy podílem vázané a volné radioaktivity (v bodě  $B = 0$ ), jak znázorňuje následující rovnice

$$K_d = \frac{B_{max} \cdot F}{B}.$$

### 5.7.2. Měření vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu

Příprava inkubační směsi vzorku PNS nebo frakcí gradientu, inkubačního média (50mM Tris-HCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,4) a radioligandu ([<sup>3</sup>H]ouabain; specifická radioaktivita 17 Ci/mmol; teoretická koncentrace 59nM) byla provedena při teplotě tajícího ledu, z důvodu zabránění degradaci biologického materiálu. Paralelně byla vytvořena reakční směs obsahující radioaktivně neznačený ouabain pro určení nespecifické vazby. Zásobní roztok radioaktivně neznačeného ouabainu o koncentraci 0.01M byl 100x naředěn na koncentraci 0,1mM. vazebná reakce byla zahájena přidáním radioligandu do inkubační směsi, následně probíhala 90min inkubací ve vodní lázni při fyziologické teplotě 37°C, při které probíhalo navázání ligandu. Vazebná reakce byla po 90 minutách ukončena ledově vychlazeným promývacím pufrem a přefiltrováním vzorků, přičemž došlo k oddělení vázané a volné radioaktivity. K filtraci byl použit filtrační přístroj Cell Harvester od firmy Brandel, filtry Whatman GF/C ze skleněných vláken a 10% promývací pufr. Filtry byly vyjmuty a vloženy do předem označených scintilačních zkumavek, ve kterých byly zality 5 ml scintilačním roztokem (Rotiszint EcoPlus, Carl Roth). Kapalinová scintigrafie byla měřena na oddělení radiometrie FGÚ AV.

### 5.7.3. Jednobodové stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu v PNS z buněčné linie

Stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu bylo provedeno v PNS připraveném ze sklizených buněk linie HEK293. Koncentrace bílkovin v jednotlivých vzorcích je uvedena **tabulce VIII**. Následovalo ještě identické stanovení, při kterém byly všechny vzorky naředěny 10x. Do celkového inkubačního objemu 0,5 ml bylo pipetováno 0,05 ml vzorku, 0,1 ml vody a 0,35 ml radioligandu. Finální koncentrace radioligandu byla 20nM.

#### 5.7.4. Jednobodové stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu ve frakcích z buněčné linie

Stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu bylo provedeno ve frakcích sacharózového gradientu, ve kterém byly použity vzorky ze sklizených buněk linie HEK293. Koncentrace bílkovin v jednotlivých frakcích je uvedena v **tabulce IX**. Do celkového inkubačního objemu 0,5 ml bylo pipetováno 0,15 ml vzorku frakcí a 0,35 ml radioligandu. Finální koncentrace radioligandu byla 20nM.

#### 5.7.5. Jednobodové stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu v PNS z tkání potkanů

Stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu bylo provedeno v PNS připraveném z tkání potkanů. Koncentrace bílkovin byla upravena na 1 mg/ml. Původní koncentrace PNS jednotlivých vzorků je uvedena v **tabulce XI**. Do celkového inkubačního objemu 0,25 ml bylo pipetováno 0,1 ml vzorku PNS a 0,05 ml radioligandu. Praktická koncentrace radioligandu byla 19nM.

#### 5.7.6. Stanovení saturační vazebné křivky [<sup>3</sup>H]ouabainu v PNS z šedé kůry mozkové

Stanovení saturační vazebné křivky bylo provedeno v PNS připraveném z vypreparované části mozku potkanů – šedé kůry mozkové. Koncentrace bílkovin v pokusu byla 2,5 mg/ml. Původní koncentrace PNS jednotlivých vzorků je uvedena v **tabulce XI**. Do celkového inkubačního objemu 0,31 ml bylo pipetováno 0,1 ml vzorku PNS (tj. 0,25 mg), 0,01 ml neznačeného ouabainu nebo vody a 0,2 ml radioligandu. Koncentrační řada radioligandu je uvedena v následující **tabulce V**.

**Tabulka V – Koncentrační řada radioaktivně značeného [<sup>3</sup>H]ouabainu, T1-T8**

T	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<b>koncentrace (nM)</b>	27,4	13,0	6,6	3,4	1,9	1,1	0,5	0,2

### 5.7. Rovnovážná anizotropie DPH

#### 5.7.1. Úvod

Membránové fluorescenční sondy se využívají ke studiu strukturních a dynamických změn buněčných membrán. Uměle syntetizovaná sonda DPH (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien) je lineární sonda, která se inkorporuje do hydrofobní zóny membrány a využívá se ke studiu fluidity membrány. K tomuto účelu byla vybrána metoda rovnovážné anizotropie fluorescence v membránové suspenzi. Suspenze membrán

označená sondou je ozařována konstantním zdrojem světla, které se po průchodu polarizátorem stává vertikálně polarizovaným. Emitované záření je detekováno analyzátozem, jehož orientace je nejprve vertikální a poté se mění na horizontální. Výsledkem jsou dvě hodnoty intenzity polarizované fluorescence  $I_{VV}$  a  $I_{VH}$ , ze kterých je podle následujícího vztahu vypočítána hodnota rovnovážné anizotropie ( $r$ ) fluorescence (Lentz, 1993).

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}}$$

kde  $r$  je anizotropie fluorescence,  $I_{VV}$  je intenzita fluorescence měřená při vertikální orientaci excitačního i emisního polarizátoru a  $I_{VH}$  je intenzita fluorescence měřená při vertikální orientaci excitačního a horizontální orientaci emisního polarizátoru.

Anizotropie je bezrozměrná veličina, jejíž maximální hodnota je 0,4. Zvyšuje-li se fluidita membrány, hodnota anizotropie klesá. Anizotropie sondy v membráně tak charakterizuje membránové prostředí a vypovídá o fluiditě membrány, resp. pohyblivosti membránových komponent. Hodnota anizotropie závisí mimo jiné na teplotě a obsahu cholesterolu v membráně.

### 5.7.2. Příprava membránových preparátů

Jako experimentální materiál byly použity 3 frakce sacharóзовého flotačního gradientu (frakce č. 5 – 7) připravené ze sklizených buněk HEK293, které obsahovaly největší zastoupení plazmatických membrán. Membrány byly naředěny TE pufrém (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,6) v poměru 1:3. Vzniklý roztok byl centrifugován na předem vychlazené ultracentrifuze Beckman Optima Max (rotor MLA80) 35 min při 28000 x g a 4°C. Po centrifugaci byl odstraněn vzniklý supernatant a zbylé pelety byly naředěny 600  $\mu$ l TE pufru, promíchány a 30 sekund ručně homogenizovány na ledu. Po homogenizaci byla část směsi odebrána na stanovení koncentrace proteinů podle Lowryho. Výsledky koncentrace bílkovin jsou uvedeny v následující **tabulce X**. Vzorky membrán o známé koncentraci bylo nutné naředit na jednotnou koncentraci TE pufrém, a to na 0,2 mg/ml.

K připraveným vzorkům (1 ml) byl za stálého míchání přidán 1  $\mu$ l 1mM zásobního roztoku DPH, čímž bylo dosaženo 1 $\mu$ M finální koncentrace DPH ve vzorku. Vzorky byly inkubovány 45 min v temnu při laboratorní teplotě.

### **5.7.3. Měření anizotropie DPH**

Intenzita fluorescence byla měřena při 25°C v křemenné kyvetě o rozměrech 1 x 1 cm. Použitým přístrojem byl spektrofluorimetr PC1 od firmy ISS. Emisní vlnová délka byla 425 nm a excitační vlnová délka 365 nm. Byly také použity polarizátory, které umožňují právě sledování změn anizotropie DPH.

## 6. Výsledky

### 6.1. Aplikace ethinylestradiolu potkanům

Experimentálním zvířatům byl subkutánně podáván roztok ethinylestradiolu v propylenglykolu o dvou koncentracích (0,1 mg/kg a 1 mg/kg) po dobu deseti dní. Kontrolním zvířatům byl injikován samotný propylenglykol. Každá skupina obsahovala 10 jedinců. Na začátku a konci experimentu byla zvířata zvážena. Naměřené hodnoty obsahuje následující **tabulka VI**.

Na konci experimentu byl zjištěn výrazný rozdíl mezi hmotnostmi potkanů různých skupin. Kontrolním zvířatům stoupla tělesná váha o 12 %, zatímco potkanům vystaveným ethinylestradiolu tělesná váha klesla o 11 % u nižší dávky ethinylestradiolu (0,1 mg/kg) a o 18 % u vyšší dávky ethinylestradiolu (1 mg/kg). Úbytek váhy experimentálních zvířat demonstruje toxický vliv ethinylestradiolu, který je přímo úměrný zvyšující se koncentraci podané látky.

**Tabulka VI – Celková tělesná hmotnost potkanů před a po experimentu**

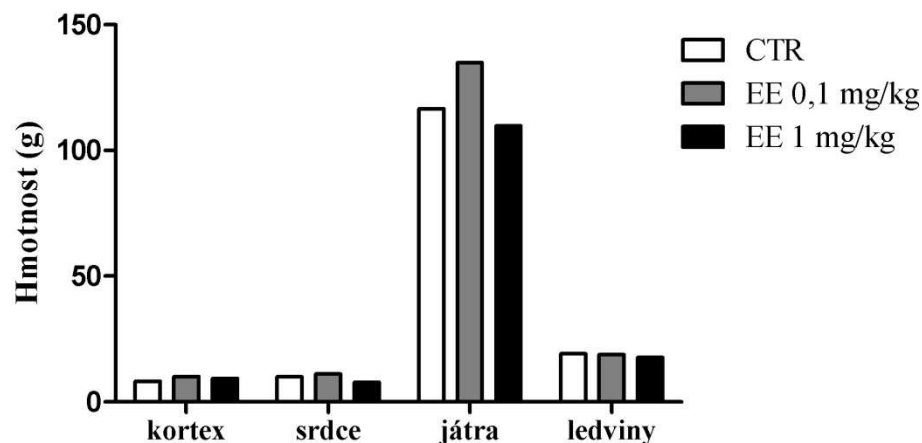
	před experimentem	po experimentu		
		CTR	EE 0,1mg/kg	EE 1mg/kg
<b>Průměrná hmotnost (g)</b>	277 ± 20	311 ± 15	246 ± 23	226 ± 18

Po pitvě na konci experimentu byly také zváženy vypreparované orgány, jejichž hodnoty obsahuje následující **tabulka VII** a pro přehlednost také **graf č. 1**. Nejvýraznější rozdíl je patrný u hmotnosti jater, hmotnost ostatních orgánů nebyla výrazně změněna. U skupiny EE 0,1 mg/kg byl zaznamenán 16% nárůst hmotnosti jater oproti kontrolám, oproti tomu u skupiny EE 1 mg/kg byl zaznamenán 6% pokles hmotnosti jater.

**Tabulka VII – Celková hmotnost orgánů po pitvě**

	CTR:	EE 0,1 mg/kg:	EE 1 mg/kg:
<b>Kortex (g)</b>	8,16	10,11	9,27
<b>Srdce (g)</b>	9,88	11,12	7,84
<b>Játra (g)</b>	116,61	134,91	109,86
<b>Ledviny (g)</b>	19,13	18,79	17,68





**Graf č. 1 – Porovnání hmotnosti orgánů potkanů kontrolní skupiny a skupin vystavených ethinylestradiolu o koncentracích 0,1 a 1 mg/kg**

## 6.2. Stanovení koncentrace proteinů Lowryho metodou

Koncentrace proteinů byla stanovena ve vzorcích paralelně ke všem probíhajícím měřením. Stanovení se provádělo vždy v triplikátu a jednotlivé hodnoty byly zprůměrovány. Výsledky byly vyhodnoceny programem GraphPad Prism. S pomocí nelineární regrese pro polynom 2. řádu  $y = ax^2 + bx + c$  byl určen tvar kalibrační křivky, ze kterého se stanovilo množství proteinů ve všech vzorcích.

Koncentrace proteinů byla měřena ve vzorcích PNS (viz. **Tabulka VIII**) a frakcích flotačního sacharóзовého gradientu (viz. **Tabulka IX**) připraveného ze sklizených buněk linie HEK293 kontrolních, tak ovlivněných ethinylestradiolem. Obdobně probíhalo měření v PNS připraveném z tkání potkanů kontrolních a těch ovlivněných ethinylestradiolem (viz. **Tabulka XI**). Koncentrace proteinů byla také stanovena ve směsi 3 frakcí sacharóзовého flotačního gradientu (5. – 7. frakce), která byla využita pro stanovení rovnovážné anizotropie DPH (viz **Tabulka X**).

**Tabulka VIII – Koncentrace bílkovin v PNS z buněčné linie HEK293**

	CTR	EE 10 ng/ml	EE 100 ng/ml
PNS	koncentrace bílkovin, mg/ml		
	18,34	22,70	26,74

**Tabulka IX – Koncentrace bílkovin v jednotlivých frakcích**

Č. frakce	CTR	EE 10 ng/ml	EE 100 ng/ml
	koncentrace bílkovin, mg/ml		
1	0,36	0,31	0,38
2	0,34	0,29	0,38
3	0,35	0,37	0,44
4	0,34	0,33	0,4
5	0,41	0,39	0,54
6	0,56	0,67	0,91
7	0,83	0,85	0,99
8	1,07	1,13	1,51
9	1,32	1,6	1,87
10	1,35	1,89	2,16
11	2,19	2,69	3,61

**Tabulka X – Koncentrace bílkovin ve směsi frakcí č. 5 + 6 + 7**

Č. frakce	CTR	EE 10 ng/ml	EE 100 ng/ml
	koncentrace bílkovin, mg/ml		
5+6+7	0,71	0,77	0,95

**Tabulka XI – Koncentrace bílkovin v PNS jednotlivých vzorků tkání**

PNS	CTR	EE 0,1 mg/kg	EE 1 mg/kg
	koncentrace bílkovin, mg/ml		
mozek	11,08	6,27	9,32
srdce	15,05	11,15	13,81
játra	21,79	15,59	22,05
ledviny	20,30	17,91	25,27

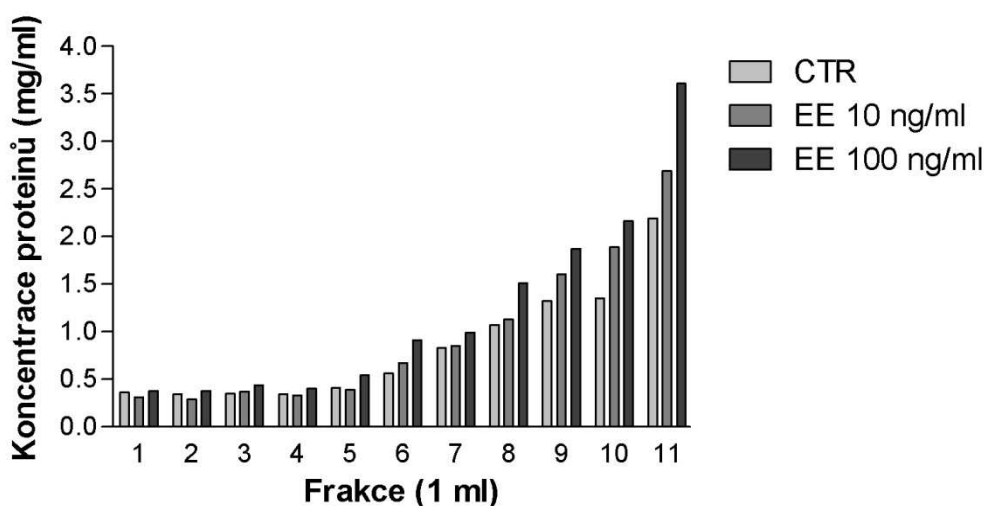
### 6.3. Frakcionace postnukleárního supernatantu s pomocí gradientové centrifugace - sacharózový flotační gradient

Následující **tabulka XII** znázorňuje množství proteinů o výchozí koncentraci aplikované na sacharózový flotační gradient připravený ze sklizených buněk linie HEK293, a to jak kontrolních, tak ovlivněných ethinylestradiolem (10 a 100 ng/ml).

**Tabulka XII – Množství proteinů aplikované na sacharózový flotační gradient**

	CTR	EE 10 ng/ml	EE 100 ng/ml
Koncentrace proteinů (mg/ml)	18,34	22,70	26,74
Celkový objem buněčné frakce (ml)	2,00	2,00	2,00
Celkový obsah proteinů (mg)	<b>36,68</b>	<b>45,40</b>	<b>53,48</b>

Ve frakcích sacharózového flotačního gradientu byla určena koncentrace proteinů Lowryho metodou, jak bylo uvedeno v předchozí **tabulce IX**. Distribuce proteinů je znázorněna na následujícím **grafu č. 2**.



**Graf č. 2 – Distribuce proteinů ve frakcích sacharózového flotačního gradientu připraveného ze sklizených buněk linie HEK293 kontrolních a ovlivněných ethinylestradiolem o koncentracích 10 a 100 ng/ml**

#### 6.4. Jednobodové stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu v postnukleárním supernatantu z buněčné linie HEK293

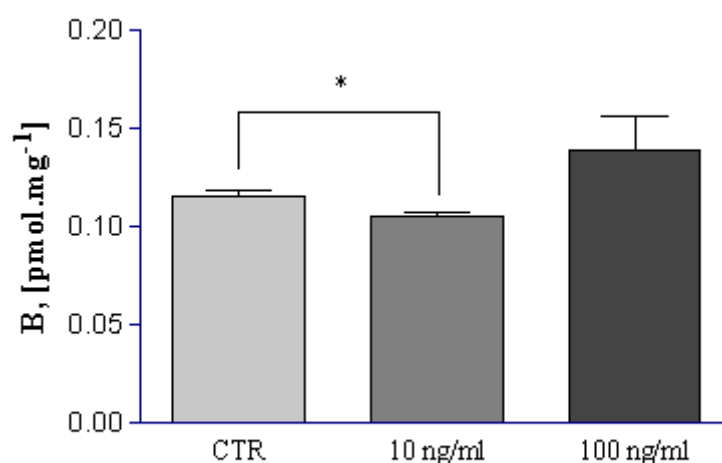
Stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu bylo provedeno v PNS připraveném ze sklizených buněk linie HEK293, a to jak kontrolních, tak ovlivněných ethinylestradiolem (10 a 100 ng/ml). Byla použita pouze jedna koncentrace radioligandu, a to 20nM. Pro měření byl použit vzorek PNS, který byl 10x naředěn dH<sub>2</sub>O. Výchozí koncentrace bílkovin v jednotlivých vzorcích je uvedena jednotlivých v **tabulce XIII**. Získané výsledky vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu jsou uvedeny v **tabulce XIV**. Experiment byl prováděn v triplicátech, pro přehlednost jsou uvedeny průměrné hodnoty.

**Tabulka XIII – Množství proteinů v PNS ze sklizených buněk linie HEK293**

	<b>CTR</b>	<b>EE (10 ng/ml)</b>	<b>EE (100 ng/ml)</b>
Koncentrace proteinů (mg/ml)	18,34	22,70	26,74
Celkový objem buněčné frakce (ml)	2,79	2,90	3,00
Celkový obsah proteinů (mg)	<b>51,17</b>	<b>65,83</b>	<b>80,22</b>

**Tabulka XIV – Vazba [<sup>3</sup>H]ouabainu v PNS ze sklizených buněk linie HEK293**

<b>PNS</b>	<b>CTR</b>	<b>EE (10 ng/ml)</b>	<b>EE (100 ng/ml)</b>
Koncentrace proteinů v inkubační směsi (mg/ml)	0,18	0,23	0,27
Celková vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu (pmol/mg)	0,12	0,11	0,14
Celkový obsah proteinů (mg)	51,17	65,83	80,22
Celková vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu (pmol)	<b>5,90</b>	<b>6,91</b>	<b>11,14</b>



**Graf č. 3 - Jednobodové stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu v PNS ze sklizených buněk linie HEK293 kontrolních a ovlivněných ethinylestradiolem o koncentracích 10 a 100 ng/ml. Vazba [<sup>3</sup>H]ouabainu byla stanovena při celkové koncentraci 20nM.**

Ve všech experimentech byl ke statistickému vyhodnocení použit nepárový T - test. Ze statistického vyhodnocení (viz. **Tabulka XV**) vyplývá, že pokles vazby v PNS u vzorků vystavených působení EE 10 ng/ml je signifikantní ( $P < 0,05$ ), oproti tomu naměřený vzestup vazby u skupiny vystavené EE 100 ng/ml je nesignifikantní ( $P < 0,05$ ;  $P > 0,05$ ).

**Tabulka XV - Statistické výsledky jednobodového stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu**

Typ vazby	Vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu v PNS č. 2			
	CTR	EE 10 ng/ml	CTR	EE 100 ng/ml
B <sub>sp</sub> (pmol/ mg)	0,12	0,11	0,12	0,14
T- Test (nepárový)				
P hodnota	P < 0,05		P > 0,05	
Signifikance	signifikantní, *		nesignifikantní	

## 6.5. Jednobodové stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu ve frakcích sacharózového flotačního gradientu z buněčné linie HEK293

Stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu bylo provedeno ve frakcích sacharózového flotačního gradientu připraveného ze sklizených buněk linie HEK293, a to jak kontrolních, tak ovlivněných ethinylestradiolem (10 a 100 ng/ml). Byla použita pouze jedna koncentrace radioligandu, a to 20nM. Získané výsledky celkové vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu jsou uvedeny v **tabulce XVI**, výtěžnost vazby v **tabulce XVII**. Pro přehlednost jsou v tabulkách uváděny průměrné hodnoty.

### Tabulka XVI - Celková vazba [<sup>3</sup>H]ouabainu ve frakcích sacharózového flotačního gradientu připraveného ze sklizených buněk linie HEK293

A) Kontrolní buňky, B) Buněčná linie HEK293 vystavená ethinylestradiolu (10 ng/ml), C) Buněčná linie HEK293 vystavená ethinylestradiolu (100 ng/ml)

#### A) Kontrolní buňky

Číslo frakce	Celková vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu (fmol/150 µl)	Celková vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu ve frakci (fmol/ml)	Celková vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu (fmol/mg)
1	4,09	27,31	75,81
2	8,00	53,37	156,90
3	19,98	133,26	380,55
4	38,91	259,54	762,96
5	62,15	414,53	1010,55
6	198,38	1323,22	2361,71
7	259,26	1729,27	2082,42
8	56,65	377,86	352,96
9	24,56	163,83	124,06
10	41,2	274,82	203,47
11	115,57	770,83	351,80
<b>Celková vazba [<sup>3</sup>H]ouabainu ve všech frakcích (fmol)</b>			
<b>1 - 11</b>	<b>828,76</b>	<b>5527,85</b>	<b>7863,19</b>

**B. Buněčná linie vystavená ethinylestradiolu (10 ng/ml)**

Číslo frakce	Celková vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu (fmol/150 µl)	Celková vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu ve frakci (fmol/ml)	Celková vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu (fmol/mg)
1	5,78	38,53	124,22
2	9,74	64,95	223,86
3	14,73	98,26	265,45
4	21,37	142,54	431,72
5	89,84	599,22	1535,70
6	386,80	2579,99	3848,80
7	198,68	1325,16	1558,24
8	32,51	216,85	191,81
9	15,86	105,78	66,08
10	19,02	126,90	67,11
11	34,22	228,25	84,81
<b>Celková vazba [<sup>3</sup>H]ouabainu ve všech frakcích (fmol)</b>			
<b>1 - 11</b>	<b>828,55</b>	<b>5526,43</b>	<b>8397,78</b>

**C. Buněčná linie vystavená ethinylestradiolu (100 ng/ml)**

Číslo frakce	Celková vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu (fmol/150 µl)	Celková vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu ve frakci (fmol/ml)	Celková vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu (fmol/mg)
1	4,73	31,55	82,98
2	8,19	54,61	143,64
3	14,51	96,76	219,81
4	22,24	148,37	370,74
5	117,69	784,97	1452,92
6	462,12	3082,36	3385,51
7	191,60	1277,97	1290,24
8	25,61	170,81	113,07
9	13,17	87,84	46,95
10	20,87	139,18	64,40
11	35,72	238,24	65,96

<b>Celková vazba [<sup>3</sup>H]ouabainu ve všech frakcích (fmol)</b>			
<b>1 - 11</b>	<b>919,44</b>	<b>6112,66</b>	<b>7236,22</b>

**Tabulka XVII - Výtěžnost vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu po flotaci sacharózového gradientu v podbuněčné frakci a v PNS připraveném ze sklizených buněk linie HEK293 kontrolních a ovlivněných ethinylestradiolem o koncentracích 10 a 100 ng/ml**

	<b>CTR</b>	<b>EE (10 ng/ml)</b>	<b>EE (100 ng/ml)</b>
Celková vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu v PNS (fmol)	5899,90	6905,60	11142,60
Celková vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu ve všech frakcích gradientu (fmol)	5527,85	5526,43	6112,66
<b>Výtěžnost</b>			
	<b>CTR</b>	<b>EE (10 ng/ml)</b>	<b>EE (100 ng/ml)</b>
Sacharózový gradient / PNS	94 %	80 %	55 %

**Tabulka XVIII - Distribuce vazby ouabainu ve frakcích po flotaci sacharózového gradientu** (frakci č. 7, která obsahuje plazmatické membrány, bylo přiřazeno 100% množství vazby pro znázornění její distribuce)

<b>CTR</b>				
<b>Č. frakce</b>	<b>Vazba (fmol/mg)</b>	<b>Celkový protein (mg/frakce)</b>	<b>Celková vazba (fmol/frakce)</b>	<b>Procenta (%)</b>
1	75,81	0,36	27,31	2
2	156,9	0,34	53,37	3
3	380,55	0,35	133,26	8
4	762,96	0,34	259,54	15
5	1010,55	0,41	414,53	24
6	2361,71	0,56	1323,22	77
7	2082,42	0,83	1729,27	100
8	352,96	1,07	377,86	22
9	124,06	1,32	163,83	9
10	203,47	1,35	274,82	16
11	351,8	2,19	770,83	45

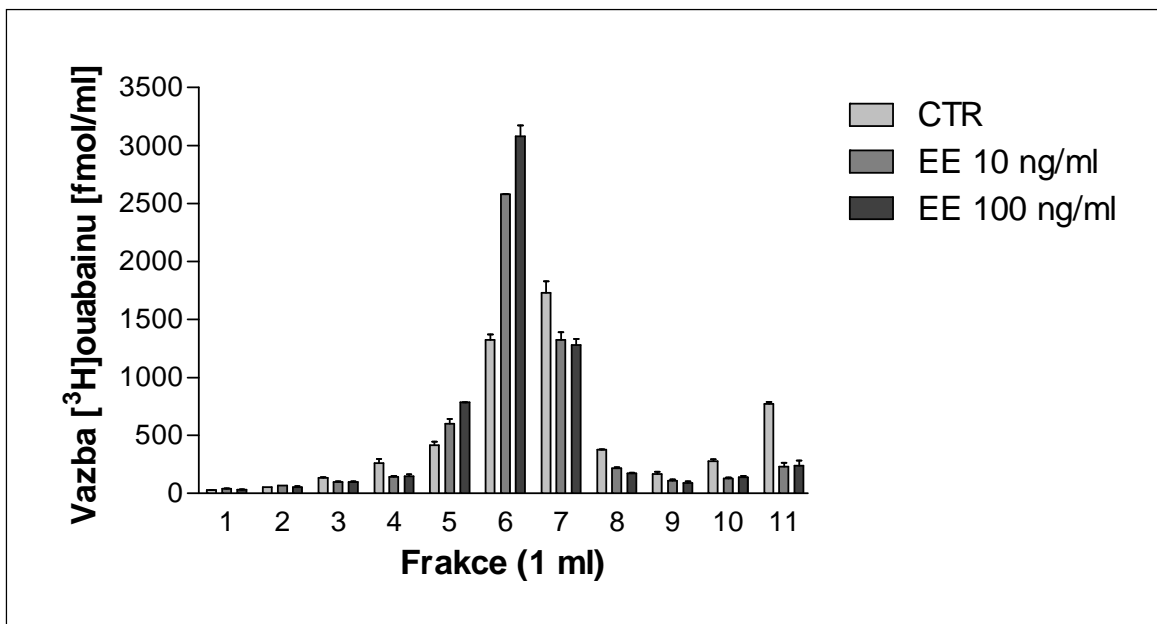


<b>EE 10 ng/ml</b>				
<b>Č. frakce</b>	<b>Vazba (fmol/mg)</b>	<b>Celkový protein (mg/frakce)</b>	<b>Celková vazba (fmol/frakce)</b>	<b>Procenta (%)</b>
1	124,22	0,31	38,53	3
2	223,86	0,29	64,95	5
3	265,45	0,37	98,26	7
4	431,72	0,33	142,54	11
5	1535,7	0,39	599,22	45
6	3848,8	0,67	2579,99	195
7	1558,24	0,85	1325,16	100
8	191,81	1,13	216,85	16
9	66,08	1,6	105,78	8
10	67,11	1,89	126,9	10
11	84,81	2,69	228,25	17

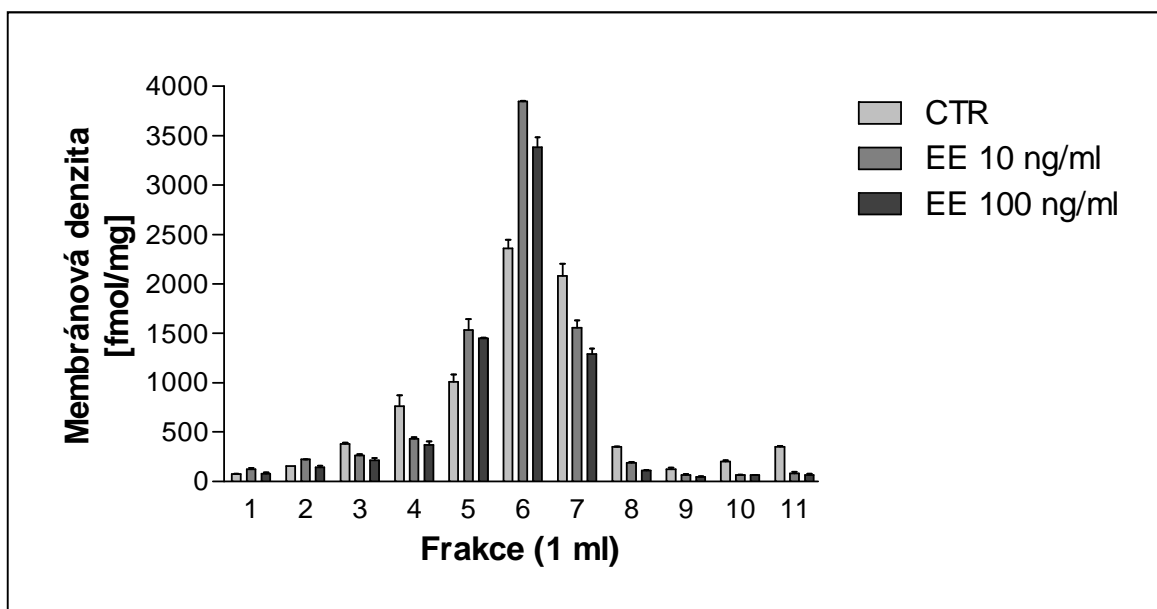
<b>EE 100 ng/ml</b>				
<b>Č. frakce</b>	<b>Vazba (fmol/mg)</b>	<b>Celkový protein (mg/frakce)</b>	<b>Celková vazba (fmol/frakce)</b>	<b>Procenta (%)</b>
1	82,98	0,38	31,55	2
2	143,64	0,38	54,61	4
3	219,81	0,44	96,76	8
4	370,74	0,4	148,37	12
5	1452,92	0,54	784,97	61
6	3385,51	0,91	3082,36	241
7	1290,24	0,99	1277,97	100
8	113,07	1,51	170,81	13
9	46,95	1,87	87,84	7
10	64,4	2,16	139,18	11
11	65,96	3,61	238,24	19

Následuje grafické znázornění výsledků z jednobodového stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu ve frakcích sacharózového flotačního gradientu připraveného ze sklizených

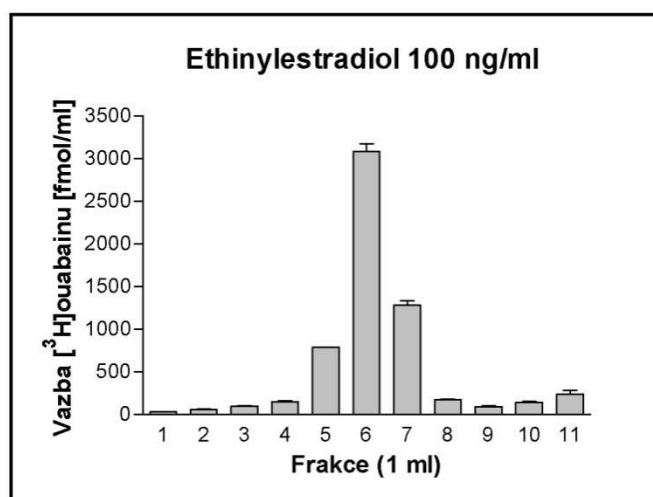
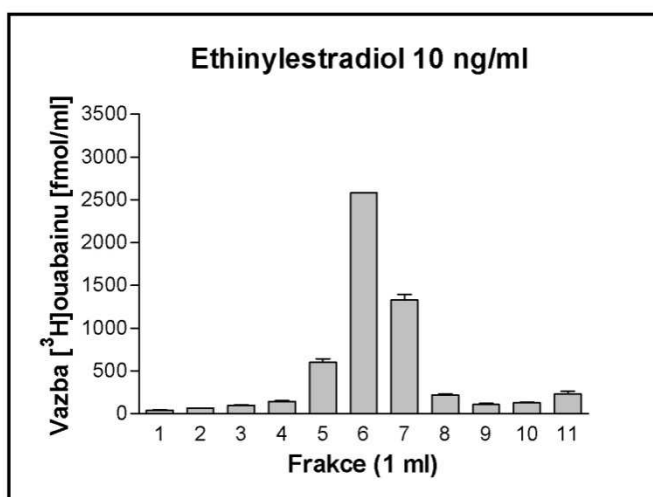
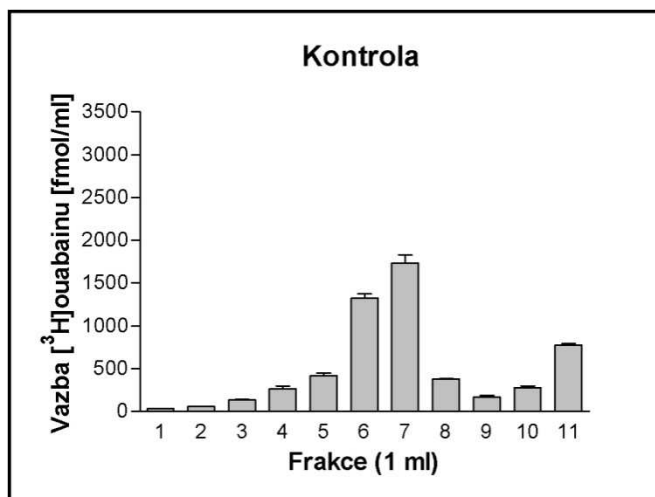
buněk linie HEK293. V **grafu č. 4** je znázorněna celková vazba [<sup>3</sup>H]ouabainu a v **grafu č. 5** membránová denzita. Následně jsou pro názornost uvedeny 2 soubory grafů, obsahující celkovou vazbu [<sup>3</sup>H]ouabainu (viz. **Graf č. 6**) a membránovou denzitu (viz. **Graf č. 7**) pro jednotlivé experimentální skupiny.



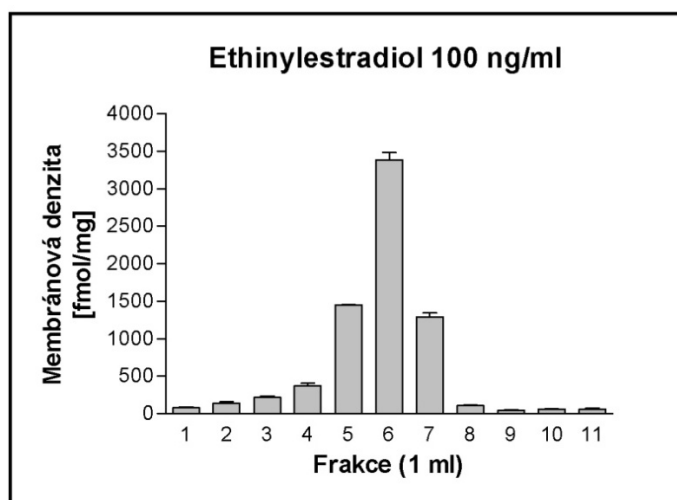
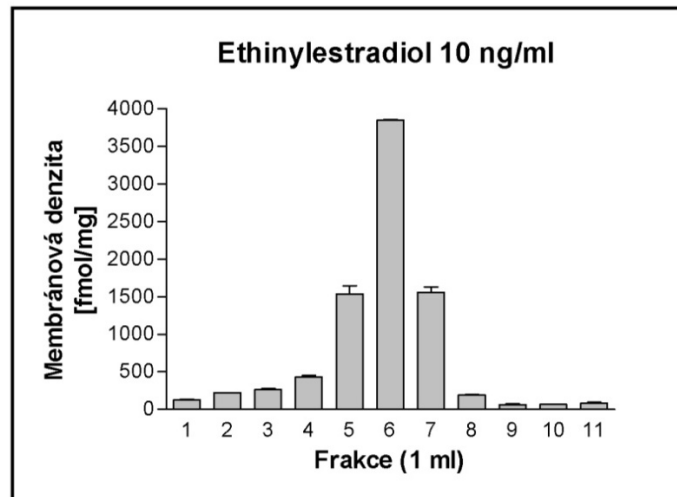
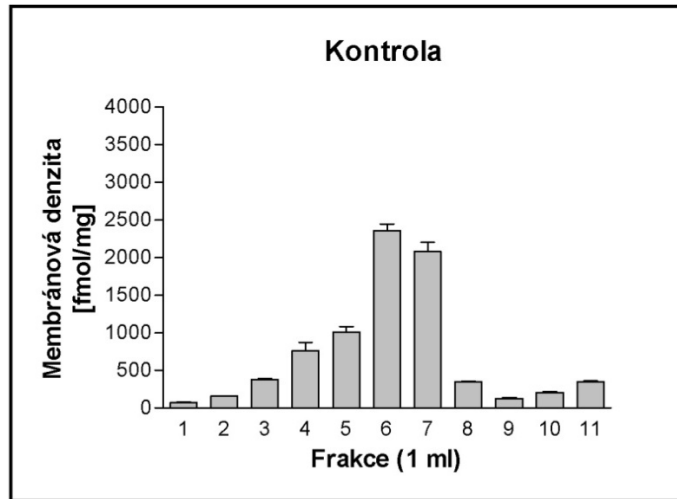
**Graf č. 4 – Profil gradientu - vazba [<sup>3</sup>H]ouabainu ve frakcích sacharóзовého gradientu připraveného ze sklizených buněk linie HEK293 kontrolních a ovlivněných ethinylestradiolem o koncentracích 10 a 100 ng/ml**



**Graf č. 5 – Membránová denzita ve frakcích sacharóзовého gradientu připraveného ze sklizených buněk linie HEK293 kontrolních a ovlivněných ethinylestradiolem o koncentracích 10 a 100 ng/ml**



**Graf č. 6 – Celková vazba [<sup>3</sup>H]ouabainu ve frakcích sacharózového gradientu připraveného ze sklizených buněk linie HEK293 kontrolních a ovlivněných ethinylestradiolem o koncentracích 10 a 100 ng/ml**



**Graf č. 7 – Membránová denzita ve frakcích sacharózového gradientu připraveného ze sklizených buněk linie HEK293 kontrolních a ovlivněných ethinylestradiolem o koncentracích 10 a 100 ng/ml**

Pro statistické zhodnocení byly vybrány 3 frakce, ve kterých se předpokládá největší zastoupení plasmatických membrán. Z vyhodnocení vyplývá (viz. **Tabulka XIX**), že změna vazby u koncentrace EE 10 ng/ml i EE 100 ng/ml je velmi signifikantní vzhledem ke kontrole, a to ve všech vybraných frakcích. Vyhodnocení součtu vybraných frakcí však přineslo nespécifický výsledek.

**Tabulka XIX - Statistické výsledky jednobodového stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu ve vybraných frakcích ze sacharóзовého flotačního gradientu**

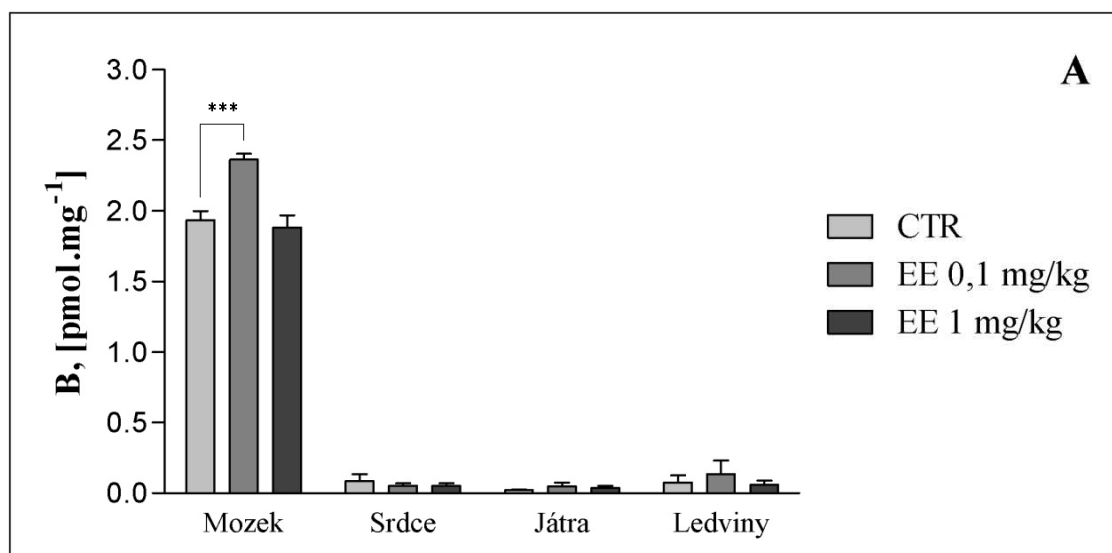
Typ vazby	Vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu v 5. frakci gradientu			
	CTR	EE 10 ng/ml	CTR	EE 100 ng/ml
B <sub>sp</sub> (fmol/ mg)	1010,55	1535,70	1010,55	1452,92
T- Test (nepárový)				
P hodnota	P < 0,001		P < 0,001	
Signifikance	signifikantní, ***		signifikantní, ***	
Typ vazby	Vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu v 6. frakci gradientu			
	CTR	EE 10 ng/ml	CTR	EE 100 ng/ml
B <sub>sp</sub> (fmol/ mg)	2361,71	3848,80	2361,71	3385,51
T- Test (nepárový)				
P hodnota	P < 0,001		P < 0,001	
Signifikance	signifikantní, ***		signifikantní, ***	
Typ vazby	Vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu v 7. frakci gradientu			
	CTR	EE 10 ng/ml	CTR	EE 100 ng/ml
B <sub>sp</sub> (fmol/ mg)	2082,42	1558,24	2082,42	1290,24
T- Test (nepárový)				
P hodnota	P < 0,001		P < 0,001	
Signifikance	signifikantní, ***		signifikantní, ***	
Typ vazby	Vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu v 5. - 7. frakci gradientu			
	CTR	EE 10 ng/ml	CTR	EE 100 ng/ml
B <sub>sp</sub> (fmol/ mg)	1818,23	2314,25	1818,23	2042,89
T- Test (nepárový)				
P hodnota	P > 0,05		P > 0,05	
Signifikance	nesignifikantní		nesignifikantní	

## 6.6. Jednobodové stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu v postnukleárním supernatantu z tkání potkanů

Stanovení specifické vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu bylo provedeno v PNS připraveném z homogenátu tkání potkanů, a to jak skupiny kontrolní, tak skupin ovlivněných ethinylestradiolem (0,1 a 1 mg/kg). Byla použita pouze jedna koncentrace radioligandu - 19nM. Pro přehlednost jsou v následující **tabulce XX** uvedeny průměrné hodnoty specifické vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu vztažené na mg bílkoviny PNS. Získané výsledky jsou znázorněny v **grafu č. 8**.

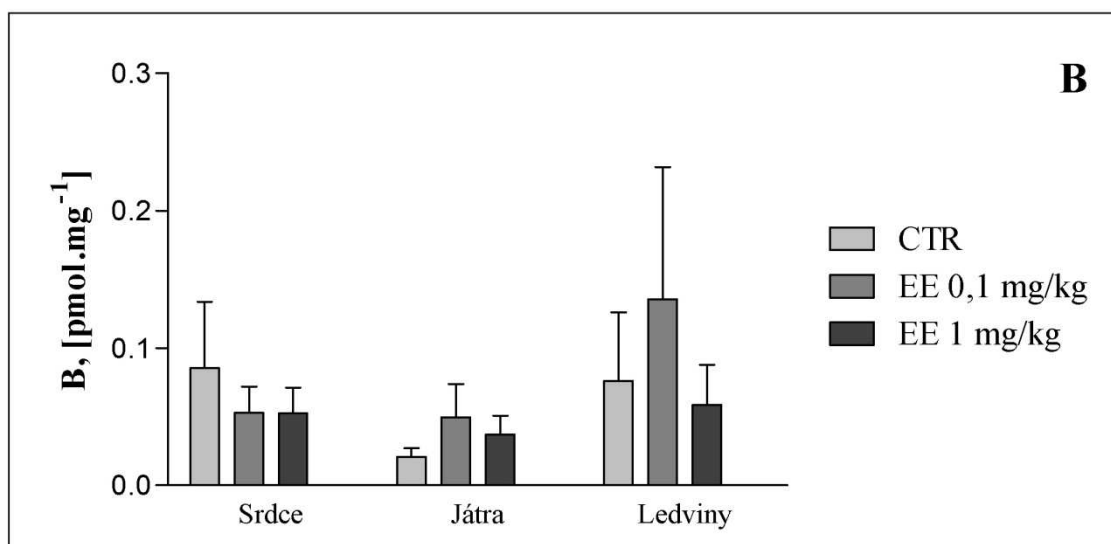
**Tabulka XX – Specifická vazba [<sup>3</sup>H]ouabainu v PNS z tkání kontrolních potkanů a potkanů vystavených působení ethinylestradiolu o koncentracích 0,1 a 1 mg/kg**

<b>B (pmol/ mg)</b>	<b>CTR</b>	<b>EE 0,1 mg/kg</b>	<b>EE 1 mg/kg</b>
Mozek	1,93	2,36	1,88
Srdce	0,09	0,05	0,05
Játra	0,02	0,05	0,04
Ledviny	0,08	0,14	0,06



**Graf č. 8 - Specifická vazba [<sup>3</sup>H]ouabainu v PNS z tkání kontrolních potkanů a potkanů vystavených působení ethinylestradiolu o koncentracích 0,1 a 1 mg/kg**

A) všechny 4 druhy tkání, B) tkáně s velmi nízkou a nízkoafinní vazbou



**Graf č. 8 - Specifická vazba [³H]ouabainu v PNS z tkání kontrolních potkanů a potkanů vystavených působení ethinylestradiolu o koncentracích 0,1 a 1 mg/kg**

A) všechny 4 druhy tkání, B) tkáně s velmi nízkou a nízkoafinní vazbou

Ze statistického vyhodnocení (viz. **Tabulka XXI**) vyplývá, že signifikantní nárůst vazby byl naměřen pouze ve vzorcích šedé kůry mozkové, a to u nižší koncentrace ethinylestradiolu 0,1 mg/kg ( $P < 0,001$ ). V ostatních tkáních byla velmi nízká a nízkoafinní vazba, která nepřinesla žádný signifikantní výsledek.

**Tabulka XXI - Statistické výsledky jednobodového stanovení vazby [³H]ouabainu**

Typ vazby	Vazba [³H]ouabainu v PNS ze šedé kůry mozkové			
	CTR	EE 0,1 mg/kg	CTR	EE 1 mg/kg
B <sub>sp</sub> (pmol/ mg)	1,93	2,36	1,93	1,88
T- Test (nepárový)				
P hodnota	P < 0,001		P > 0,05	
Signifikance	signifikantní, ***		nesignifikantní	
Typ vazby	Vazba [³H]ouabainu v PNS ze srdce			
	CTR	EE 0,1 mg/kg	CTR	EE 1 mg/kg
B <sub>sp</sub> (pmol/ mg)	0,09	0,05	0,09	0,05
T- Test (nepárový)				
P hodnota	P > 0,05		P > 0,05	
Signifikance	nesignifikantní		nesignifikantní	

Typ vazby	Vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu v PNS z jater			
	CTR	EE 0,1 mg/kg	CTR	EE 1 mg/kg
B <sub>sp</sub> (pmol/ mg)	0,02	0,05	0,02	0,04
T-Test (nepárový)				
P hodnota	P > 0,05		P > 0,05	
Signifikance	nesignifikantní		nesignifikantní	
Typ vazby	Vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu v PNS z ledvin			
	CTR	EE 0,1 mg/kg	CTR	EE 1 mg/kg
B <sub>sp</sub> (pmol/ mg)	0,08	0,14	0,08	0,06
T-Test (nepárový)				
P hodnota	P > 0,05		P > 0,05	
Signifikance	nesignifikantní		nesignifikantní	

### 6.7. Stanovení saturační vazebné křivky [<sup>3</sup>H]ouabainu v postnukleárním supernatantu z šedé kůry mozkové potkana

Stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu bylo provedeno v PNS připraveném z homogenátu šedé kůry mozkové kontrolních potkanů a potkanů vystavených působení ethinylestradiolu o koncentracích 0,1 a 1 mg/kg. Byla použita koncentrační řada radioligandu, jejíž hodnoty jsou uvedeny v následující **tabulce XXII**. Pro přehlednost jsou v následující **tabulce XXII** uvedeny pouze zprůměrované výsledky celkové vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu.

**Tabulka XXII - Hodnoty B<sub>sp</sub> a B<sub>sp</sub>/F pro vazbu [<sup>3</sup>H]ouabainu v PNS ve vzorcích z šedé kůry mozkové potkana**

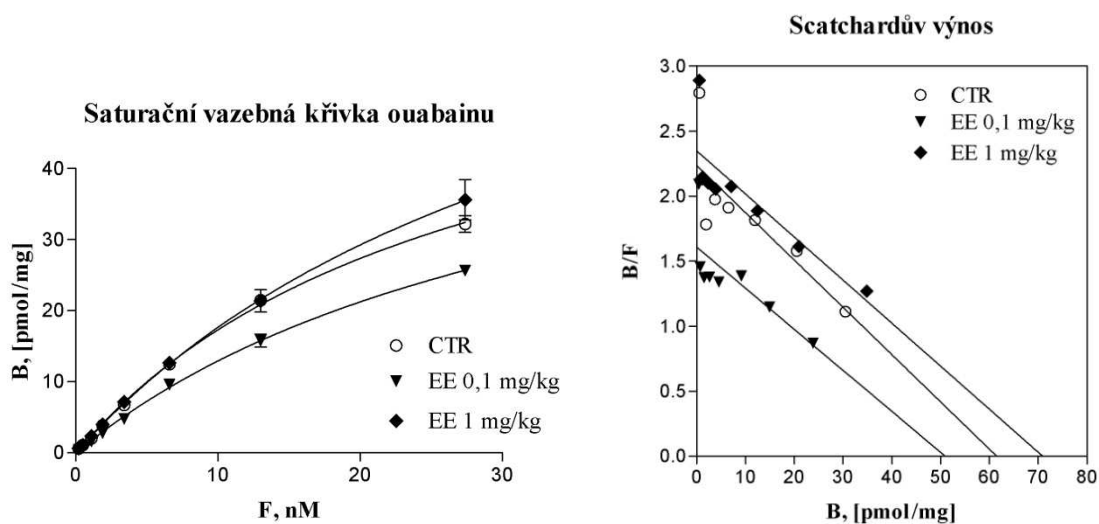
Č. vzorku	F, nM	CTR		EE 0,1 mg/kg		EE 1 mg/kg	
		B <sub>sp</sub> (pmol/ mg)	B <sub>sp</sub> /F	B <sub>sp</sub> (pmol/ mg)	B <sub>sp</sub> /F	B <sub>sp</sub> (pmol/ mg)	B <sub>sp</sub> /F
<b>T8</b>	0,2	0,56	2,80	0,42	2,09	0,58	2,89
<b>T7</b>	0,5	1,07	2,13	0,73	1,46	1,07	2,14
<b>T6</b>	1,1	1,96	1,78	1,51	1,37	2,32	2,10
<b>T5</b>	1,9	3,76	1,98	2,62	1,38	3,91	2,06
<b>T4</b>	3,4	6,51	1,91	4,56	1,34	7,06	2,08
<b>T3</b>	6,6	11,99	1,82	9,16	1,39	12,46	1,89
<b>T2</b>	13	20,55	1,58	14,95	1,15	20,99	1,62
<b>T1</b>	27,4	30,51	1,11	23,85	0,87	34,84	1,27



Maximální počet vazebných míst  $B_{max}$  a disociační konstanta  $K_d$  vyjadřující celkovou afinitu receptoru lze stanovit ze saturační vazebné křivky [ $^3\text{H}$ ]ouabainu nebo ze Scatchardova výnosu (viz. **Graf č. 9**). Saturační křivka a její parametry byly získány přímým fitováním dat programem GraphPad Prism (nelineární regrese), zatímco ze Scatchardova výnosu se data vypočítala lineární regresí. Stanovené hodnoty u vzorků ze všech 3 skupin shrnuje následující **tabulka XXIII**.

**Tabulka XXIII – Hodnoty maximálního počtu vazebných míst a disociační konstanty stanovené ze saturační vazebné křivky a Scatchardova výnosu ze vzorků PNS z šedé kůry mozkové potkanů**

Saturační křivka	CTR	EE 0,1 mg/kg	EE 1 mg/kg
$B_{max}$ (pmol/mg)	60,47	52,67	82,24
$K_d$ (nM)	26,50	32,97	37,40
Scatchardův výnos	CTR	EE 0,1 mg/kg	EE 1 mg/kg
$B_{max}$ (pmol/mg)	61,54	50,98	70,97
$K_d$ (nM)	27,50	31,68	30,21



**Graf č. 9 - Vazba [ $^3\text{H}$ ]ouabainu v PNS z šedé kůry mozkové kontrolních potkanů a potkanů vystavených působení ethinylestradiolu o koncentracích 0,1 a 1 mg/kg**

Ze statistického vyhodnocení (viz. **Tabulka XXIV**) vyplývá, že velmi signifikantní pokles vazby se vyskytl u nižší koncentrace ethinylestradiolu 0,1 mg/kg vzhledem

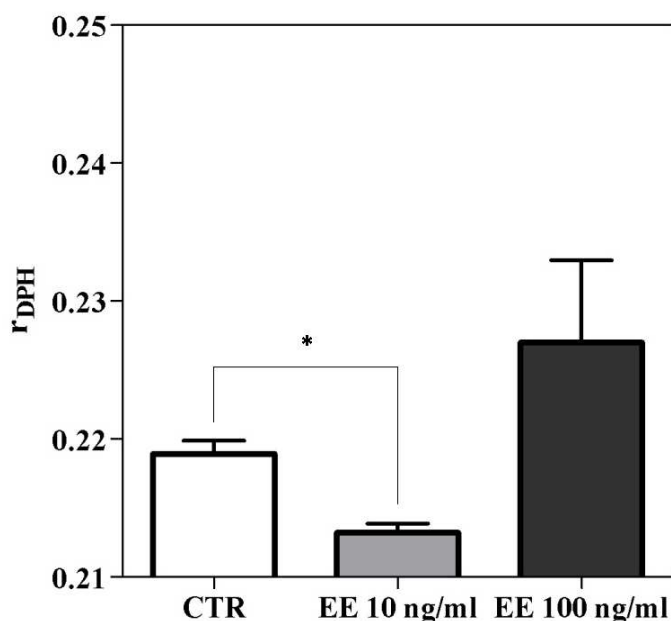
ke kontrole. Oproti tomu u vyšší koncentrace ethinylestradiolu 1 mg/kg byl naměřen méně signifikantní nárůst vazby oproti kontrole.

**Tabulka XXIV - Statistické vyhodnocení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu v PNS z šedé kůry mozkové potkanů**

Typ vazby	Vazba [ <sup>3</sup> H]ouabainu v PNS z šedé kůry mozkové			
	CTR	EE 0,1 mg/kg	CTR	EE 1 mg/kg
B <sub>max</sub> (pmol/ mg)	60,47	52,67	60,47	82,24
K <sub>d</sub> (nM)	26,50	32,97	26,50	37,40
T-Test (nepárový)	B <sub>max</sub>		B <sub>max</sub>	
P hodnota	P < 0,01		P < 0,05	
Signifikance	signifikantní, **		signifikantní, *	
T-Test (nepárový)	K <sub>d</sub>		K <sub>d</sub>	
P hodnota	P < 0,05		P > 0,05	
Signifikance	signifikantní, *		nesignifikantní	

## 6.8. Rovnovážná anizotropie DPH

Zprůměrované naměřené hodnoty anizotropie DPH v plazmatických membránách připravených z buněčné linie HEK293 centrifugací sacharózového flotačního gradientu jsou graficky znázorněny v následujícím **grafu č. 10**. Anizotropie je reciproční veličinou fluidity, jejíž změny bylo cílem detekovat.



**Graf č. 10 – Rovnovážná anizotropie DPH v plazmatických membránách HEK293**

Podle **grafu č. 10** je patrné, že byl zaznamenán pokles anizotropie v plazmatických membránách připravených z buněčné linie HEK293 vystavené působení EE o koncentraci 10 ng/ml. Oproti tomu byl zaznamenán vzestup anizotropie v plazmatických membránách připravených z buněčné linie HEK293 vystavené působení EE o koncentraci 100 ng/ml. Podle statistického vyhodnocení byl však pokles anizotropie u skupiny EE 10 ng/ml signifikantní ( $P < 0,01$ ), zatímco u skupiny EE 100 ng/ml byl vzestup anizotropie nesignifikantní ( $P > 0,05$ ).

## 7. Diskuze

Inspirací ke studiu vlivu ethinylestradiolu na  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPázu bylo velké množství studií prováděných v minulosti (Reichen a Paumgartner, 1977; Davis a kol., 1978; Keeffe a kol., 1979; Bossard a kol., 1993; Kitani a Zs-Nagy, 1996). Většina prací však testovala ethinylestradiol na potkanech ve velmi vysokých dávkách (5 mg/kg). Výsledkem těchto experimentů byl významný toxický vliv na játra, který ovšem nešlo nepředpokládat vzhledem k vysoké dávce ethinylestradiolu a jeho farmakokinetice. Proto byly vybrány nižší koncentrace ethinylestradiolu 0,1 a 1 mg/kg. Koncentrace EE 0,1 mg/kg se blíží koncentraci ethinylestradiolu používané v současných preparátech hormonální antikoncepce (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), ale stále je výrazně vyšší. Koncentrace EE 1 mg/kg byla zvolena jako určitý mezistupeň pro porovnání výsledků vlivu koncentrace 0,1 mg/kg a 5 mg/kg. Dalším podnětem pro volbu daných koncentrací byla práce Ochse a kol. (1986), ve které byl aplikován ethinylestradiol potkanům o koncentraci 0,5 mg/kg a práce Džurby a kol. (1997), ve které byl obdobně potkanům aplikován estradiol o koncentraci 0,5 mg/kg.

V případě aplikace ethinylestradiolu do média k buněčným kulturám byly jeho koncentrace voleny obdobně. Cílem bylo opět zvolit 2 koncentrace tak, aby se nižší přibližovala koncentraci ethinylestradiolu používané v současných preparátech hormonální antikoncepce a vyšší měla vliv, který byl již zaznamenán předchozími studiemi. Proto byly vybrány koncentrace 10 a 100 ng/ml. Koncentrace EE 10 ng/ml se blíží koncentraci ethinylestradiolu používané v současných preparátech hormonální antikoncepce (1 ng/ml), ale stále je výrazně vyšší. Koncentrace EE 100 ng/ml byla zvolena na základě práce Goldeny a kol. (1999), ve které byla použita stejná koncentrace estradiolu.

Další rovinou, která byla při volbě koncentrací ethinylestradiolu klíčová, je fakt, že práce Džurby a kol. (1997) a Goldeny a kol. (1999) používaly v experimentech estradiol, který oproti ethinylestradiolu působí obráceně na  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPázu, jejíž aktivitu stimuluje.

V souladu s předchozími studiemi (Keeffe a kol., 1979; Rosario a kol., 1988; Kitani a Zs-Nagy, 1996) byl na konci experimentu byl zjištěn výrazný rozdíl mezi hmotností potkanů z kontrolní skupiny a ze skupin, kterým byl podáván ethinylestradiol. Kontrolním zvířatům stoupla tělesná váha o 12 %, zatímco potkanům vystaveným ethinylestradiolu tělesná váha klesla o 11 % u nižší dávky ethinylestradiolu (0,1 mg/kg) a o 18 % u vyšší dávky ethinylestradiolu (1 mg/kg). Úbytek váhy experimentálních zvířat demonstruje toxický vliv ethinylestradiolu, který je přímo úměrný zvyšující se koncentraci podané látky. Jelikož ale měla zvířata neustálý přístup k potravě, nelze vyloučit rozdíly spotřeby

potravy mezi skupinami. Tento možný vliv rozdílné spotřeby potravy ovšem popírá práce Ochse a kol. (1986), ve které byla použita kontrolní pair-fed skupina zvířat.

V souvislosti se změnou váhy demonstrují předchozí studie (Rosario a kol., 1988; Bossard a kol., 1993; Kitani a Zs-Nagy, 1996) nárůst váhy jater. Předpokládaný nárůst váhy jater u skupiny potkanů, kterým byl podáván ethinylestradiol o koncentraci 1 mg/kg se nepotvrdil. V této skupině byl naopak zaznamenán 6% pokles hmotnosti jater. Oproti tomu u skupiny EE 0,1 mg/kg byl zaznamenán 16% nárůst hmotnosti jater oproti kontrolám.

Stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu bylo nejprve provedeno v PNS připraveném ze sklizených buněk linie HEK293. Byl zjištěn malý pokles celkové vazby o 9 % u skupiny EE 10 ng/ml ( $P < 0,05$ ). U skupiny EE 100 ng/ml byl oproti tomu zaznamenán nárůst celkové vazby (21%), který však, díky relativně velkému rozptylu hodnot, nebyl signifikantní ( $P > 0,05$ ). U vzorků PNS obou skupin vystavených ethinylestradiolu bylo výrazně zvýšeno množství proteinů oproti kontrolám. U skupiny EE 10 ng/ml byl zvýšen obsah proteinů o 29 % a u skupiny EE 100 ng/ml o 57 %. Následkem tohoto nárůstu množství proteinů je nárůst celkové vazby v celkovém PNS získaném z buněčných kultur. Příčinou vyššího obsahu proteinů u vzorků vystavených působení ethinylestradiolu byla skutečnost, že buněčné kultury po přidání ethinylestradiolu lépe prospívaly a rychleji rostly.

Analýza frakcí sacharózového flotačního gradientu byla provedena opět stanovením vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu. Nejvyšší celková vazba se předpokládala ve frakci č. 7, ve které jsou obsaženy plasmatické membrány, avšak byla naměřena ve frakci č. 6, obsahující lehké vezikuly. Vazba ve frakci č. 6 byla výrazně zvýšena u vzorků připravených z buněčných kultur vystavených ethinylestradiolu oproti kontrole. Toto zvýšení nebylo způsobeno zvýšeným obsahem proteinů ve frakci, jak demonstruje graf č. 2 s distribucí proteinů. Tato skutečnost lze odůvodnit kontaminací frakcí lehkých vezikul plasmatickými membránami, která byla způsobena nedostatečným oddělením frakcí v gradientu a jejich vzájemným prolínáním. Kontaminace mohla být také způsobena při ručním rozebírání gradientu. V 5. a 6. frakci byl naměřen signifikantní ( $P < 0,001$ ) nárůst vazby u skupiny EE 0,1 mg/kg i EE 1 mg/kg oproti kontrole, zatímco v 7. frakci signifikantní ( $P < 0,001$ ) pokles vazby u skupiny EE 0,1 mg/kg i EE 1 mg/kg oproti kontrole. Při porovnání celkové vazby v součtu vybraných frakcí č. 5 – 7 nebyla zaznamenána žádná signifikantní změna vazby, což napovídá o zkreslenosti výsledků způsobené kontaminací jednotlivých frakcí.

Stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu bylo obdobně provedeno v PNS z tkání potkanů. Pro analýzu byl vybrán mozek, přesněji šedá kůra mozková, levá komora srdce, játra a kůra ledvin. Ve všech tkáních kromě mozku byla zaznamenána velmi nízká hodnota vazby, což bylo zřejmě způsobeno přítomností izoformy Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy, která má vůči [<sup>3</sup>H]ouabainu nízkou vazebnou afinitu, podobně jako hnědá tuková tkáň. V případě analýzy vzorků PNS z šedé kůry mozkové, byl zaznamenán signifikantní (P < 0,001) 22% nárůst celkové vazby u skupiny EE 0,1 mg/kg. Vedle toho u skupiny EE 1 mg/kg byl zaznamenán 3% pokles celkové vazby, avšak tato změna byla nesignifikantní (P > 0,05).

V PNS z šedé kůry mozkové byla také stanovena saturační vazebná křivka [<sup>3</sup>H]ouabainu. Maximální počet vazebných míst pro [<sup>3</sup>H]ouabain se u skupiny EE 0,1 mg/kg signifikantně (P < 0,01) snížil podle saturační vazebné křivky o 13 % a podle Scatchardova výnosu o 18 %. Oproti tomu u skupiny EE 1 mg/kg se maximální počet vazebných míst pro [<sup>3</sup>H]ouabain signifikantně (P < 0,05) zvýšil, a to podle saturační vazebné křivky o 36 % a podle Scatchardova výnosu o 15 %. Hodnota rovnovážné disociační konstanty se u skupiny EE 0,1 mg/kg signifikantně (P < 0,05) zvýšila podle saturační vazebné křivky o 24 % a podle Scatchardova výnosu o 15 %. U skupiny EE 1 mg/kg se hodnota rovnovážné disociační konstanty zvýšila nesignifikantně (P > 0,05), a to podle saturační vazebné křivky o 41 % a podle Scatchardova výnosu o 9 %. Celkově byla zaznamenána řádová podobnost hodnot B<sub>max</sub> a K<sub>d</sub> získaných ze saturační vazebné křivky a Scatchardova výnosu.

Při porovnání s výsledky jednobodového stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu v PNS z šedé kůry mozkové nelze zaznamenat žádnou podobnost, výsledky jsou protichůdné. Pro objasnění tohoto rozdílu by bylo třeba provést vazebnou studii s použitím roztoků [<sup>3</sup>H]ouabainu připravených naprosto identickým způsobem. Vzhledem k tomu, že odstranění organických rozpouštědel (toluenu) používaných pro stabilizaci základního roztoku [<sup>3</sup>H]ouabainu (stock solution) nemusí být vždy stejné a zcela reprodukovatelné. Bylo by rovněž žádoucí stanovit aktivitu Na,K-ATPázy, což jsem však z časových důvodů v rámci vypracování této diplomové práce již nemohla provést.

V této souvislosti je důležité konstatovat, že v literatuře je vliv ethinylestradiolu nejčastěji spojován se snížením aktivity Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy, a to jak signifikantně (Reichen a Paumgartner, 1977; Davis a kol., 1978; Rosario a kol., 1988; Keeffe a kol., 1979), tak nesignifikantně (Bossard a kol., 1993; Landmann a kol., 1998). Podle Reichena a Paumgartnera (1977) dochází ke snížení aktivity Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázy bez současné změny vazebných míst pro ouabain. Avšak podle Chen a Shiau (1989) byla zaznamenána

souvislost mezi sníženou aktivitou  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPázy a redukcí vazebných míst pro ouabain. Podle Bakera a Willise (1972) je patrná nápadná podobnost při porovnání velikosti specifické vazby ouabainu s aktivitou  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPázy. Podle Chena a kol. (1995) souvisí pokles aktivity  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPázy s poklesem maximální vazebné kapacity pro ouabain. Stejně tak se snížená afinita ouabainu k enzymu odráží v nárůstu hodnoty  $K_d$ , ačkoliv tato skutečnost nebyla ve zmíněném experimentu prokázána. Ethinylestradiol je podobně jako ouabain schopen inhibovat aktivitu  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPázy (Davis a kol., 1978). Obdobně studie naznačují, že ligandy estrogenových receptorů, tedy estrogeny, mohou být taktéž ligandy  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPázy. Existují důkazy, že se ouabain může vázat na estrogenové receptory a také s inhibičním účinkem, jaký způsobuje u  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPázy (Chen a kol., 2006).

Vzhledem k výše uvedeným souvislostem by bylo možné soudit, že zvýšená vazba [ $^3\text{H}$ ]ouabainu na  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPázu by mohla vypovídat o její zvýšené aktivitě a naopak. S přihlédnutím k dosaženým výsledkům však nelze tento vztah vyloučit ani vyvrátit. Otázkou nadále zůstává, zda nesourodost výsledků nemůže být způsobena další možnou interakcí na úrovni ligand-receptor.

Podávání ethinylestradiolu (5 mg/kg) způsobilo v několika případech změnu membránové fluidity a v souvislosti s tím i pokles aktivity  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPázy (Reichen a Paumgartner, 1977; Cooper, 1977; Davis a kol., 1978; Keeffe a kol., 1979; Simon a kol., 1996; Kitani a Zs-Nagy, 1996). Proto snížení aktivity  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPázy nastává pravděpodobně důsledkem změn snížení fluidity membrány (Davis a kol., 1978; Chen a kol., 1995). Fluidita plazmatických membrán připravených z buněčné linie HEK293 byla měřena metodou rovnovážné anizotropie DPH. Nepodařilo se však dosáhnout předpokládaných výsledků, tedy signifikantního nárůstu anizotropie u studovaných preparátů. Byl zaznamenán mírný, avšak signifikantní ( $P < 0,01$ ) pokles anizotropie u skupiny EE 10 ng/ml. Oproti tomu byl zaznamenán nesignifikantní ( $P > 0,05$ ) nárůst anizotropie u skupiny EE 100 ng/ml. Předchozí studie používaly vysokou dávku ethinylestradiolu (5 mg/kg), je proto možné, že se signifikantní nárůst anizotropie objevuje až při takto vysoké koncentraci a že u nižších koncentrací může docházet i k přechodnému či krátkodobému mírnému poklesu. Pokud je změna fluidity ovlivněna zvýšenou akumulací cholesterolu v membráně, je možné, že se tento efekt projeví až po dosažení určité prahové hodnoty obsahu cholesterolu v membráně, která je způsobena právě vyšší koncentrací ethinylestradiolu.

## 8. Závěr

Desetidenní podávání ethinylestradiolu potkanům o dvou koncentracích (EE 0,1 a 1 mg/kg) způsobilo výrazný pokles jejich celkové tělesné hmotnosti. U skupiny EE 0,1 mg/kg byl také zaznamenán výrazný nárůst hmotnosti jater. Oba výsledky demonstrují toxický vliv ethinylestradiolu na organismus potkana.

Stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu v PNS ze sklizených buněk linie HEK293 ukázalo mírný pokles vazby u skupiny vystavené působení nižší koncentrace ethinylestradiolu EE 10 ng/ml a naopak nárůst vazby u skupiny vystavené působení vyšší koncentrace ethinylestradiolu EE 100 ng/ml.

Měřením vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu ve frakcích ze sacharózového flotačního gradientu připraveného ze sklizených buněk linie HEK293 byly získány výsledky demonstrující nárůst vazby v plazmatických membránách u obou skupin vystavených působení ethinylestradiolu (EE 10 a 100 ng/ml).

Při jednobodovém stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu v postnukleární frakci, která byla připravena z šedé hmoty mozku potkana byl zaznamenán nárůst vazby u skupiny vystavené nižší koncentraci ethinylestradiolu (EE 0,1 mg/kg).

Stanovení saturační vazebné křivky [<sup>3</sup>H]ouabainu v PNS z šedé kůry mozku potkana přineslo výsledky vypovídající o poklesu maximálního počtu vazebných míst u skupiny vystavené nižší koncentraci ethinylestradiolu (EE 0,1 mg/kg). Naopak byl zaznamenán nárůst maximálního počtu vazebných míst u skupiny vystavené vyšší koncentraci ethinylestradiolu (EE 1 mg/kg). Hodnota disociační konstanty se zvýšila u obou skupin vystavených působení ethinylestradiolu (EE 0,1 a 1 mg/kg).

Měření rovnovážné anizotropie DPH v plazmatických membránách odhalilo významný pokles anizotropie u skupiny vystavené nižší koncentraci ethinylestradiolu (EE 10 ng/ml) a nevýznamný nárůst anizotropie u skupiny vystavené vyšší koncentraci ethinylestradiolu (EE 100 ng/ml).

Stanovení vazby [<sup>3</sup>H]ouabainu ve vzorcích z buněk HEK293 a tkání potkanů kmene Wistar ovlivněných různými koncentracemi ethinylestradiolu ani měření rovnovážné anizotropie DPH v plazmatických membránách buněk HEK293 neukázalo převažující shodný trend, který by vypovídal o výrazném vlivu ethinylestradiolu na plasmatickou membránu a její transportní protein Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPázu.



## 9. Seznam použité literatury

BAGROV, Alexei Y.; SHAPIRO, Joseph I.; FEDOROVA, Olga V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacological reviews*, 2009, 61.1: 9-38.

BAKER, P. F.; WILLIS, J. S. Binding of the cardiac glycoside ouabain to intact cells. *The Journal of physiology*, 1972, 224.2: 441-462.

BENNION, Lynn J.; MOTT, David M.; HOWARD, Barbara V. Oral contraceptives raise the cholesterol saturation of bile by increasing biliary cholesterol secretion. *Metabolism*, 1980, 29.1: 18-22.

BJÖRNSTRÖM, Linda; SJÖBERG, Maria. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular endocrinology*, 2005, 19.4: 833-842.

BLANCO, Gustavo; MERCER, Robert W. Isozymes of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 1998, 275.5: F633-F650.

BLOK, L. J., et al. Regulation of expression of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer. *British journal of cancer*, 1999, 81.1: 28.

BOSSARD, Roger, et al. Ethinylestradiol treatment induces multiple canalicular membrane transport alterations in rat liver. *Journal of Clinical Investigation*, 1993, 91.6: 2714.

BURGER, K.; GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. Regulation of receptor function by cholesterol. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2000, 57.11: 1577-1592.

CARMECI, Charles, et al. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*, 1997, 45.3: 607-617.

COOPER, R. A. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *The New England journal of medicine*, 1977, 297.7: 371.

CORNELIUS, Flemming.; SKOU, Jens Christian. Reconstitution of (Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup>)-ATPase into phospholipid vesicles with full recovery of its specific activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1984, 772.3: 357-373.

COUSE, John F., et al. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER $\alpha$ -knockout mouse. *Endocrinology*, 1997, 138.11: 4613-4621.

COWLEY, Shaun M., et al. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  form heterodimers on DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272.32: 19858-19862.

CRAMBERT, Gilles; GEERING, Kathi. FXDY proteins: new tissue-specific regulators of the ubiquitous Na, K-ATPase. *Science Signaling*, 2003, 2003.166: re1.

CROYLE, Michelle L.; WOO, Alison L.; LINGREL, Jerry B. Extensive Random Mutagenesis Analysis of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  Subunit Identifies Known and Previously Unidentified Amino Acid Residues that Alter Ouabain Sensitivity Implications for Ouabain Binding. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 248.2: 488-495.

DAHLMAN-WRIGHT, Karin, et al. International union of pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacological reviews*, 2006, 58.4: 773-781.

DAVIS, R. A., et al. Alterations of hepatic Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and bile flow by estrogen: Effects on liver surface membrane lipid structure and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1978, 75.9: 4130-4134.

DHARMANANDA, Subhuti. Perimenopausal Brain Fog. Acupuncture and Herbs to Stimulate Brain Activity, Institute for Traditional Medicine, Portland, Oregon. 2005

DONNET, Claudia; ARYSTARKHOVA, Elena; SWEADNER, Kathleen J. Thermal denaturation of the Na, K-ATPase provides evidence for  $\alpha$ - $\alpha$  oligomeric interaction and  $\gamma$  subunit association with the C-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276.10: 7357-7365.

DOWHAN, W., BOGDANOV, M.. Functional roles of lipids in membranes. In: *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, 2002, Elsevier, 4<sup>th</sup> edition: 1-37.

DŽURBA, Andrej, et al. Estradiol modulates the sodium pump in the heart sarcolemma. In: *The Cellular Basis of Cardiovascular Function in Health and Disease*. Springer US, 1997. p. 113-118.

EHRMANN, J., HŮLEK, P. a kolektiv. *Hepatologie*. Grada Publishing a.s., Praha, 2010, ISBN 978-80-247-7039-0

EL-TANANI, Mohammed KK; GREEN, Chris D. Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor. *Molecular Endocrinology*, 1997, 11.7: 928-937.

ENMARK, Eva, et al. Human Estrogen Receptor  $\beta$ -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1997, 82.12: 4258-4265.

ESPINEDA, Cromwell, et al. Analysis of the Na, K-ATPase  $\alpha$ -and  $\beta$ -subunit expression profiles of bladder cancer using tissue microarrays. *Cancer*, 2003, 97.8: 1859-1868.

EVANS, Ronald M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 1988, 240.4854: 889-895.

FAIT, Tomáš. *Antikoncepce: průvodce ošetřujícího lékaře*. Maxdorf, 2008.

FEIGELSON, Heather Spencer; HENDERSON, Brian E. Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis*, 1996, 17.11: 2279-2284.

FÉRAILLE, Eric; DOUCET, Alain. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiological reviews*, 2001, 81.1: 345-418.

FERRER, Imma a E. Michael THURMAN. *Advanced Techniques in Gas Chromatography-mass Spectrometry (GC-MS-MS and GC-TOF-MS) for Environmental Chemistry*. xxii, 502 pages. Comprehensive analytical chemistry, 2013, v. 61. ISBN 04-446-2623-9.

FORBUSH III, Bliss; KAPLAN, Jack H.; HOFFMAN, Joseph F. Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the (sodium-potassium ion)-dependent ATPase. *Biochemistry*, 1978, 17.17: 3667-3676.

FORBUSH, Buss. Cardiotonic steroid binding to Na, K-ATPase. *Current topics in membranes and transport*, 1983, 19: 167-201.

GEERING, Käthi. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2006, 290.2: F241-F250.

GIGUÈRE, Vincent; TREMBLAY, André; TREMBLAY, Gilles B. Estrogen receptor  $\beta$ : re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroids*, 1998, 63.5: 335-339.

GLYNN, I. M. The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-transporting adenosine triphosphatase. In: *The enzymes of biological membranes*. Springer US, 1985. p. 35-114.

GLYNN, I. M.; KARLISH, S. The sodium pump. *Annual Review of Physiology*, 1975, 37.1: 13-55.

GOLDEN, Gil A., et al. Rapid and opposite effects of cortisol and estradiol on human erythrocyte Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity: Relationship to steroid intercalation into the cell membrane. *Life sciences*, 1999, 65.12: 1247-1255.

GRAHAM, F. L., et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*, 1977, 36.1: 59-72.

GREEN, Stephen, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, 1986, 320: 134-139.

GROENENDIJK, Floris H., et al. Estrogen receptor splice variants as a potential source of false-positive estrogen receptor status in breast cancer diagnostics. *Breast cancer research and treatment*, 2013, 140.3: 475-484.

GUILLEBAUD, John. *Contraception today: a pocketbook for general practitioners and practice nurses*. 7th ed. New York: Informa Healthcare, 2011, p. ISBN 978-184-1849-119.

HALL, Glenda; PHILLIPS, Tania J. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2005, 53.4: 555-568.

HYDER, Salman M.; CHIAPPETTA, Constance; STANCEL, George M. Interaction of human estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  with the same naturally occurring estrogen response elements. *Biochemical pharmacology*, 1999, 57.6: 597-601.

CHARLEMAGNE, Daniele, et al. Alteration of Na, K-ATPase subunit mRNA and protein levels in hypertrophied rat heart. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269.2: 1541-1547.

CHAUHAN, Neelima B.; LEE, John M.; SIEGEL, George J. Na, K-ATPase mRNA levels and plaque load in Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 1997, 9.3: 151-166.

CHEN, Ching-Chow; SHIAU, Shoei-Yn Lin. Myocardial Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity and [<sup>3</sup>H] ouabain binding sites in hypertensive rats. *European journal of pharmacology*, 1989, 169.1: 67-74.

CHEN, Meng; PRESTON MASON, R.; TULENKO, Thomas N. Atherosclerosis alters the composition, structure and function of arterial smooth muscle cell plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1995, 1272.2: 101-112.

CHEN, Jin-Qiang, et al. Sodium/potassium ATPase (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase) and ouabain/related cardiac glycosides: a new paradigm for development of anti-breast cancer drugs?. *Breast cancer research and treatment*, 2006, 96.1: 1-15.

CHIMCHIRIAN, Robert F.; SURI, Rominder PS; FU, Hongxiang. Free synthetic and natural estrogen hormones in influent and effluent of three municipal wastewater treatment plants. *Water Environment Research*, 2007, 79.9: 969-974.

CHOW, Dar C.; FORTE, John G. Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases. *Journal of Experimental Biology*, 1995, 198.1: 1-17.

*IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Sex hormones.* International Agency for Research on Cancer, WHO, 1979, 21, 139-364.

JORGENSEN, Peter L., et al. Transport-Linked Conformational Changes in Na, K-ATPase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1997, 834.1: 161-174.

JORGENSEN, Peter L.; HÅKANSSON, Kjell O.; KARLISH, Steven JD. Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annual review of physiology*, 2003, 65.1: 817-849.

KARLSSON, Roger; LINDÉN, Angelica; VON SCHOULTZ, Bo. Suppression of 24-hour cholecystokinin secretion by oral contraceptives. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1992, 167.1: 58-59.

KATZUNG, Bertram G. *Základní a klinická farmakologie*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství a vydavatelství H and H, 1995, 1072 s. ISBN 80-857-8735-0.

KAUNITZ, Andrew M. Oral contraceptive estrogen dose considerations. *Contraception*, 1998, 58.3: 15S-21S.

KEEFFE, Emmet B., et al. Studies of relationships among bile flow, liver plasma membrane NaK-ATPase, and membrane microviscosity in the rat. *Journal of Clinical Investigation*, 1979, 64.6: 1590.

KIMELBERG, Harold K.; PAPAHAADJOPOULOS, Demetrios. Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions, and cholesterol on (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-stimulated adenosine triphosphatase. *Journal of biological chemistry*, 1974, 249.4: 1071-1080.

KIMELBERG, Harold K.; PAPAHADJOPOULOS, Demetrios. Phospholipid requirements for (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase activity: Head-group specificity and fatty acid fluidity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1972, 282: 277-292.

KITANI, Kenichi; ZS-NAGY, Imre. The effect of ethinyl-estradiol treatment on the lateral mobility of lipids and proteins in hepatocyte plasma membrane of male rats (FRAP studies on liver smears). *International hepatology communications*, 1996, 5.4: 236-243.

KOUSTENI, S., et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*, 2001, 104.5: 719-730.

KOVANEN, Petri T.; BROWN, Michael S.; GOLDSTEIN, Joseph L. Increased binding of low density lipoprotein to liver membranes from rats treated with 17 alpha-ethinyl estradiol. *Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254.22: 11367-11373.

KUHL, H. Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climacteric*, 2005, 8.S1: 3-63.

KUIPER, George G., et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93.12: 5925-5930.

KUIPER, George G., et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology*, 1997, 138.3: 863-870.

KUMAR, Vijay; CHAMBON, Pierre. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell*, 1988, 55.1: 145-156.

LANDMANN, Lukas, et al. Expression, distribution, and activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in normal and cholestatic rat liver. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1998, 46.3: 405-410.

LAURSEN, Mette, et al. Crystal structure of the high-affinity Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase-ouabain complex with Mg<sup>2+</sup> bound in the cation binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110.27: 10958-10963.

LENTZ, Barry R. Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers. *Chemistry and physics of lipids*, 1993, 64.1: 99-116.

LEVIN, Ellis R. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids*, 2002, 67.6: 471-475.

LINGREL, Jerry B. Na, K-ATPase: isoform structure, function, and expression. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 1992, 24.3: 263-270.

LINGREL, Jerry B.; KUNTZWEILER, Theresa. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269.31: 19659-19662.

LIU, Xiang; SONGU-MIZE, Emel. Alterations in alpha subunit expression of cardiac Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in spontaneously hypertensive rats: effect of antihypertensive therapy. *European journal of pharmacology*, 1997, 327.2: 151-156.

- LOWRY, Oliver H., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193.1: 265-275.
- LUTSENKO, Svetlana; KAPLAN, Jack H. An essential role for the extracellular domain of the sodium-potassium-ATPase beta-subunit in cation occlusion. *Biochemistry*, 1993, 32.26: 6737-6743.
- MARKS, Michael J.; SEEDS, Nicholas W. A heterogeneous ouabain-ATPase interaction in mouse brain. *Life sciences*, 1978, 23.27: 2735-2744.
- MERCER, Robert W., et al. Molecular cloning and immunological characterization of the gamma polypeptide, a small protein associated with the Na, K-ATPase. *The Journal of cell biology*, 1993, 121.3: 579-586.
- MOON, H. E., et al. Control of the efficiency of agonist-induced information transfer and stability of the ternary complex containing the  $\delta$  opioid receptor and the  $\alpha$  subunit of  $G_{i1}$  by mutation of a receptor/G protein contact interface. *Neuropharmacology*, 2001, 41.3: 321-330.
- MORTH, J. Preben, et al. A structural overview of the plasma membrane  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase and  $H^+$ -ATPase ion pumps. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 12.1: 60-70.
- MORTH, J. Preben, et al. Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature*, 2007, 450.7172: 1043-1049.
- NOWACZYK-DURA, G.; CZEKAJ, P. Effects of ethinylestradiol and levonorgestrel on morphology, ultrastructure and histoenzymatic activity in rat kidney. *Physiological research*, 1998, 47: 241-252.
- OGAWA, Haruo, et al. Crystal structure of the sodium-potassium pump ( $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106.33: 13742-13747.
- OGAWA, Haruo; TOYOSHIMA, Chikashi. Homology modeling of the cation binding sites of  $Na^+$   $K^+$ -ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99.25: 15977-15982.
- OCHS, Heike, et al. Effect of tumor promoting contraceptive steroids on growth and drug metabolizing enzymes in rat liver. *Cancer research*, 1986, 46.3: 1224-1232.
- OTTOLENGHI, Paul. The Relipidation of Delipidated Na, K-ATPase. *European Journal of Biochemistry*, 1979, 99.1: 113-131.
- PARL, Fritz F. *Estrogens, estrogen receptor, and breast cancer*. Washington, DC: IOS Press, c2000, viii, 263 p. ISBN 42-749-0311-7.
- PLAA, G. L.; PRIESTLY, B. G. Intrahepatic cholestasis induced by drugs and chemicals. *Pharmacological Reviews*, 1976, 28.3: 207-273.
- POST, R. L.; SEN, Amar K.; ROSENTHAL, A. S. A phosphorylated intermediate in adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport across kidney membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 1965, 240.3: 1437-1445.

POST, Robert L.; HEGYVARY, Csaba; KUME, Shoji. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 1972, 247.20: 6530-6540.

PROSSNITZ, Eric R.; BARTON, Matthias. Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 2009, 89.3: 89-97.

RAHMAN, Atta-ur- a Allen B. REITZ. *Frontiers in medicinal chemistry*. Saif Zone, Sharjah, United Arab Emirates: Bentham Science Publishers Ltd., 2005, xiii, 606 p. ISBN 9781608052059.

REICHEN, J. U. R. G.; PAUMGARTNER, Gustav. Relationship between bile flow and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-adenosinetriphosphatase in liver plasma membranes enriched in bile canaliculi. *Journal of Clinical Investigation*, 1977, 60.2: 429.

REYES, Nicolás; GADSBY, David C. Ion permeation through the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase. *Nature*, 2006, 443.7110: 470-474.

ROSARIO, J., et al. Ethinylestradiol administration selectively alters liver sinusoidal membrane lipid fluidity and protein composition. *Biochemistry*, 1988, 27.11: 3939-3946.

SANDTNER, Walter, et al. Ouabain binding site in a functioning Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286.44: 38177-38183.

SANCHEZ, Edwin R., et al. The 56-59-kilodalton protein identified in untransformed steroid receptor complexes is a unique protein that exists in cytosol in a complex with both the 70-and 90-kilodalton heat shock proteins. *Biochemistry*, 1990, 29.21: 5145-5152.

SHAMRAJ, Olga I.; LINGREL, Jerry B. A putative fourth Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91.26: 12952-12956.

SHENFIELD, Gillian M. Oral contraceptives. *Drug Safety*, 1993, 9.1: 21-37.

SHINODA, Takehiro, et al. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature*, 2009, 459.7245: 446-450.

SCHACHTER, David; SHINITZKY, M. E. I. R. Fluorescence polarization studies of rat intestinal microvillus membranes. *Journal of Clinical Investigation*, 1977, 59.3: 536.

SCHILLINGER, E a M OETTEL. *Estrogens and antiestrogens*. New York: Springer, c1999, 2 v. ISBN 35-406-5580-8.

SIMON, Francis R.; FORTUNE, J.; IWAHASJI, M.; GARTUNG, C.; WOLKOFF, A. a E. SUTHERLAND. Ethinyl estradiol cholestasis involves alterations in expression of liver sinusoidal transporters. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1996, 34.6: G1043.

SINGER, S. J., NICOLSON, G. L.. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 1972, 175.23: 720-731.

SKOU, Jens Christian. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica et biophysica acta*, 1957, 23: 394-401.

SKOU, Jens Christian; ESMANN, Mikael. The Na, K-ATPase. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 1992, 24.3: 249-261.

SPERELAKIS, Nick. *Cell physiology sourcebook: essentials of membrane biophysics*. 4th ed. Boston: Elsevier/AP, 2012, xxvi, 970 p. ISBN 978-012-3877-383.

SPEROFF, Leon a Marc A FRITZ. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams, 2005, 1334 s. ISBN 07-817-4795-3.

SUMPTER, John P.; JOBLING, Susan. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental health perspectives*, 1995, 103.Suppl 7: 173.

SWEADNER, Kathleen J. Two molecular forms of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-stimulated ATPase in brain. Separation, and difference in affinity for strophanthidin. *Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254.13: 6060-6067.

SWEADNER, Kathleen J.; RAEL, Efren. The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. *Genomics*, 2000, 68.1: 41-56.

TANENBAUM, David M., et al. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95.11: 5998-6003.

THOMAS, P., et al. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 2005, 146.2: 624-632.

THOMAS, R. C. Intracellular sodium activity and the sodium pump in snail neurones. *The Journal of physiology*, 1972, 220.1: 55-71.

THORNTON, M. J. The biological actions of estrogens on skin. *Experimental dermatology*, 2002, 11.6: 487-502.

TORA, Laszlo, et al. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*, 1989, 59.3: 477-487.

TSIMARATO, M., et al. Evidence of time-dependent changes in renal medullary Na, K-ATPase activity and expression in diabetic rats. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 2001, 47.2: 239-245.

UNZEITIG, V. Aktivita hormonů a jejich vliv na organismus uživatelky kombinované orální kontracepce (COC). *Moderní gynekologie a porodnictví*, 2005, 14.1: 3-10.

WILLIAMS, C. L.; STANCEL, G. M. Estrogens and progestins. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 1996, 9: 1411-1440.

XIE, Zijian; ASKARI, Amir. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as a signal transducer. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269.10: 2434-2439.