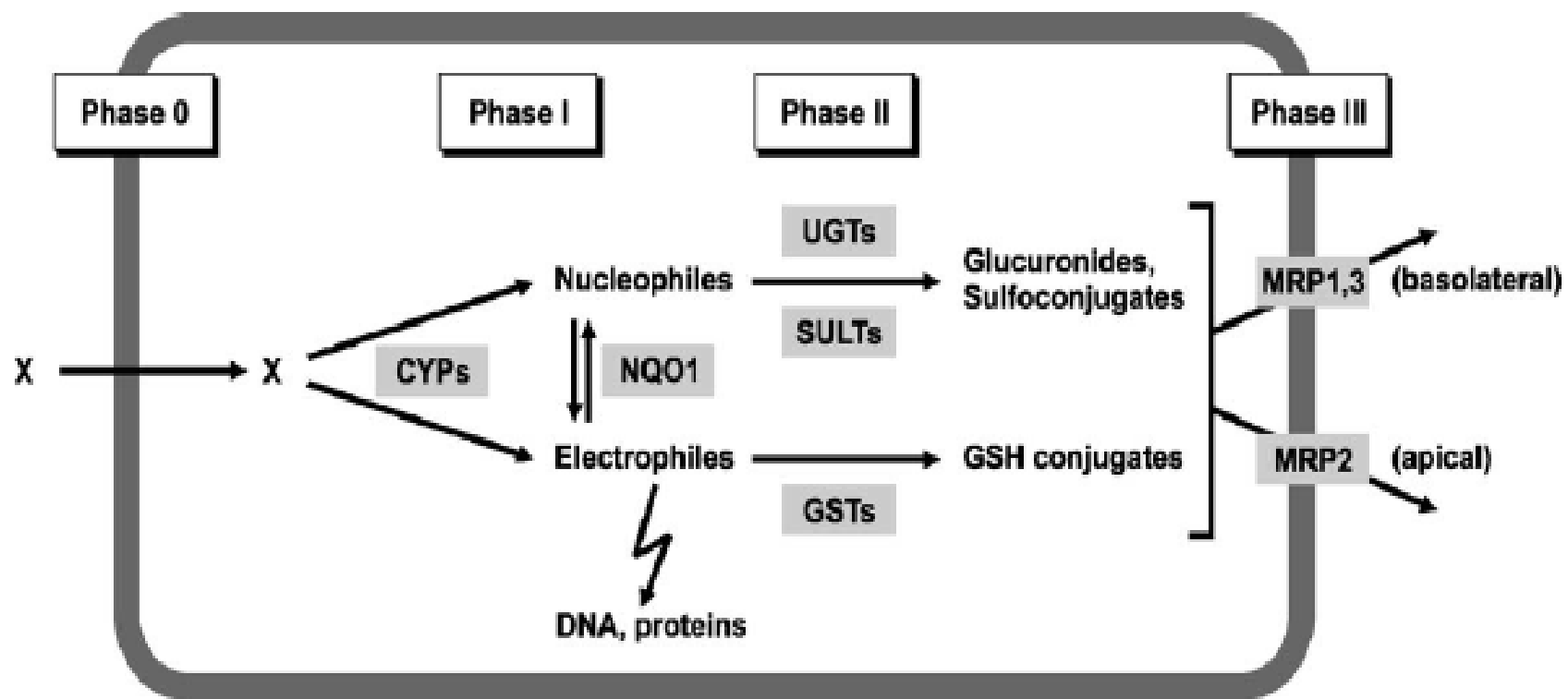


**„Biotransformace“ = metabolismus
cizorodých látek a regulace hladin
biotransformačních enzymů**

ENZYMY METABOLISMU CIZORODÝCH LÁTEK

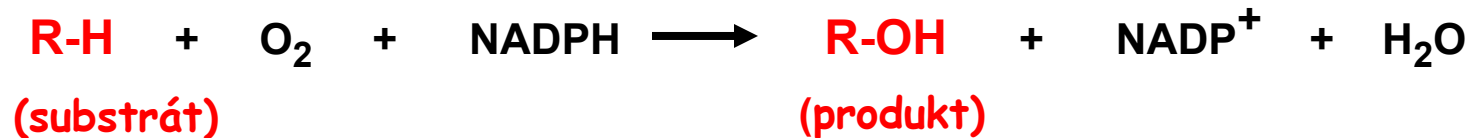
- ☛ Enzymy 1. fáze biotransformace xenobiotik, steroidních hormonů a mastných kyselin
 - monooxygenázy (CYP, AKR, FMO);
 - reduktázy (AKR, NQO);
 - hydrolázy (esterázy, epoxidhydrolázy);
 - další reakce: hydratace, isomerace, dehalogenace.
- ☛ 2. fáze biotransformace - transferázy (GST, UDPGT, SULF, acetylázy aj.); antioxidantní enzymy (SOD, CAT, GPx, GR).
- ☛ 3. fáze biotransformace (ABC transportéry)

BIOTRANSFORMACE CIZORODÝCH LÁTEK A STEROIDŮ, EIKOSANOIDŮ AJ. ENDOGENNÍCH LÁTEK



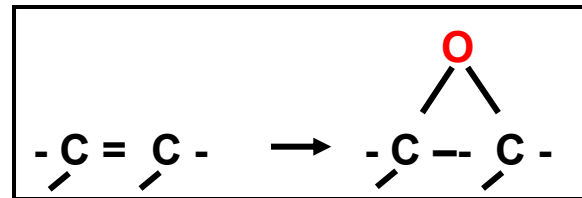
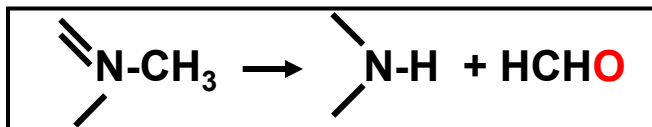
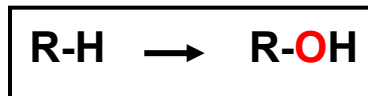
1. FÁZE BIOTRANSFORMACE: monooxygenázové reakce

CYP enzymy

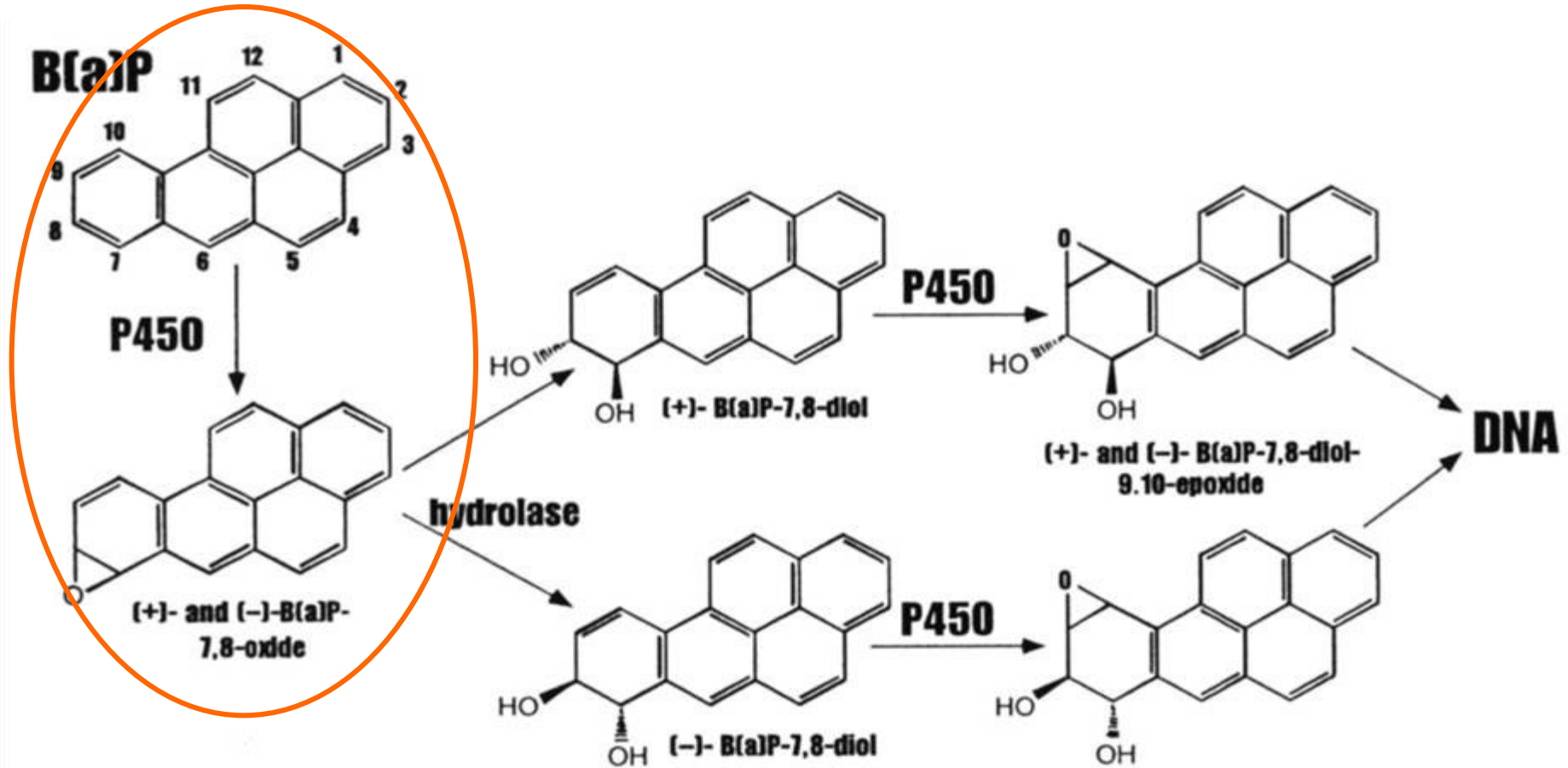


Funkce cytochromů P450 (CYP):

- Nejprve je nutný přenos elektronů z NADPH na CYP enzym (NADPH:P450-oxidoreduktáza)
- Aktivace molekuly kyslíku, „roztržení“ vazby
- Oxidace substrátu (hydroxylace, N-demethylace, epoxidace, dehalogenace...)

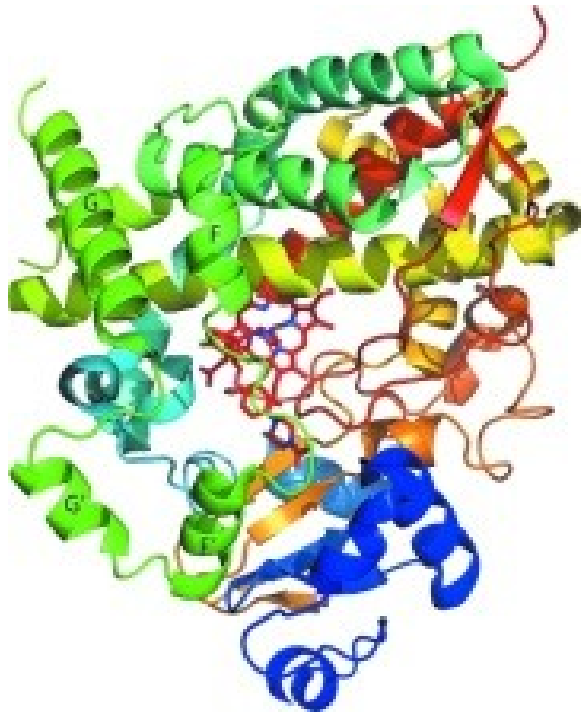


ROLE CYP1A1/CYP1A2/CYP1B1 A EPOXIDHYDROLÁZ V METABOLICKÉ AKTIVACI POLYCYKLIČKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ

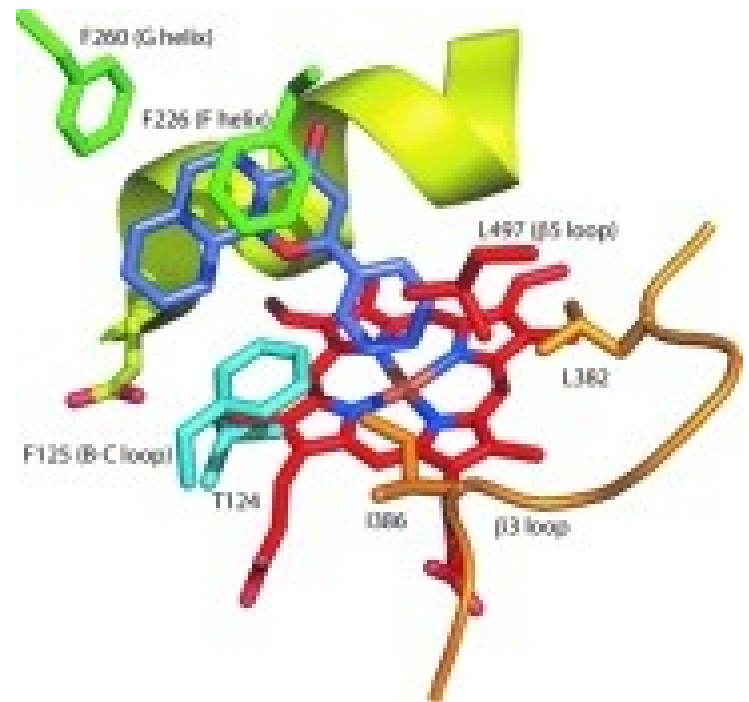


Vlastnosti cytochromů P450

Cytochromy P450 = hemoproteiny; v UV-VIS spektru maximum při 450 nm (v redukovaném stavu a navázaný oxid uhelnatý); výjimka mezi enzymy: široká substrátová specifita, různé katalytické aktivity, výskyt nejvíce v játrech, GIT, plicích, ledvinách, ale i v dalších tkáních). Klasifikace podle podobnosti sekvencí: genové rodiny CYP1, CYP2, CYP3, CYP4 atd., podrodiny CYP1A, CYP1B atd. (cca 60% sekvence), jednotlivé isoformy CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1; polymorfismus.



CYP3A4 s navázaným inhibítorem

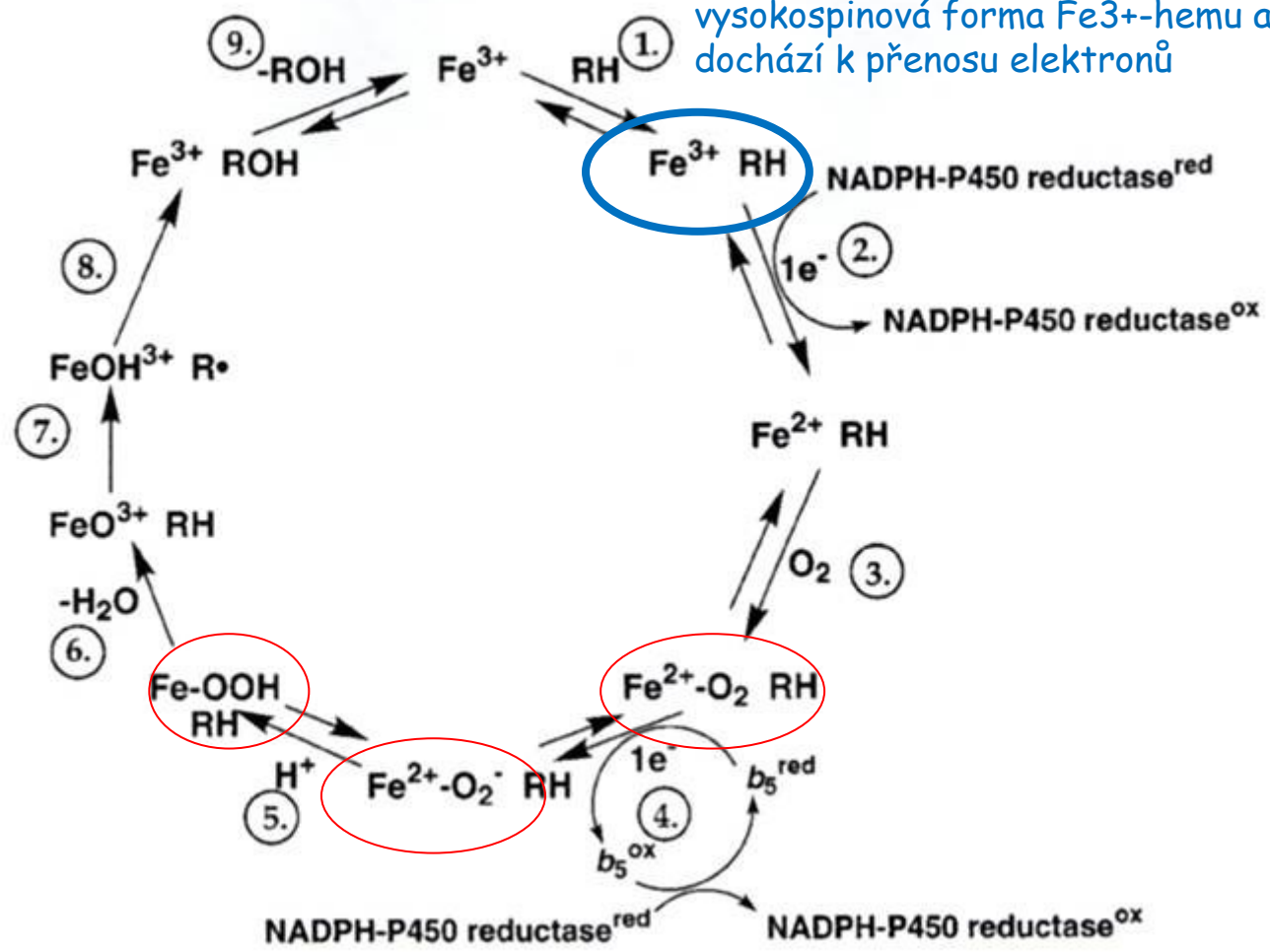


Aktivní místo CYP1A2 s navázaným β -naftoflavonem (modrá barva)

CYKLUS CYTOCHROMU P450: AKTIVACE KYSLÍKU A MONOOXYGENACE

interakcí se substrátem vzniká vysokospinová forma Fe^{3+} -hemu a dochází k přenosu elektronů

Přenos elektronů:
 $NADPH$
 \downarrow
 $NADPH:P450$ oxido-reduktáza
 \downarrow
 cytochrom P450
 (substrát RH, produkt ROH, produkce ROS)



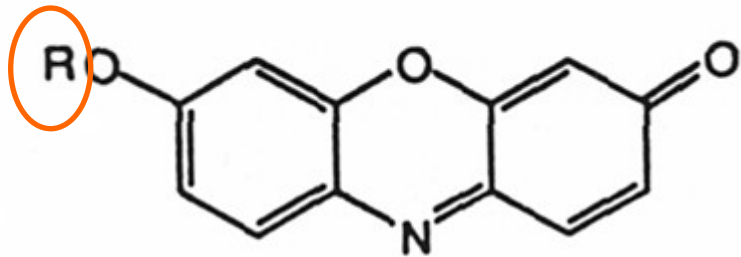
Aktivace kyslíku:
ROS = vedlejší produkty

Seznam nejvýznamnějších cytochromů P450, které jsou zodpovědné za biotransformaci cizorodých látek:

- ☛ CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 (metabolizuje polycyklické aromatické uhlovodíky);
- ☛ CYP2C9 (metabolizuje nesteroidní antiflogistika a další léčiva), CYP2D6 (beta-blokátory, kodein); CYP2E1 (org. rozpouštědla jako ethanol, benzen, toluen)
- ☛ CYP3A4 (metabolizuje asi 30% všech xenobiotik, především léčiv včetně antibiotik);
- ☛ CYP4A11 a další CYPs metabolizující mastné kyseliny (CYP4A = PUFA hydroxylázy; CYP2C a CYP2J = PUFA epoxygenázy) a některá xenobiotika.

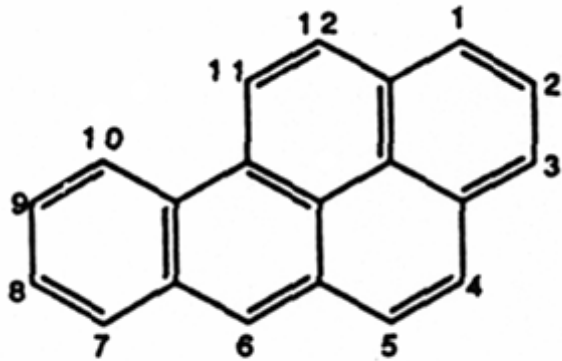
Další desítky CYP enzymů jsou zapojeny do biosyntézy a metabolismu endogenních látek, např. CYP7A (hydroxylace cholesterolu), CYP17 (hydroxylace steroidů), CYP19 (aromatáza - přeměna androgenů na estrogeny).

SPECIFICKÉ SUBSTRÁTY CYP1 ENZYMŮ



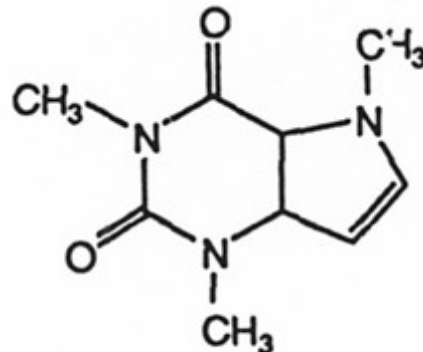
Alkylresorufins
(alkoxyphenoxazones)

7-ethoxyresorufin-O-deethyláza (EROD) -
„umělý“ substrát CYP1



Benzo[a]pyrene

BaP-hydroxyláza (produkty: BaP-OH)



Caffeine
(1,3,7-trimethylxanthine)

Kofeindemethylázy

SPECIFICKÉ SUBSTRÁTY CYP1 ENZYMŮ

AHR agonists including PAHs, HAHs.....

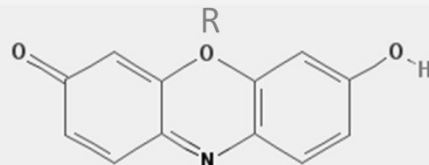


AHRE

CYP1A1

fotometrická nebo
fluorometrická
detekce produkce
resorufinu

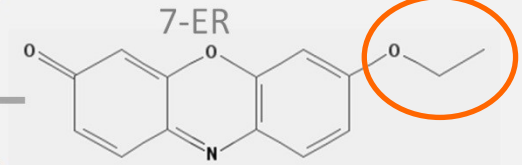
535/590 nm



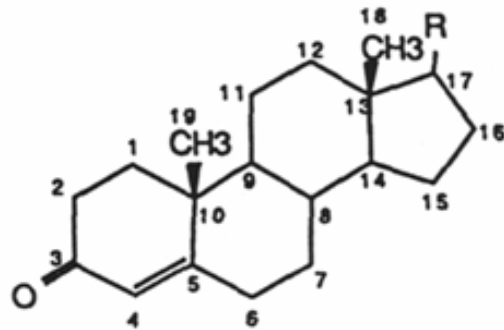
NADP⁺

NADPH

CYP1A1

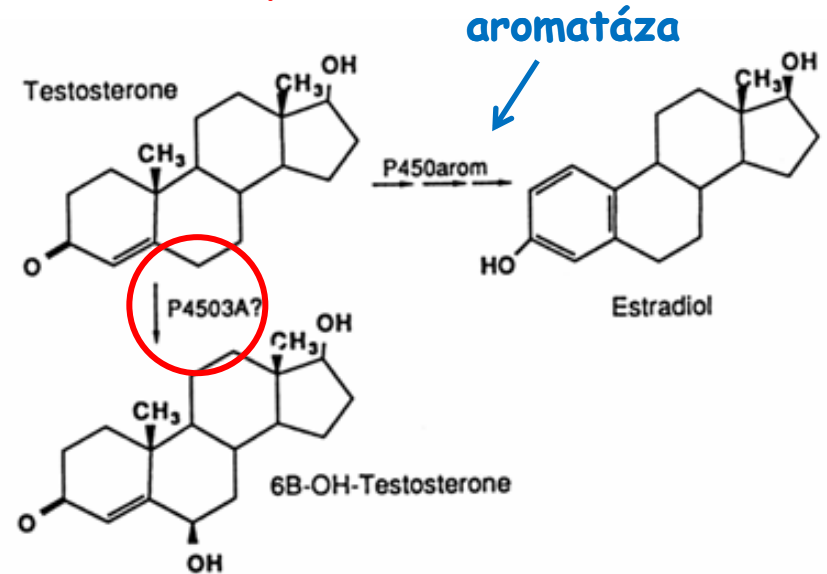


STEROIDY: substrátová specifita CYP enzymů (s výjimkou aromatázy monooxygenázové reakce inaktivují steroidní hormony)

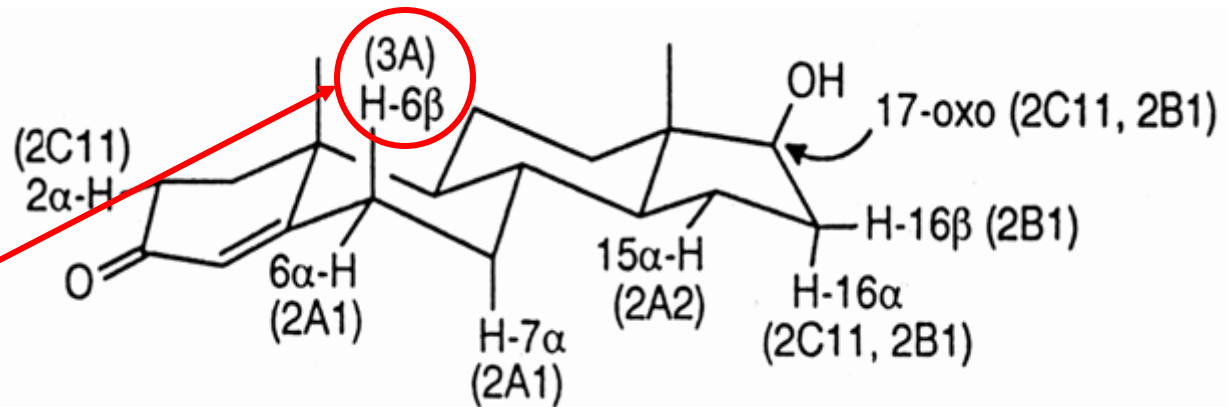


Steroids

(testosterone, R = -OH
androstenedione, R = =O
progesterone, R = -COCH₃
(4-Pregnene-3,20-dione))

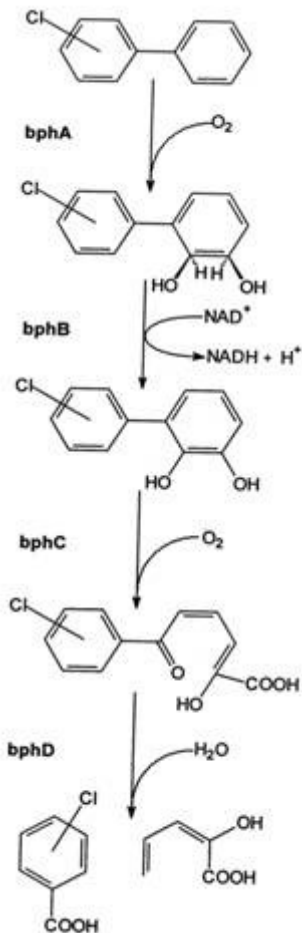


Hydroxylace steroidů
v různých pozicích
(v závorkách isoformy
CYP enzymů)



6β-hydroxylace =
specifická reakce CYP3A

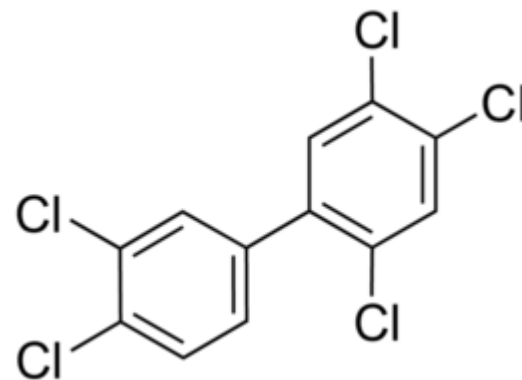
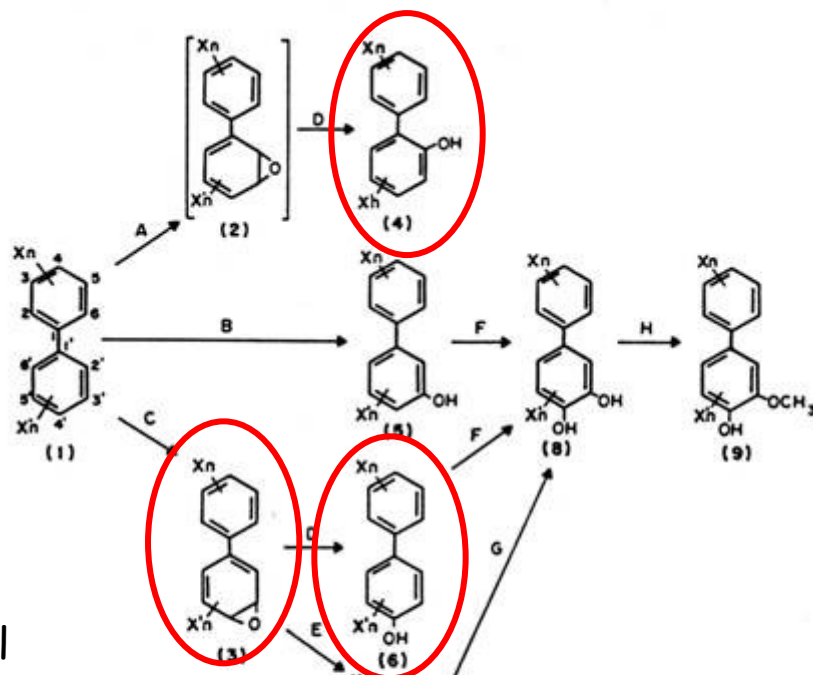
METABOLISMUS POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ (PCB) - příklad 1. fáze metabolismu persistentních organických sloučenin



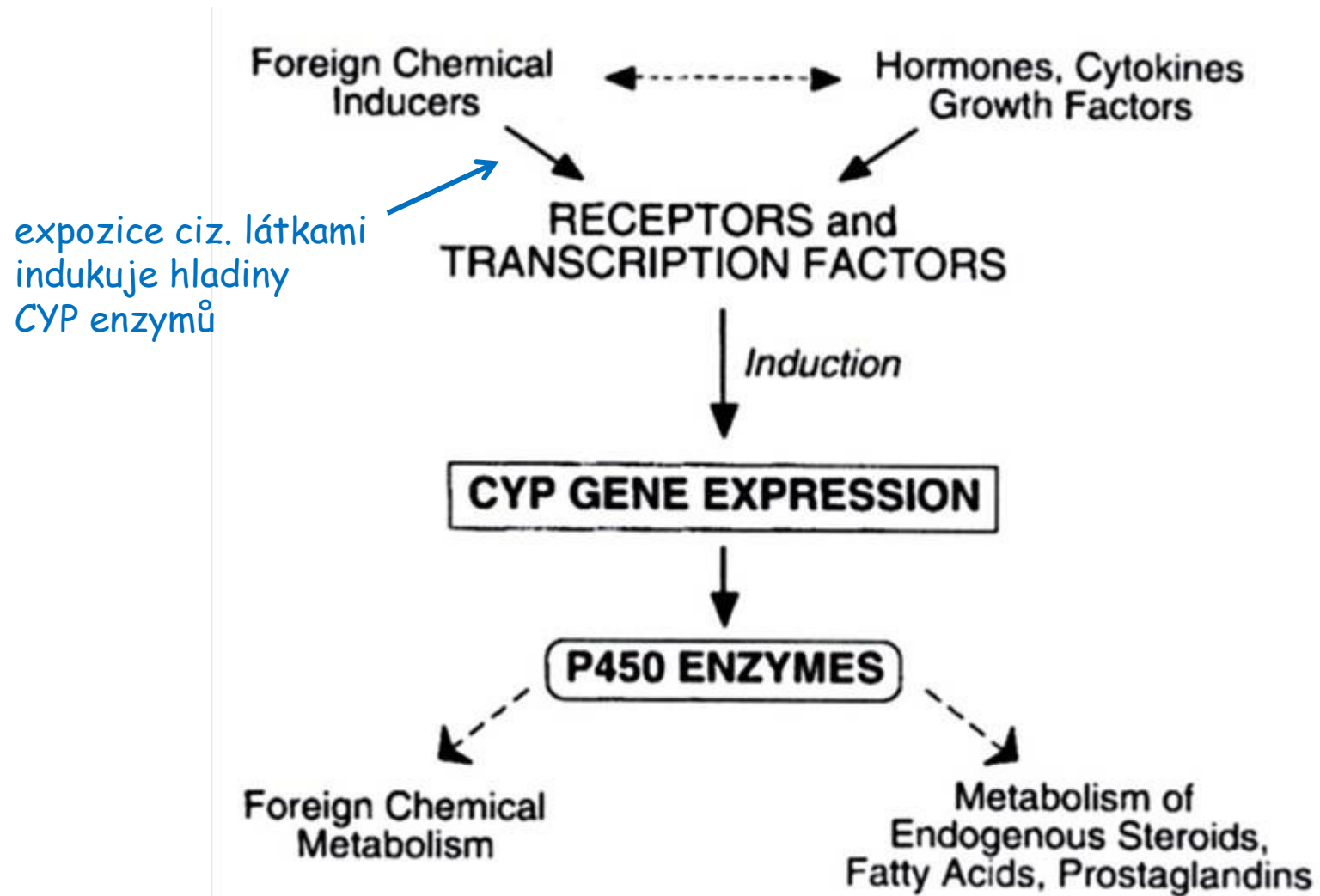
Mikrobiální degradace včetně arom. jádra

Metabolismus u vyšších živočichů: oxidativní metab. (hl. cesty A-D, C)

Persistentní arom. sloučeniny: obsahují Cl v sousedních pozicích - bariéra vzniku epoxidu monooxygenázovou reakcí

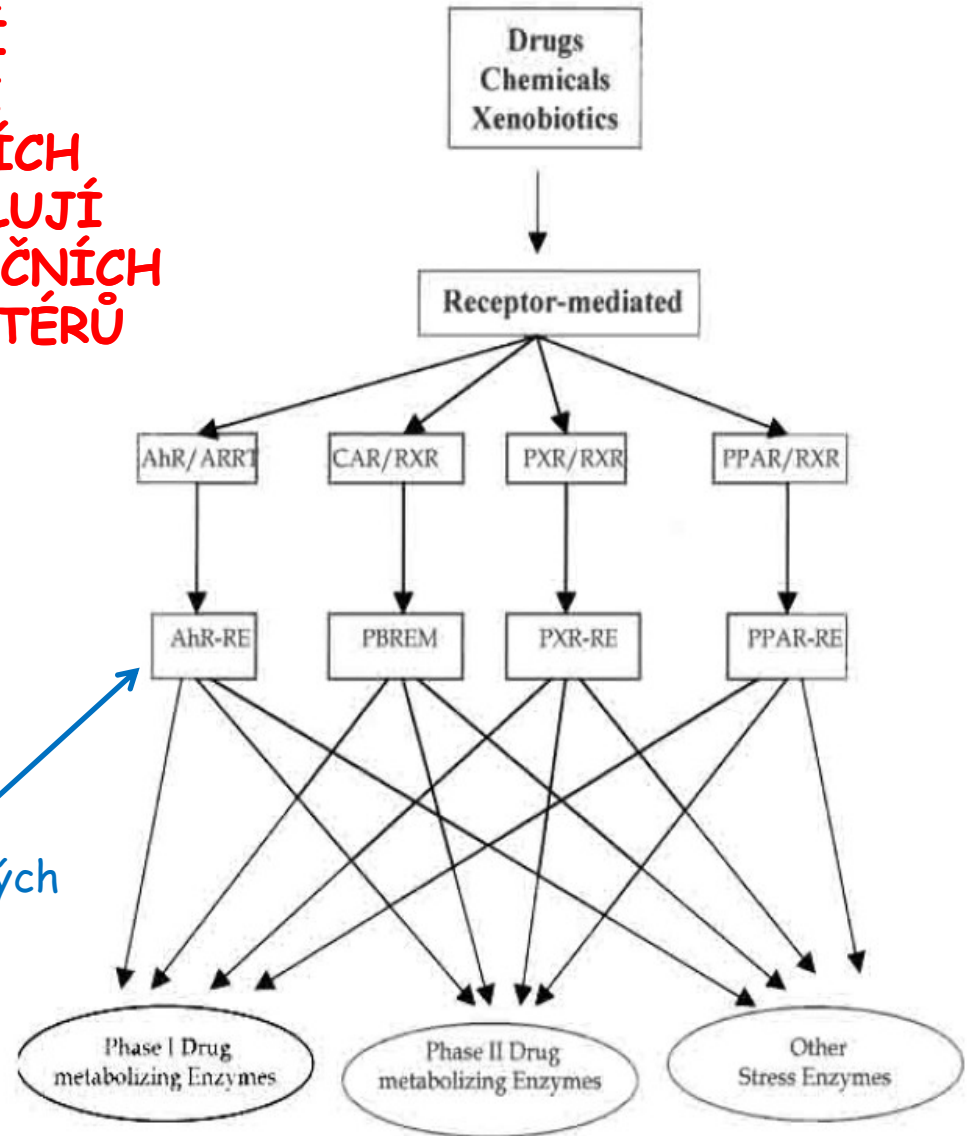


REGULACE CYPs: nukleární a cytosolové receptory kontrolují expresi CYP proteinů



expozice a indukce CYP enzymů ovlivňuje metabolismus endogenních látek!
(společné enzymy CYP pro biotransformaci cizorodých i endogenních látek)

**XENOBIOTIKA, STEROIDY AJ.
LÁTKY INDUKUJÍ VLASTNÍ
METABOLISMUS AKTIVACÍ
RECEPTORŮ/TRANSKRIPČNÍCH
FAKTORŮ, KTERÉ KONTROLUJÍ
EXPRESI BIOTRANSFORMAČNÍCH
ENZYMŮ A ABC TRANSPORTÉRŮ**



- vazba xenobiotika na receptor (aktivace receptoru)
- dimerizace receptoru
- vazba receptoru na specifické responsní elementy v promoterových oblastech cílových genů

NUKLEÁRNÍ A CYTOSOLOVÉ RECEPTORY

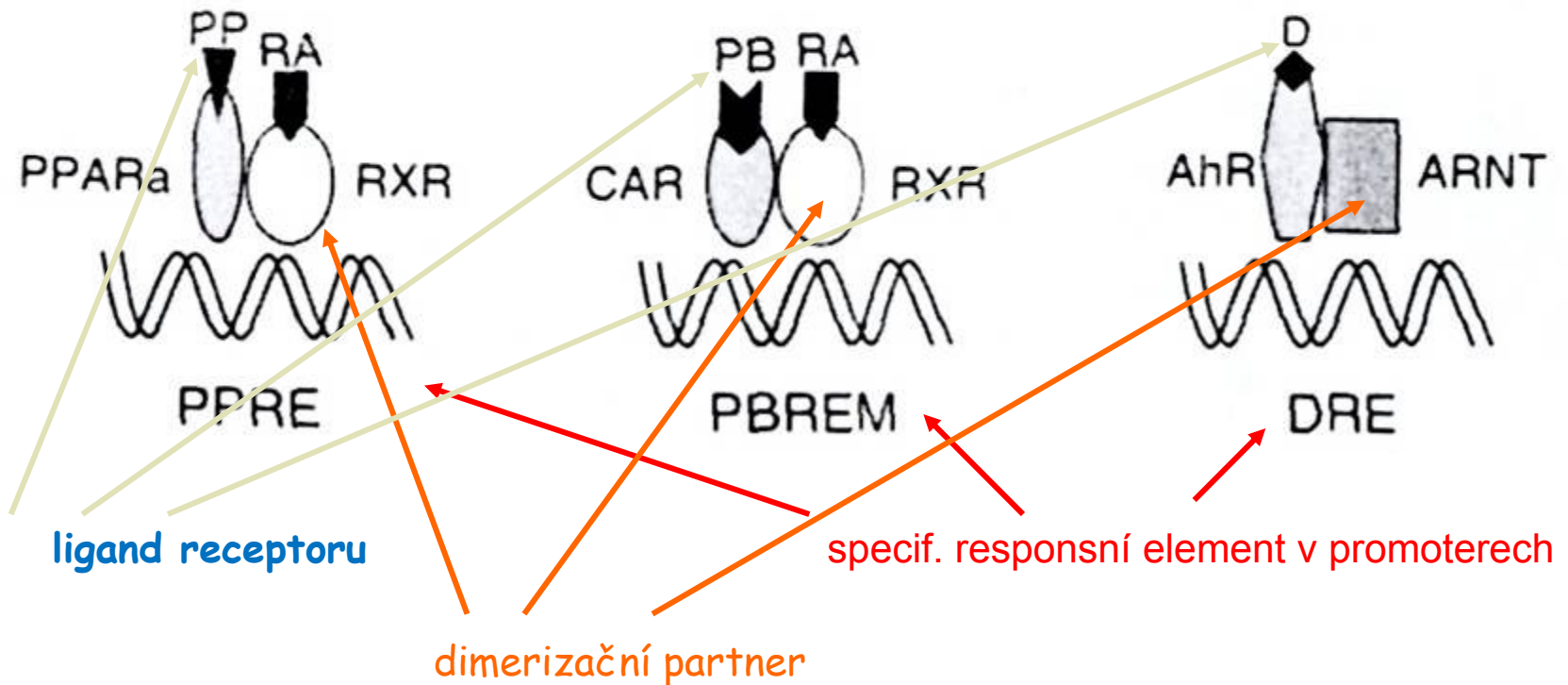
nukleární receptory

cytosolový receptor

a) peroxisome proliferators

b) phenobarbital

c) dioxin



NUKLEÁRNÍ A CYTOSOLOVÉ RECEPTORY KONTROLUJÍCÍ EXPRESI CYP ENZYMŮ

Cizorodé nebo
endogenní látky,
které indukují
hladiny CYP
enzymů

CYP Induction Mediated by Nuclear Receptors

P450 inducing agents	Prototypic responsive rat liver CYPs	Receptor
Polycyclic aromatic hydrocarbons	1A1, 1A2, 1B1	Ah receptor ^a
Phenobarbital	2B1, 2B2	CAR
Dexamethasone	3A1, 3A2, 3A23	PXR
Fibrate drugs	4A1, 4A2, 4A3	PPAR α
Cholesterol	7A1	LXR α
Bile acids ^b	7A1	FXR
Thyroid hormone	P450 reductase	TR

^a PAS transcription family member, not a nuclear receptor.

^b Inhibitors of CYP7A1 transcription.

SEZNAM CYTOCHROMŮ P450 (CYP) ZODPOVĚDNÝCH ZA BIOSYNTÉZU / METABOLISMUS STEROIDŮ A METABOLISMUS XENOBIOTIK

- ❑ CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1: genová exprese regulována **AhR** (indukce dioxiny, PAH; endogenní ligandy?); monooxygenace PAH, estradiolu;
- ❑ CYP2B: exprese regulována **GR/CAR**, indukce steroidy, fenobarbitalem, monooxygenace velké řady xenobiotik, testosteronu aj.
- ❑ CYP2A, CYP2C, CYP2D
- ❑ CYP2E: indukce především stabilizací proteinu (indukují etanol, pyrazol aj.), monooxygenace etanolu, (ω -1)-hydroxylace mastných kyselin
- ❑ CYP3A: exprese regulována **GR/PXR**; indukce dexametazonem aj. steroidy, monooxygenace velké řady xenobiotik (nejdůležitější enzym biotransformace), 6β -hydroxylace testosteronu
- ❑ CYP4A: exprese regulována **PPAR α** , indukce peroxisomálními proliferátory (clofibrate, dialkylestery kyseliny ftalové), ω -hydroxylace mastných kyselin
- ❑ CYP7A, CYP11A, CYP17, CYP19 (aromatáza): enzymy steroidogeneze
- ❑ další důležité CYP metabolismu vitamínu D3 a kyseliny retinové

**REGULACE EXPRESE BIOTRANSFORMAČNÍCH
ENZYMŮ:**

CYTOSOLOVÝ Ah (aryl hydrocarbon) RECEPTOR

AhR (Aryl hydrocarbon receptor)

AhR kontroluje genovou expresi

biotransformačních enzymů
CYP1A1/1A2/1B1, UGT1A1,
GSTA2, NQO1, ALDH3A1 ...

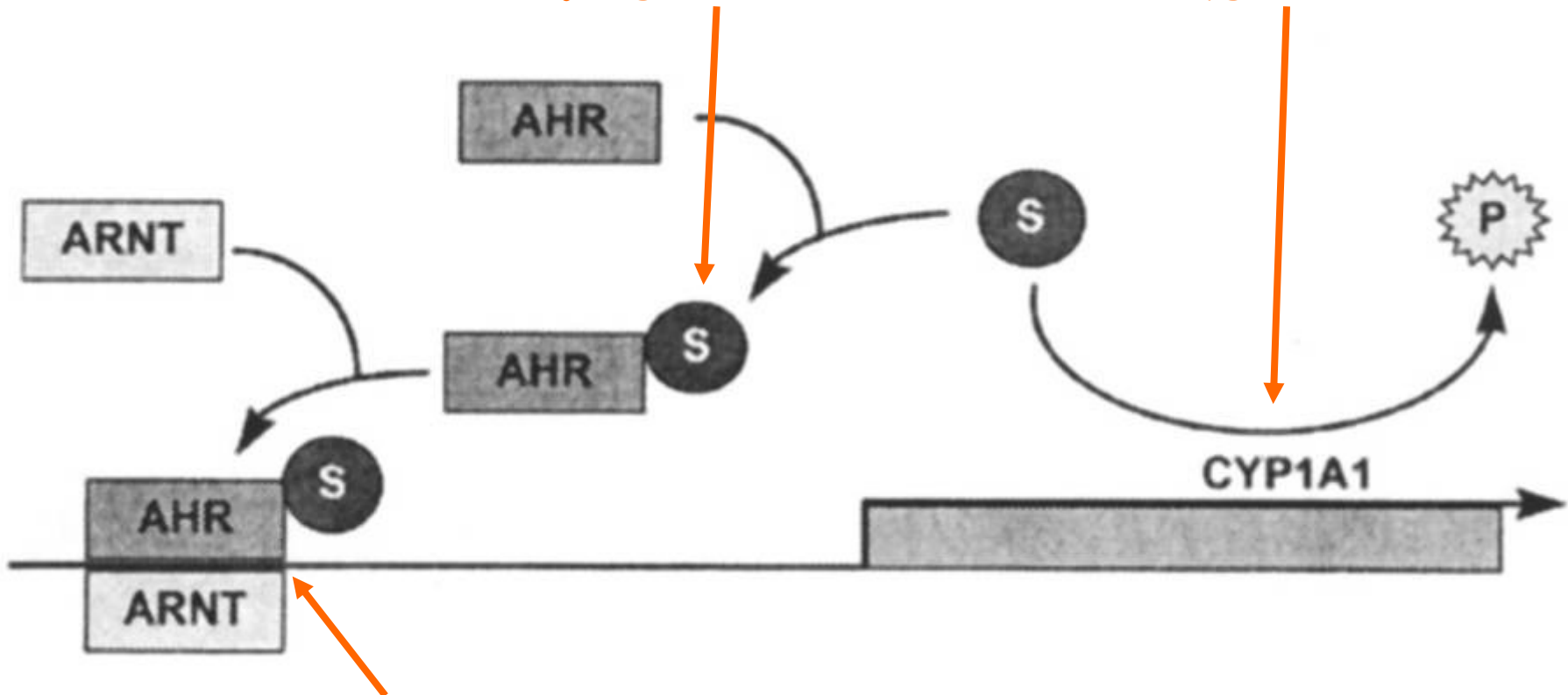
regulátorů bun. cyklu / přímé interakce (ER?,...)
apoptózy (p27, Bax,...)

další funkce AhR-dependentní genové exprese

AKTIVACE Ah RECEPTORU A INDUKCE CYP1A1 SUBSTRÁTEM CYP1A

substrát S je ligandem AhR

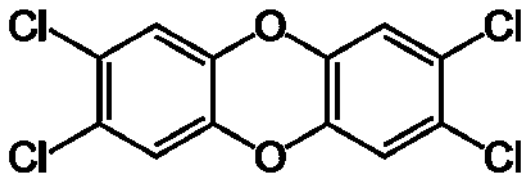
monooxygenázová reakce



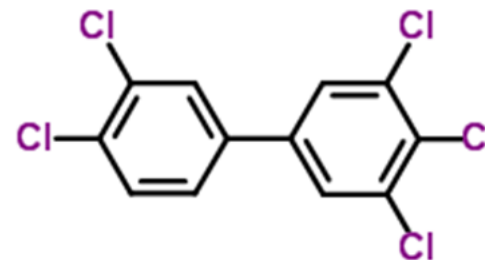
AhR/ARNT nasedá na XRE = DRE = xenobiotic (dioxin) response element

LIGANDY / INDUKTORY AhR

Strukturní podobnost (šířka, výška, molekulární objem, planarita molekuly)

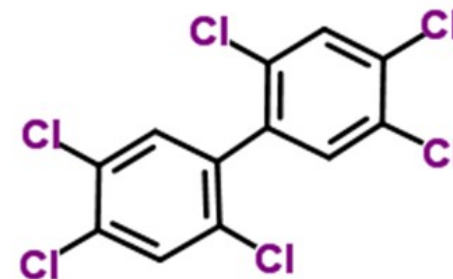


TCDD = nejsilnější agonista AhR
= modelový dioxinový toxikant



Koplanární PCB
(podobný dioxinům, agonista AhR)

Nekoplanární látky
(např. PCB se dvěma
chlóry v pozici ortho)
nevykazují planární
pozici aromatických jader
a nejsou agonisty AhR

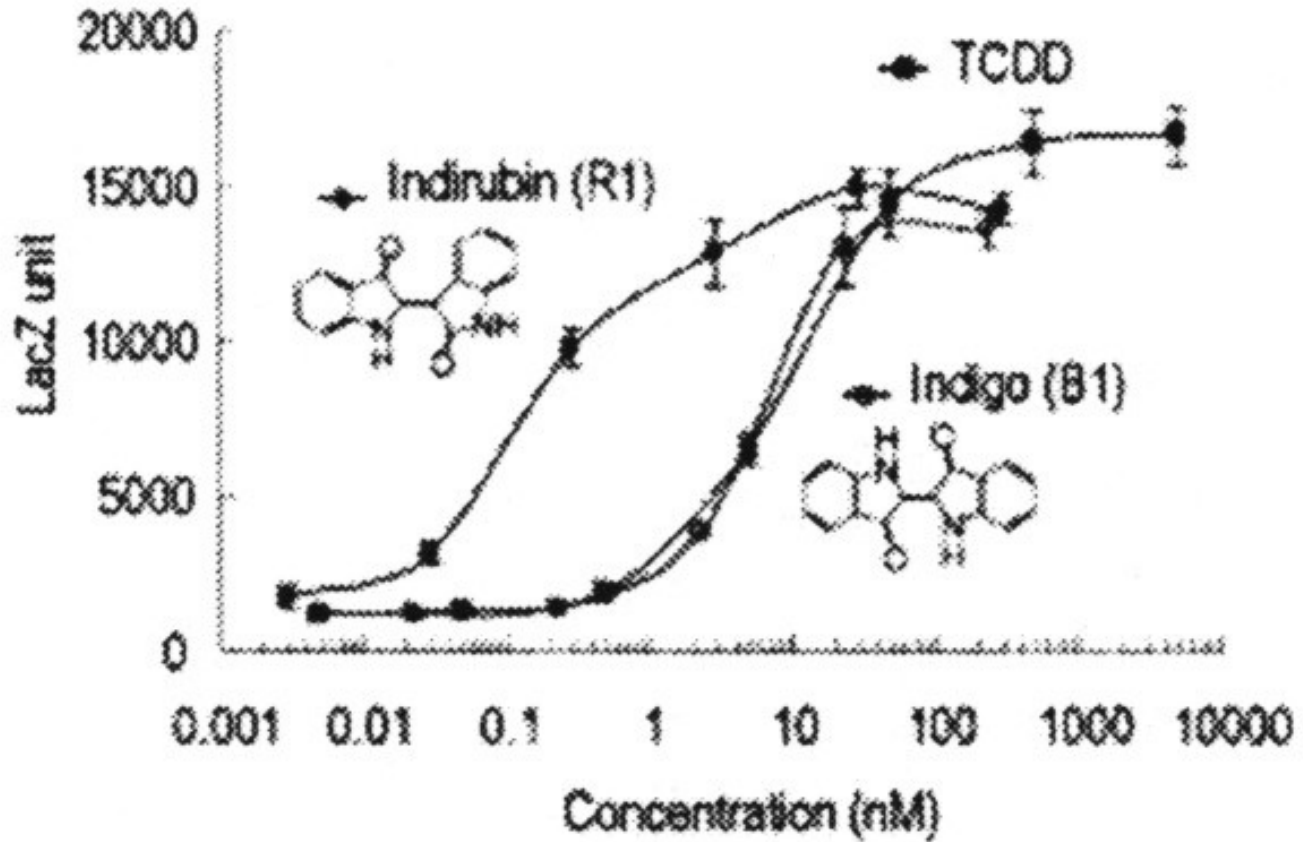


ENDOGENNÍ AGONISTÉ AhR

dosud nejsou přesně určeny (deriváty tryptofanu ?)

Fyziologické funkce AhR:

nezbytný v řadě procesů vývoje tkání, diferenciace buněk aj. (viz myši AhR-deficientní modely)



AKTIVACE Ah RECEPTORU / AhR-DEPENDENTNÍ GENOVÁ EXPRESE

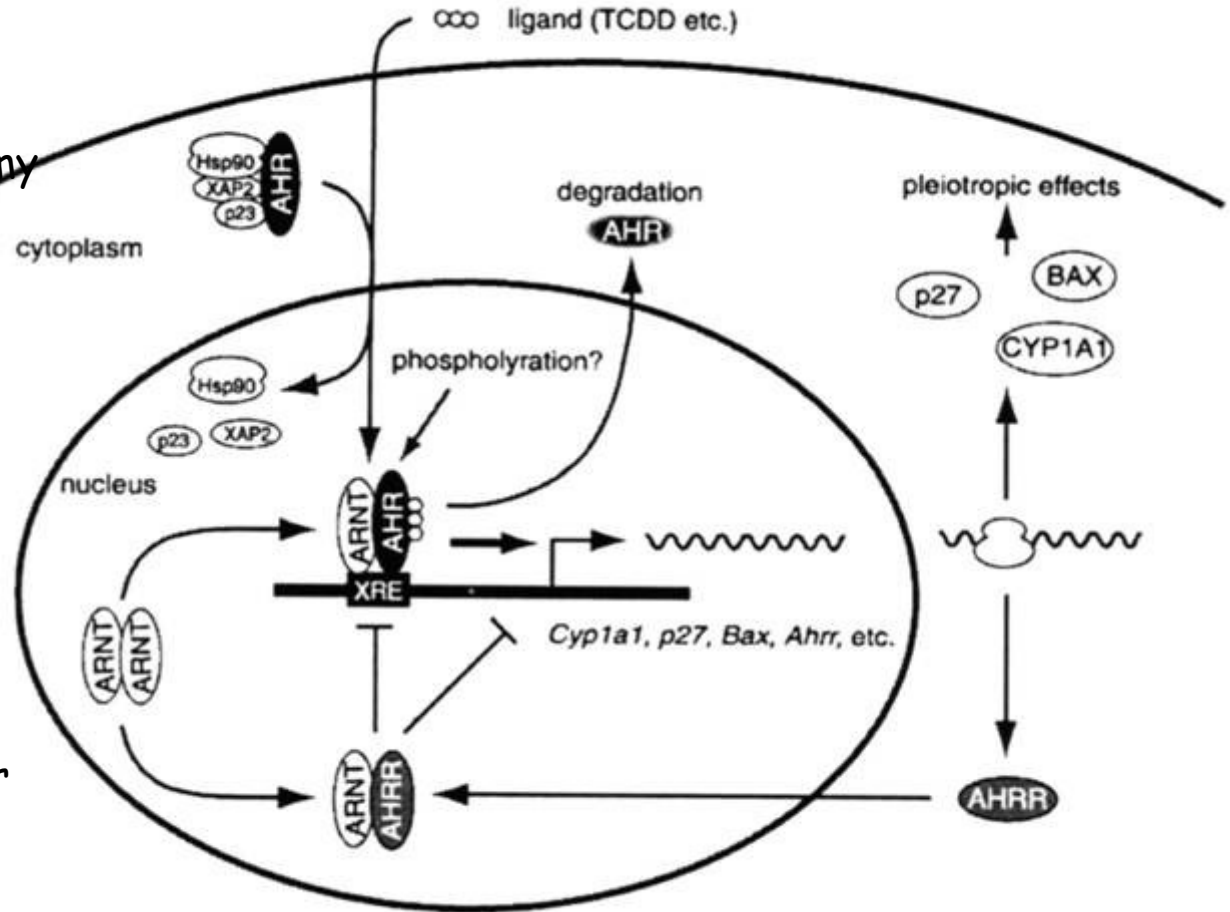
Produkty genové exprese:

- detox./bioaktiv. enzymy
- apoptóza;
- bun. cyklus;
- ?

Přímé interakce AhR („cross-talk“ s ER, ...)

Regulace AhR:

- degradace AhR po navázání ligandu
- AHRR = AhR represor

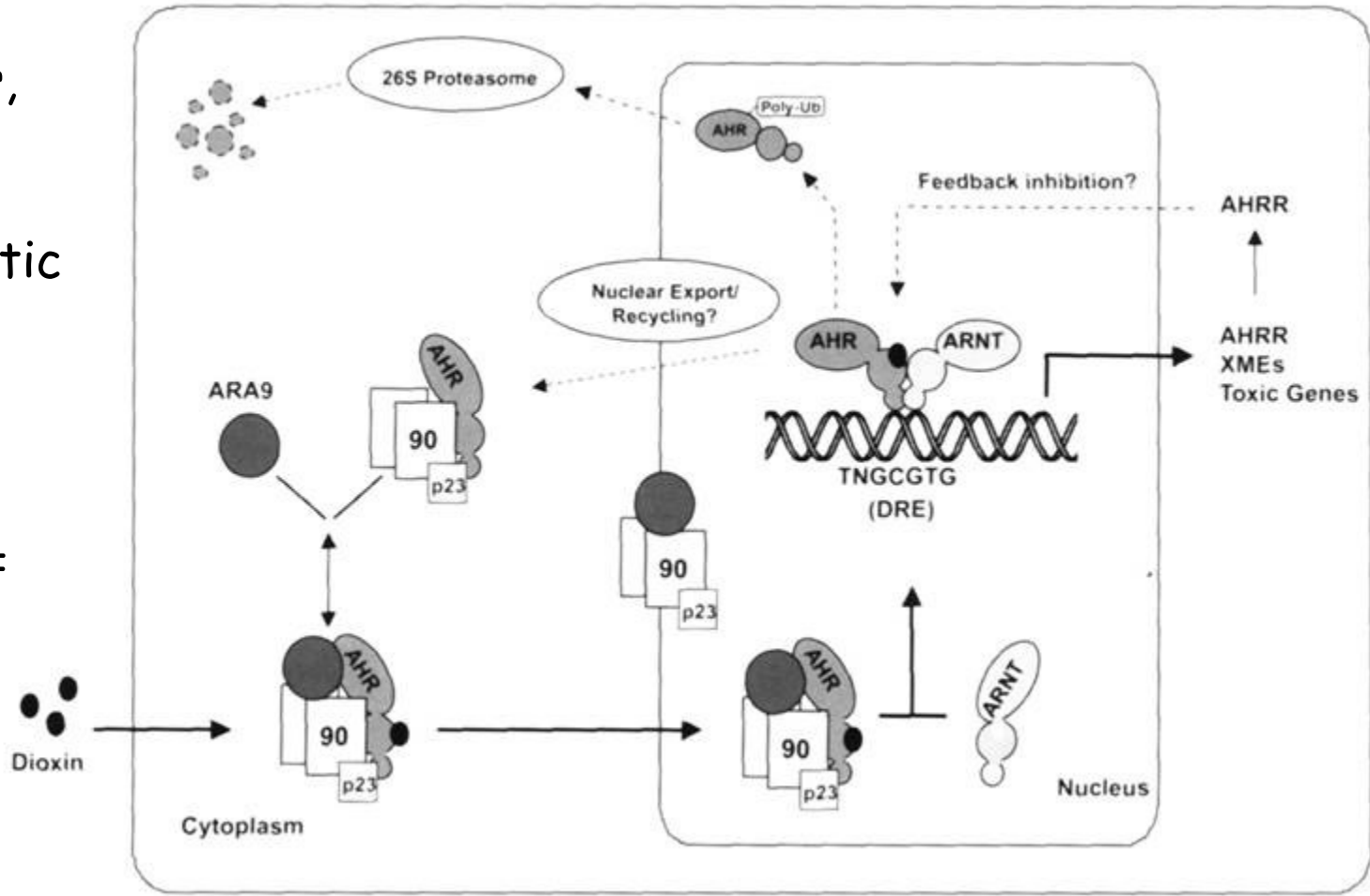


REGULACE AhR (2)

Negativní regulace AhR:
- AhR represor,
- degradace

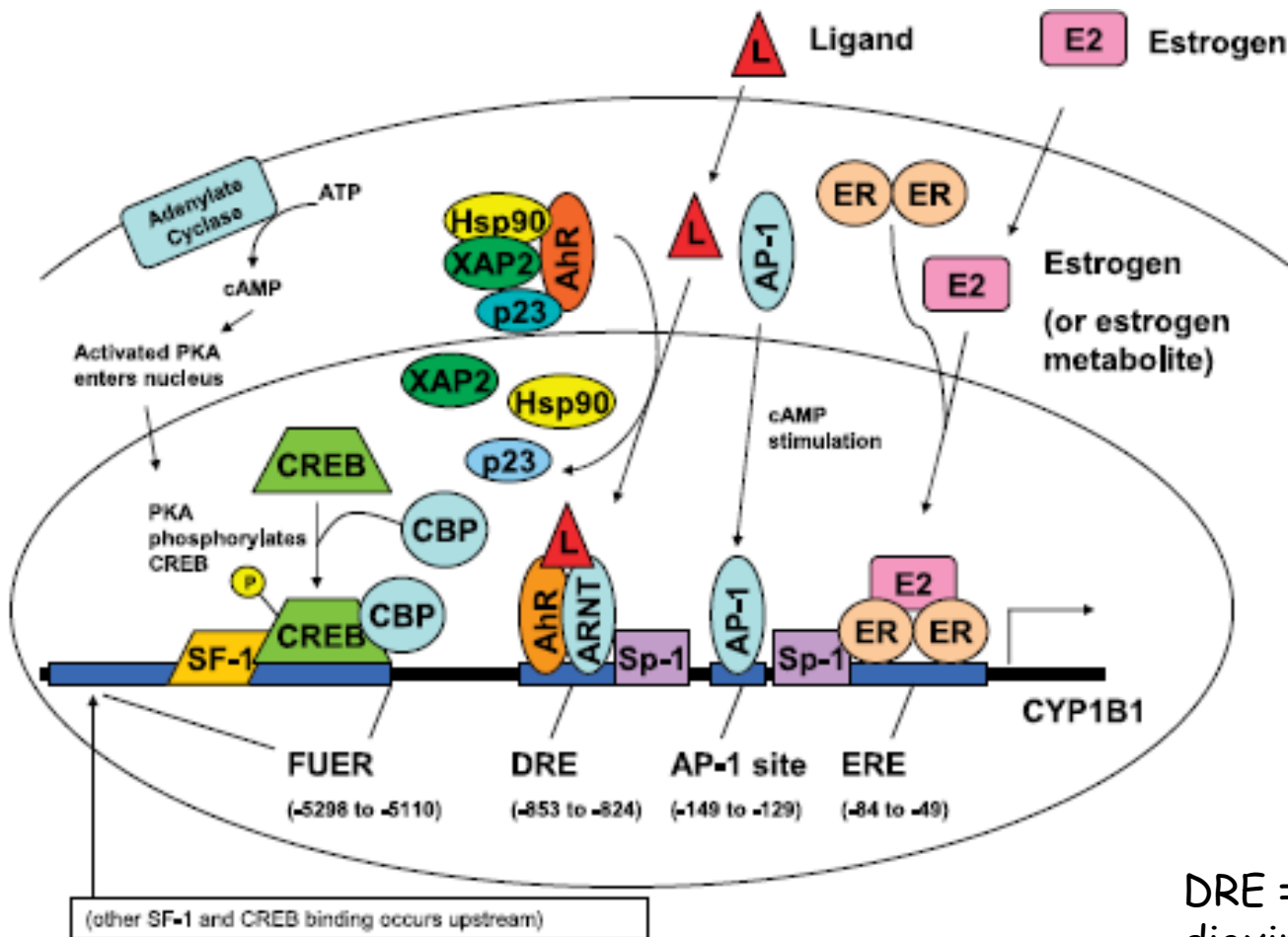
XME = xenobiotic metabolizing enzymes (CYP, UGT, ALDH...)

„Toxic genes“ = indukce genů, která vede k „dioxinové“ toxicitě



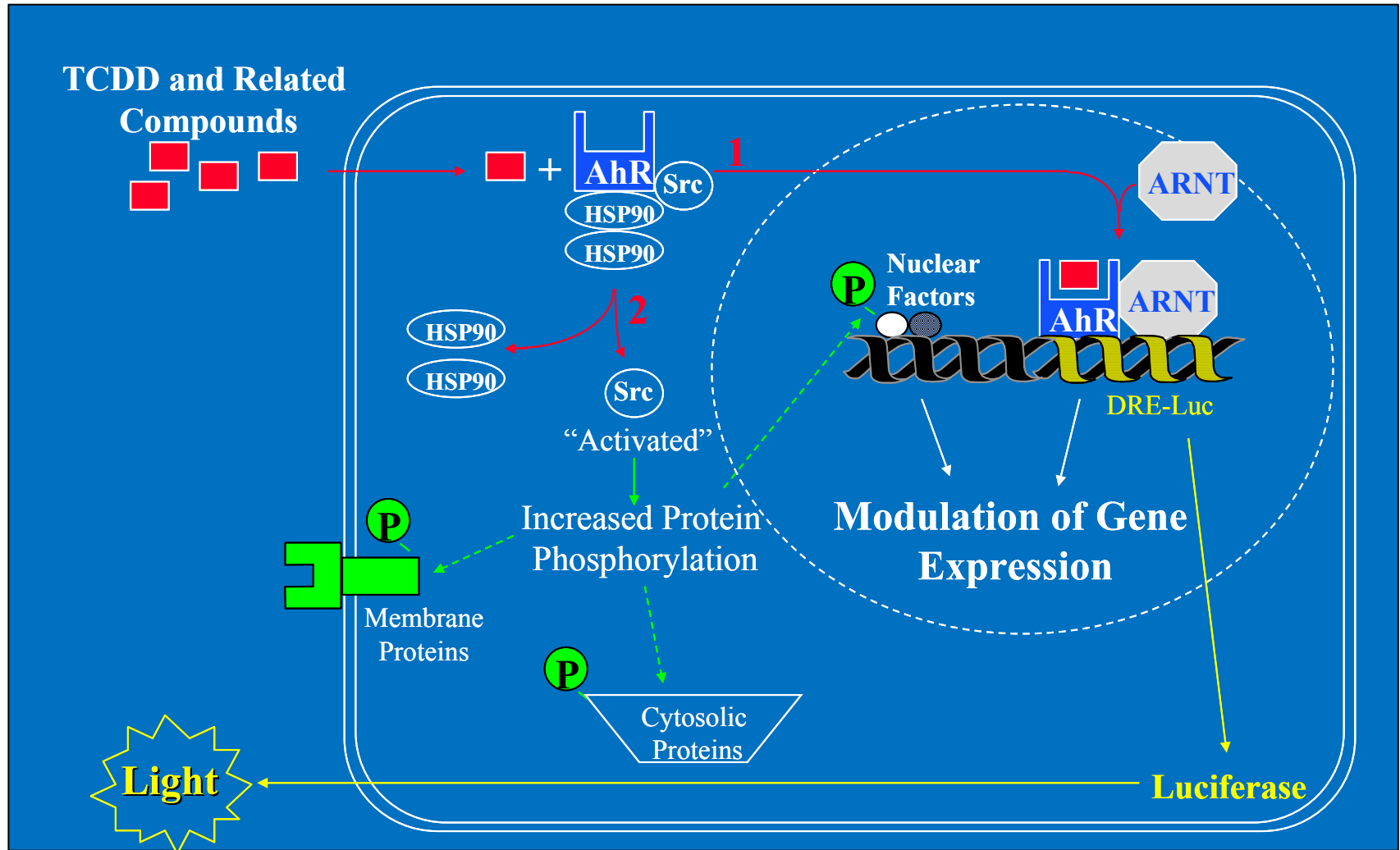
REGULACE CYTOCHROMU P4501B1 (CYP1B1)

(je velmi komplexní - několik responsních elementů)



DRE =
dioxin
response
element

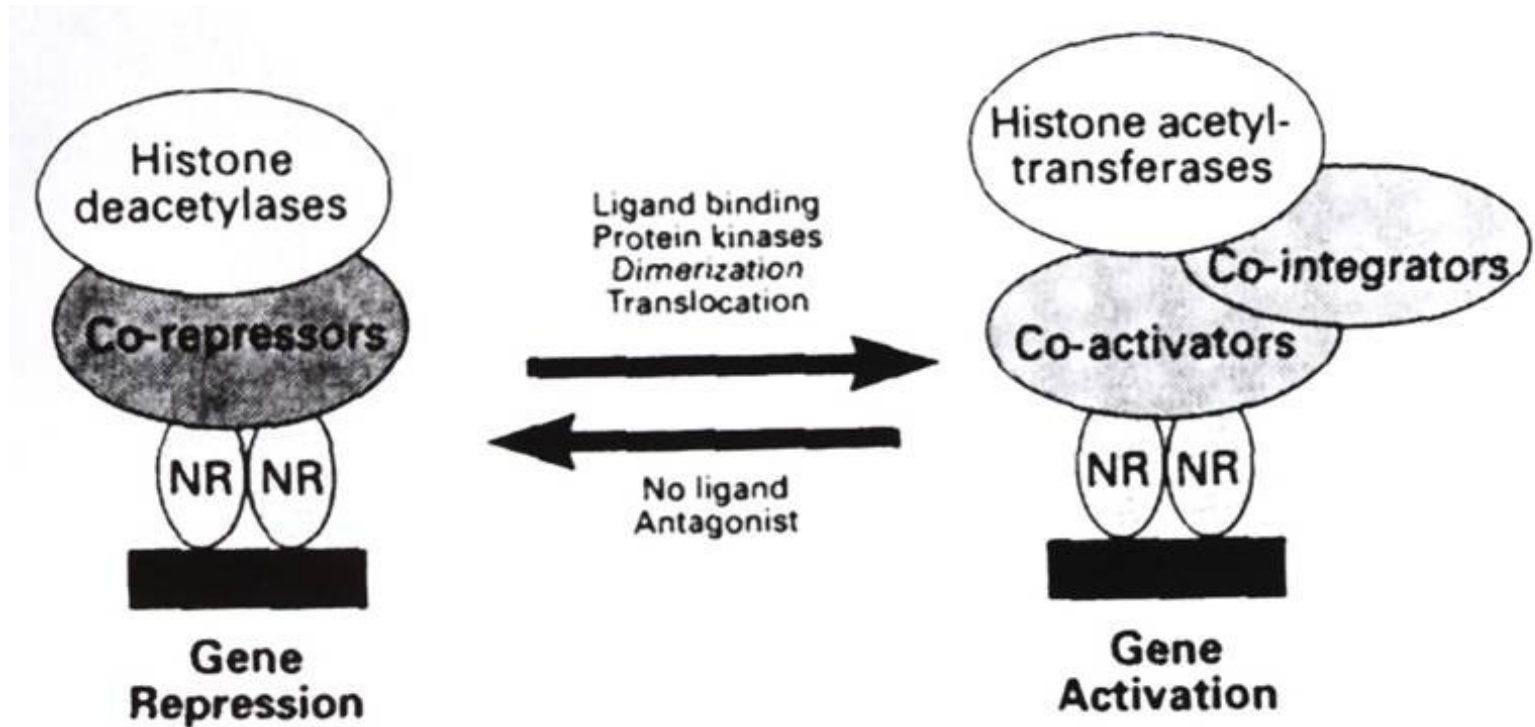
MĚŘENÍ AKTIVACE Ah RECEPTORU (transgenní model - luciferázový reportérový gen)



REGULACE EXPRESE BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ:

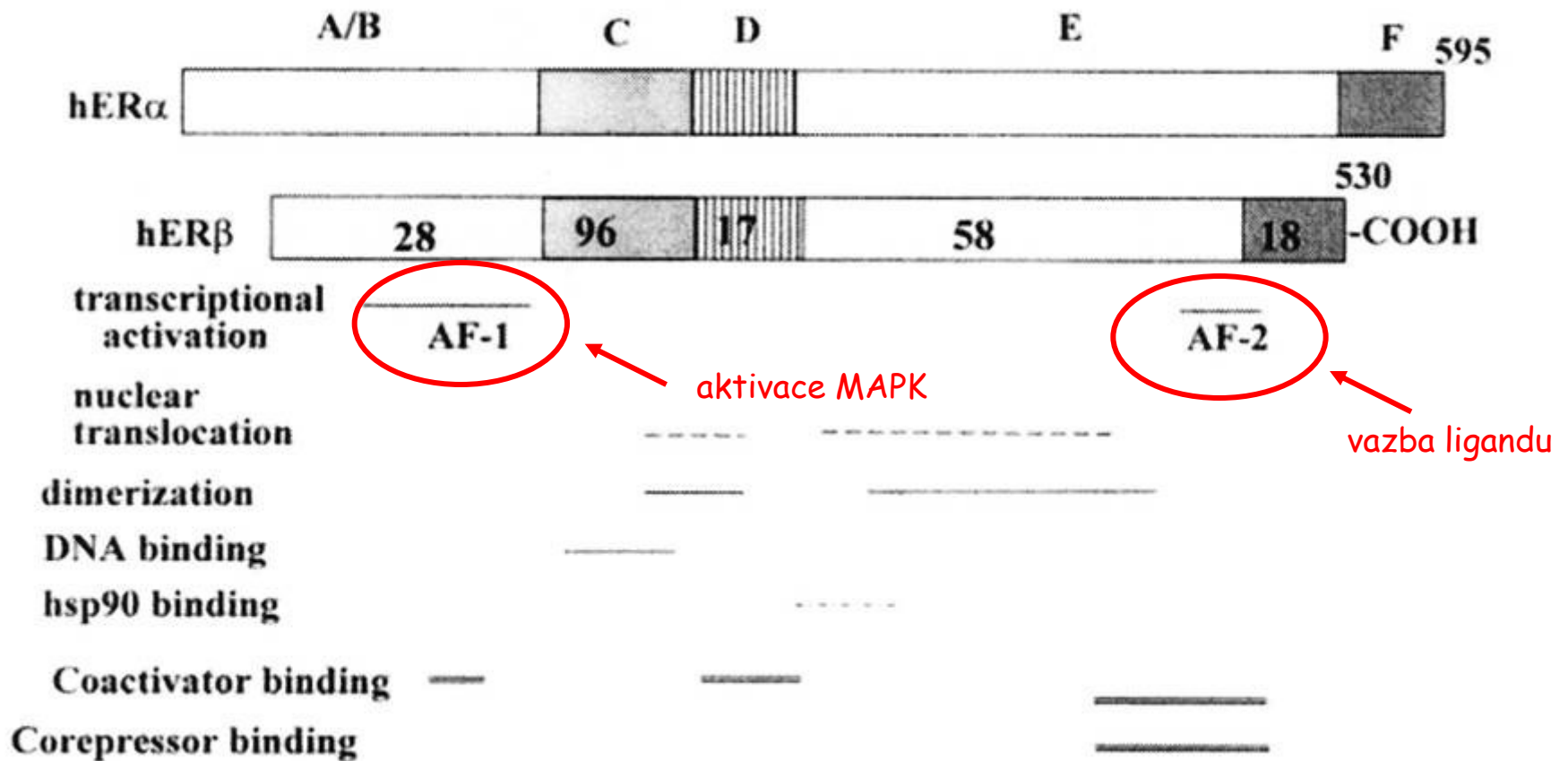
NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

NUKLEÁRNÍ RECEPTORY (NR)

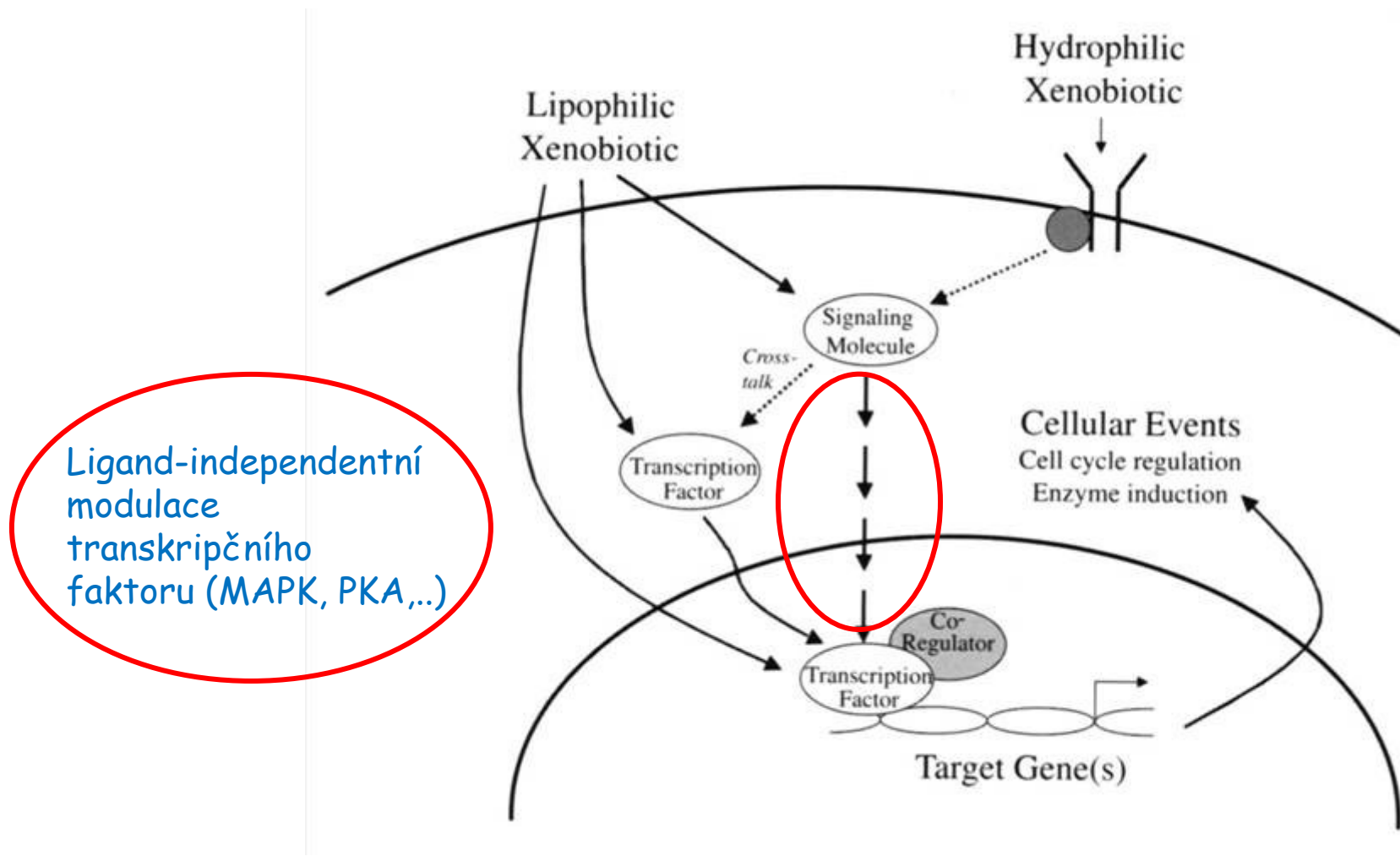


Model for gene activation and gene repression by NRs

NUKLEÁRNÍ RECEPTORY: struktura domén receptorů

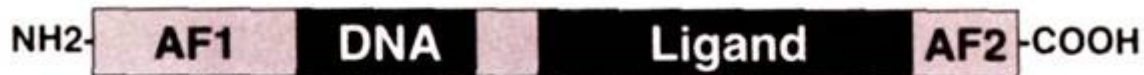
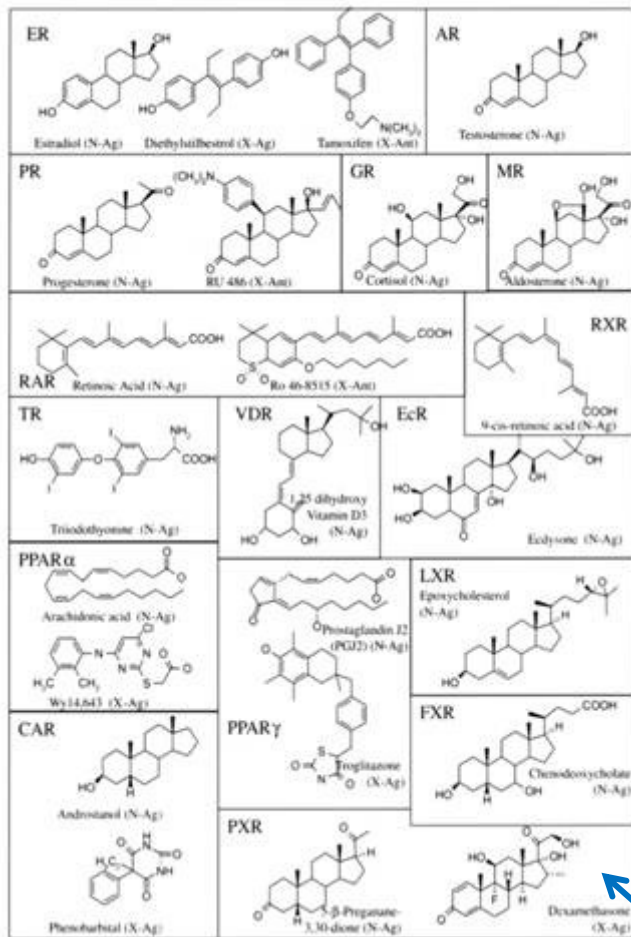


NUKLEÁRNÍ RECEPTORY MOHOU BÝT AKTIVOVÁNY TAKÉ PROTEINKINÁZAMI



NUKLEÁRNÍ RECEPTORY - KLASIFIKACE

Nuclear Hormone Receptors



	Endocrine Receptors	Adopted Orphan Receptors	Orphan Receptors
Ligands:	High-affinity, hormonal lipids	Low-affinity, dietary lipids	Unknown
	<div style="background-color: #000080; color: white; padding: 5px;"> ER α, β PR AR GR MR </div> <div style="background-color: #800080; color: white; padding: 5px;"> RAR α, β, γ TR α, β VDR EcR </div>	<div style="background-color: #FF0000; color: white; padding: 5px;"> RXR α, β, γ PPAR α, β, γ LXR α, β FXR PXR/SXR CAR </div>	<div style="background-color: #000000; color: white; padding: 5px;"> SF-1 LRH-1 DAX-1 SHP TLX PNR NGFI-B α, β, γ ROR α, β, γ ERR α, β, γ RVR α, β, γ GCNF TR 2,4 HNF-4 COUP-TF α, β, γ </div>

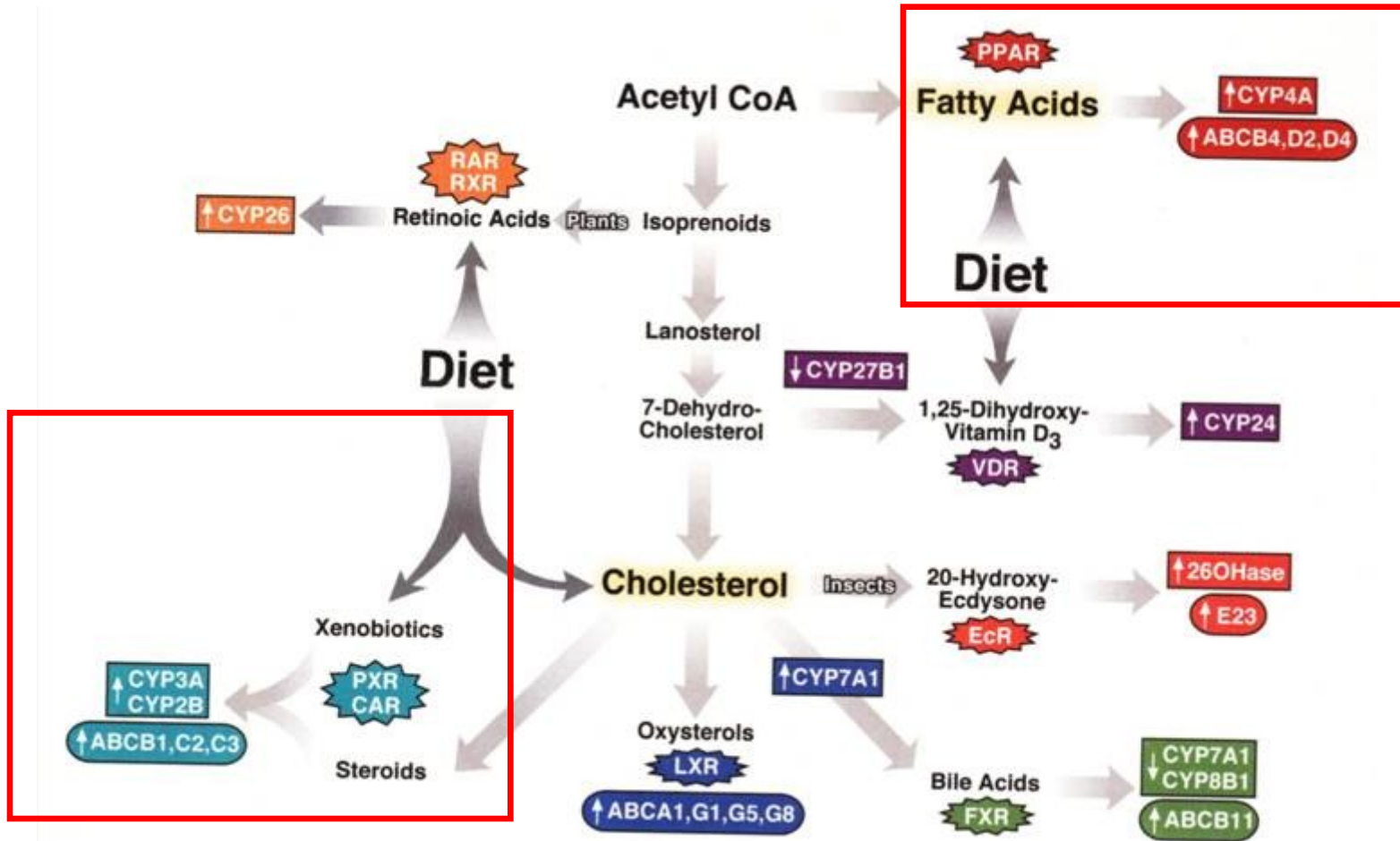
Ligandy (agonisté) jaderných receptorů

NUKLEÁRNÍ RECEPTORY, jejich ligandy a cílové geny

Nuclear receptor	Ligand	CYP enzyme	Cytosolic binding protein	ABC transporter
Retinoid X receptors*	RXR α,β,γ 9- <i>cis</i> Retinoic acid	-	-	-
Peroxisome proliferator-activated receptors	PPAR α Fatty acids Fibrates	↑ CYP4A1 ↑ CYP4A3	↑ L-FABP	↑ ABCD2, ABCD3 ↑ ABCB4
	PPAR δ Fatty acids Carboprostacyclin	(?)	(?)	(?)
	PPAR γ Fatty acids Eicosanoids Thiazolidinediones	↑ CYP4B1	↑ ALBP/aP2 ↑ H-FABP	(?)
Liver X receptors	LXR α,β Oxysterols	↑ CYP7A1	OSBPs?	↑ ABCA1, ↑ ABCG1, ABCG4 ↑ ABCG5, ABCG8
Farnesoid X receptor	FXR Bile acids	↓ CYP7A1 ↓ CYP8B1	↑ IBABP	↑ ABCB11
Xenobiotic receptors	SXR/PXR Xenobiotics Steroids	↑ CYP3A ↑ CYP2C	(?)	↑ ABCB1, ABCC2
	CAR Xenobiotics Phenobarbital	↑ CYP2B ↑ CYP2C	(?)	↑ ABCC3
Ecdysone receptor	EcR 20(OH)-ecdysone	↑ 26-(OH)ase	Hexamerins	↑ E23
Retinoic acid receptors	RAR α,β,γ Retinoic acids	↑ CYP26A1	↑ CRABPII ↑ CRBPI	(?)
Vitamin D receptor	VDR 1,25(OH) ₂ -vitamin D ₃	↑ CYP24 ↓ CYP27B1	(?)	(?)

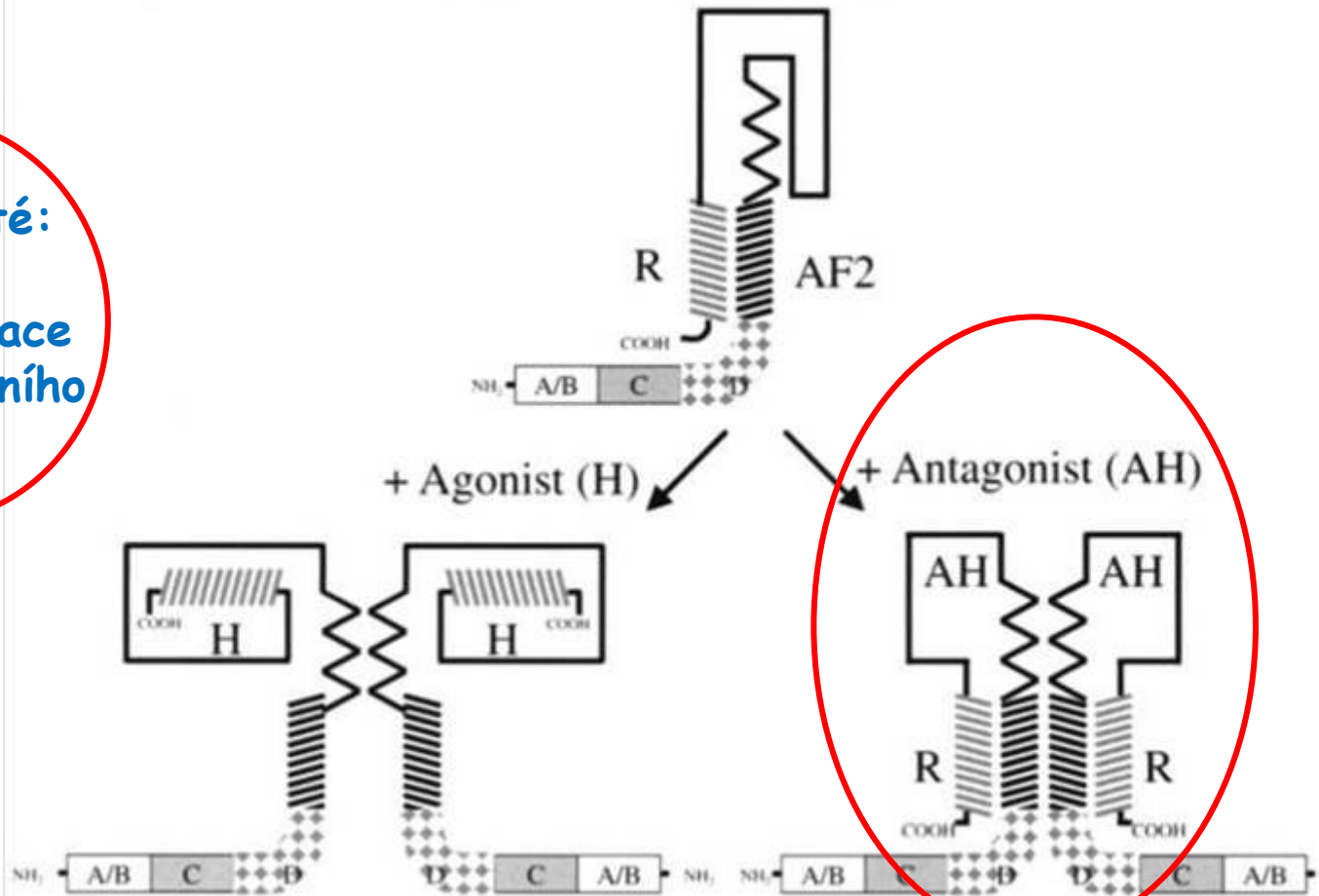
NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

= „xenosensory“ a „lipidní sensory“
(aktivace transkripce po expozici xenobiotiky resp. lipidy)



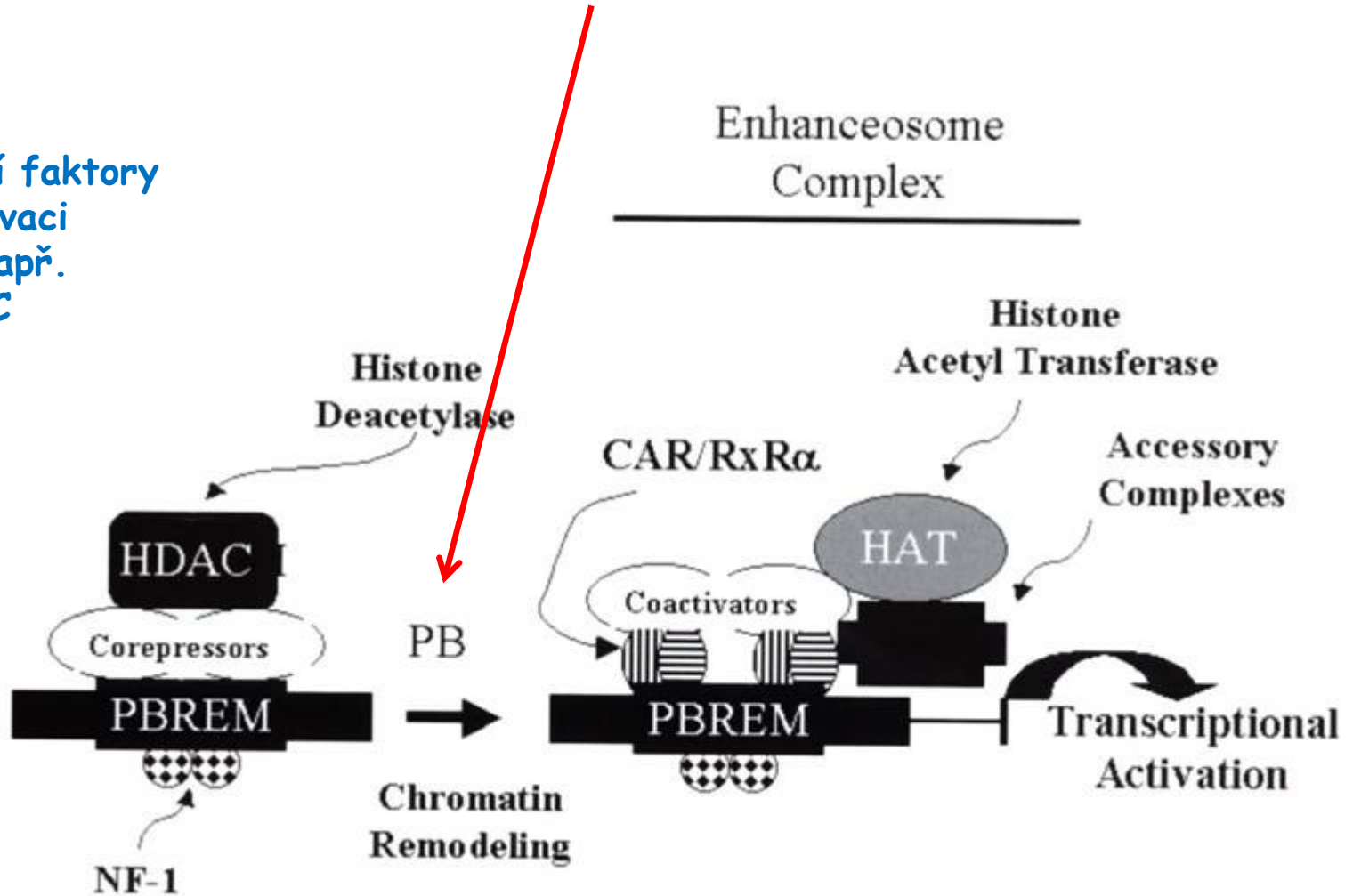
NUKLEÁRNÍ RECEPTORY: vazba antagonistického a agonistického ligandu

Antagonisté:
vazba bez
transaktivace
transkripčního
faktoru



REGULACE TRANSKRIPČNÍHO FAKTORU CAR FENOBARBITALEM

Ovlivněny další faktory modulující aktivaci transkripce, např. HAT vs. HDAC



FENOBARBITAL (PB) - agonista CAR (a induktor biotransformačných enzymů), ale také indukce metabolismu endogenních látek

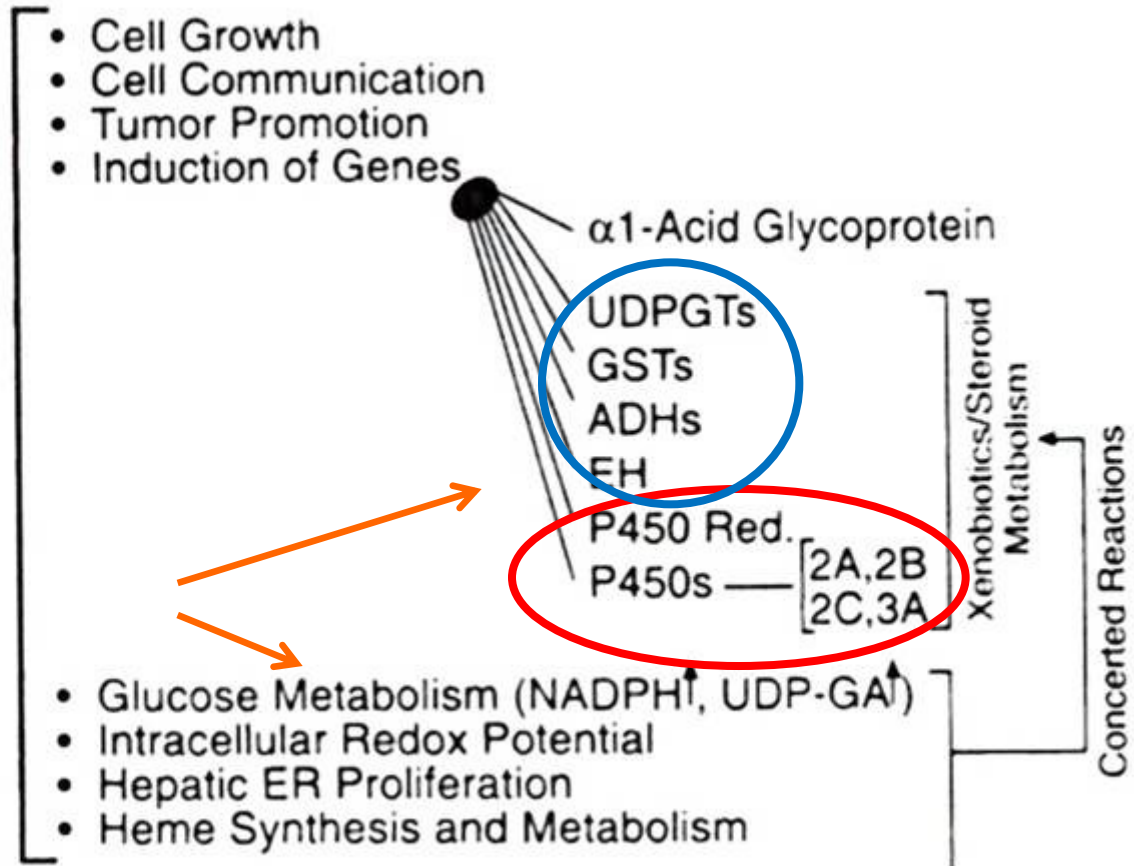
Biotransformace:

enzymy 1. fáze

enzymy 2. fáze

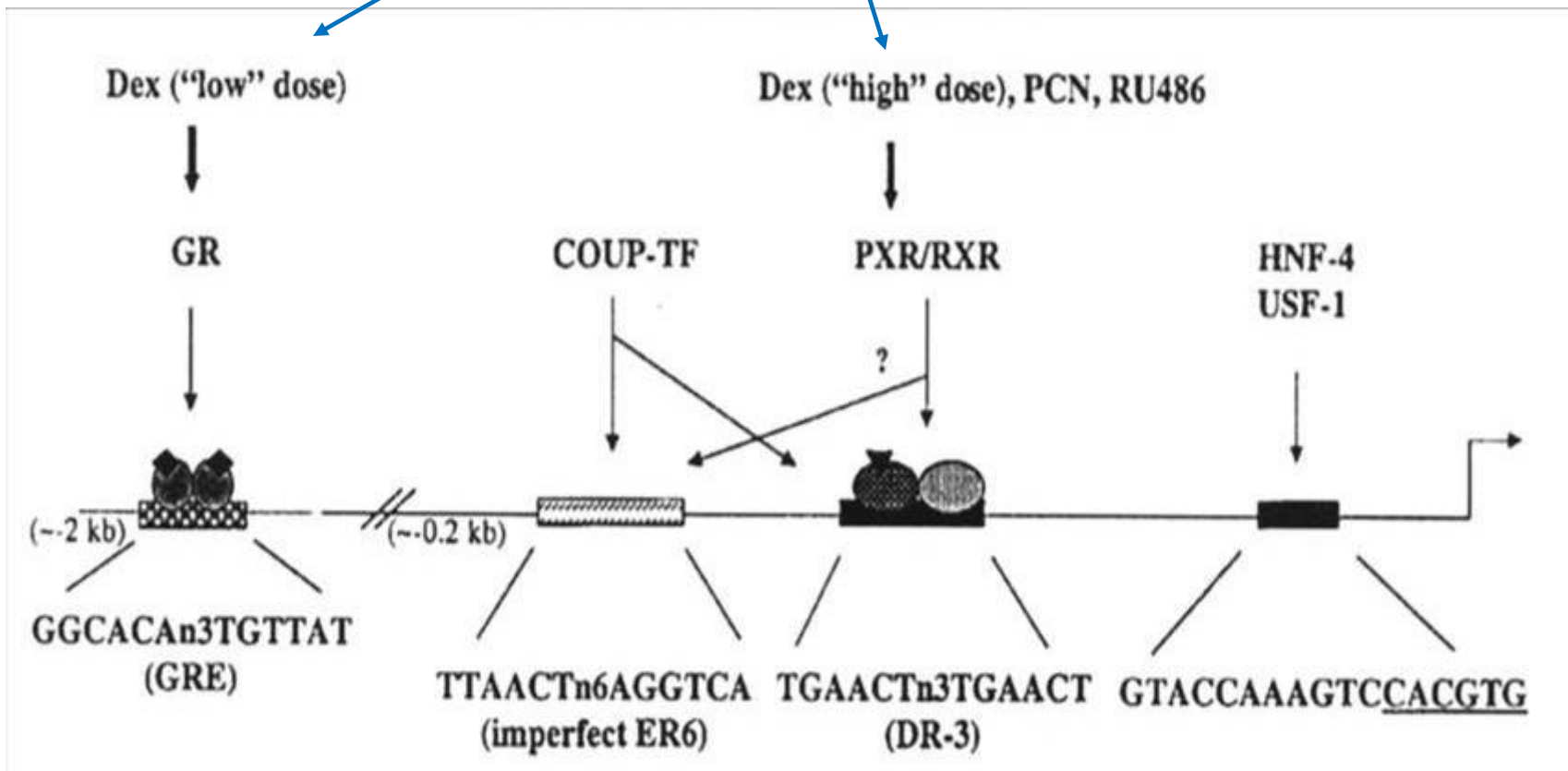
PB →

Modulace endogenního metabolismu



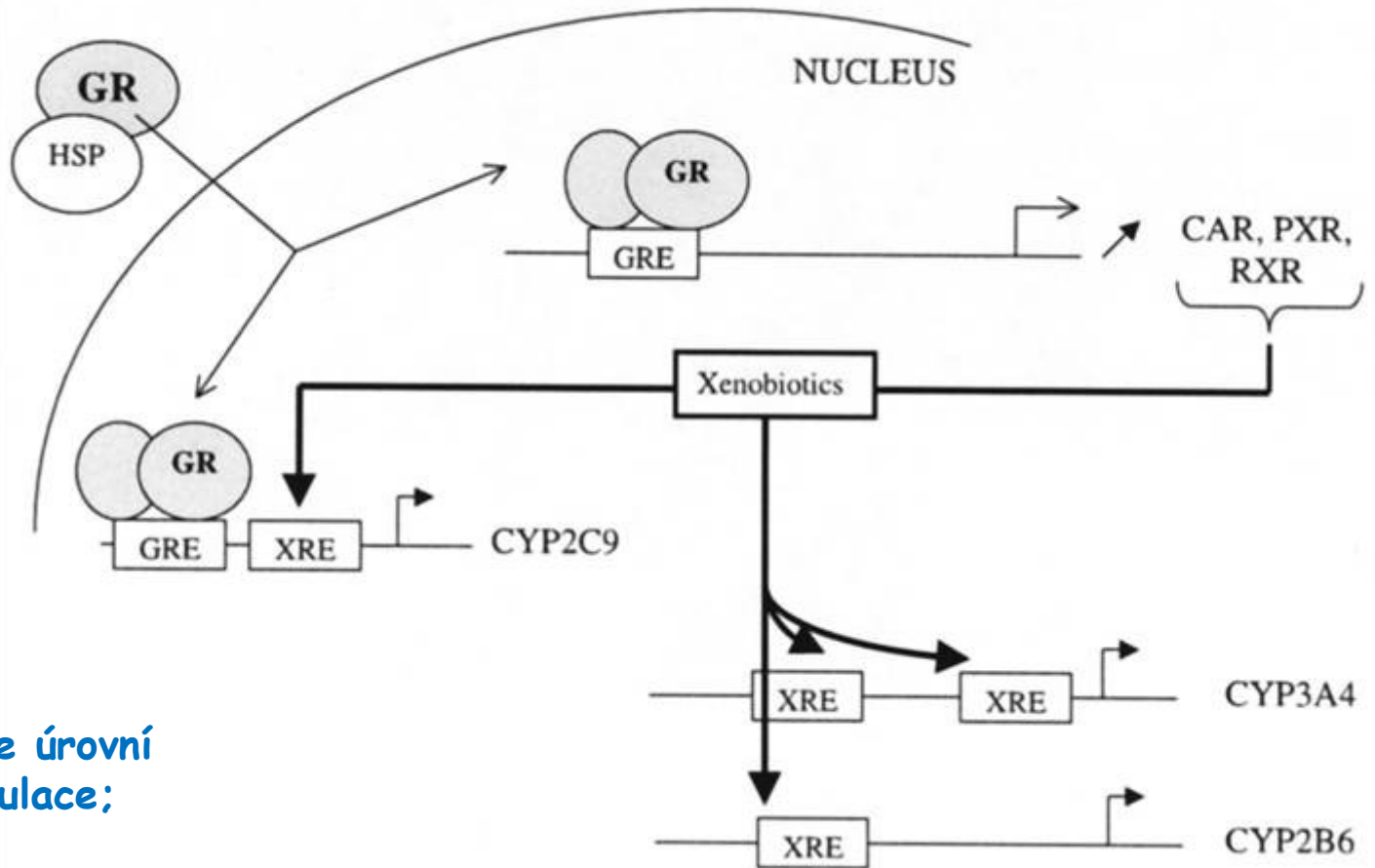
REGULACE GR / PXR / CAR

aktivace nízkou vs. vysokou koncentrací ligandu



REGULACE GR / PXR / CAR

J.M. Pascussi et al. / Biochimica et Biophysica Acta 1619 (2003) 243–253

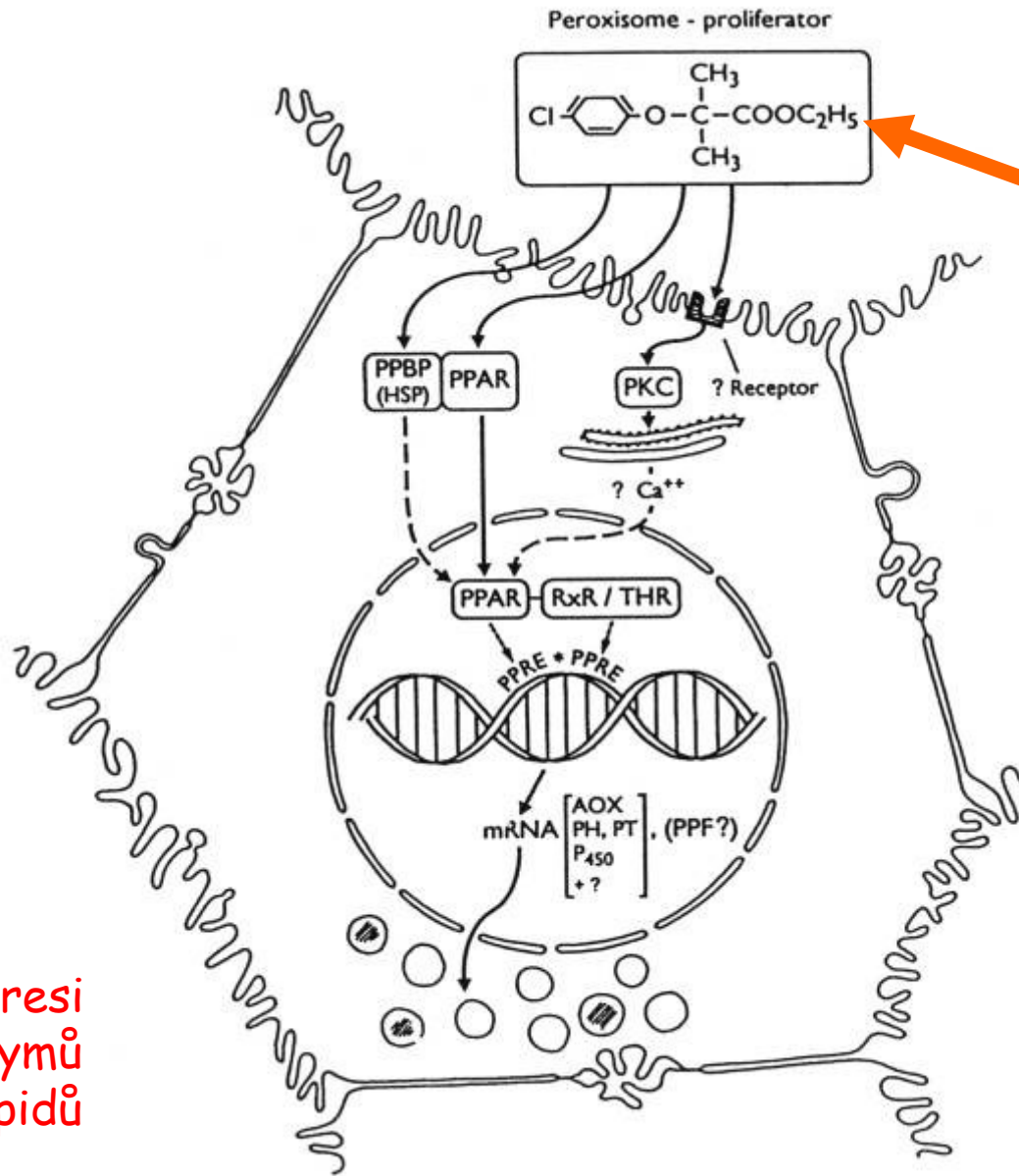


Více úrovní
regulace;

aktivace nízkou
vs. vysokou
koncentrací
ligandu

PPAR α
(Peroxisomal
Proliferator-
Activated
Receptor alpha)

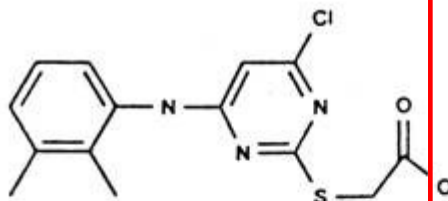
kontroluje expresi
CYP4A11 a enzymů
metabolismu lipidů



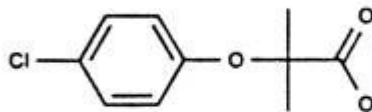
Induktory:
mastné
kyseliny,
hypo-
lipidemika
(fibráty),
environ.
látky
(ftaláty)

LIGANDY PPAR α

Farmaka
(hypolimidemika)

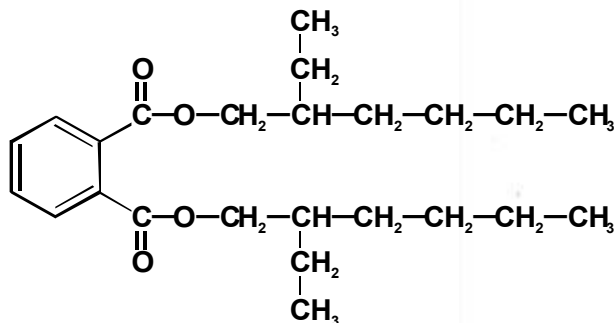


Wy 14,643

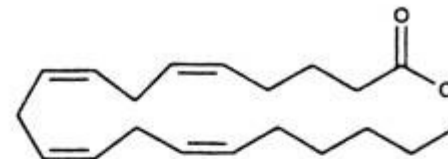


Clofibrate

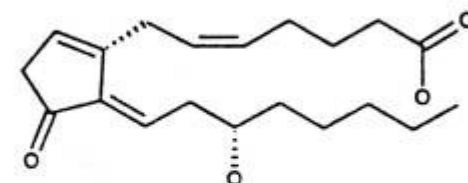
Environmentální
kontaminanty



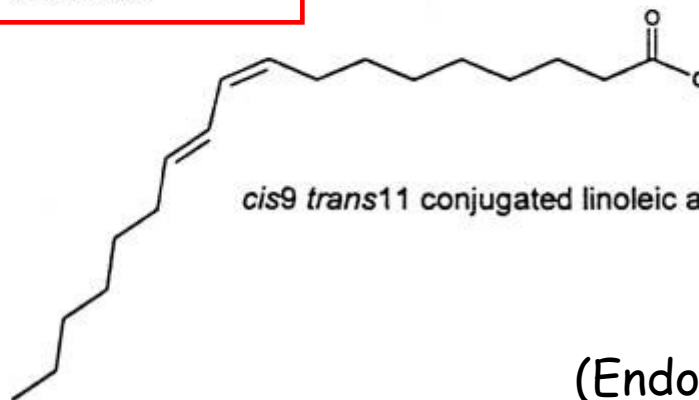
Di(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP)



Arachidonic Acid



Prostaglandin J2

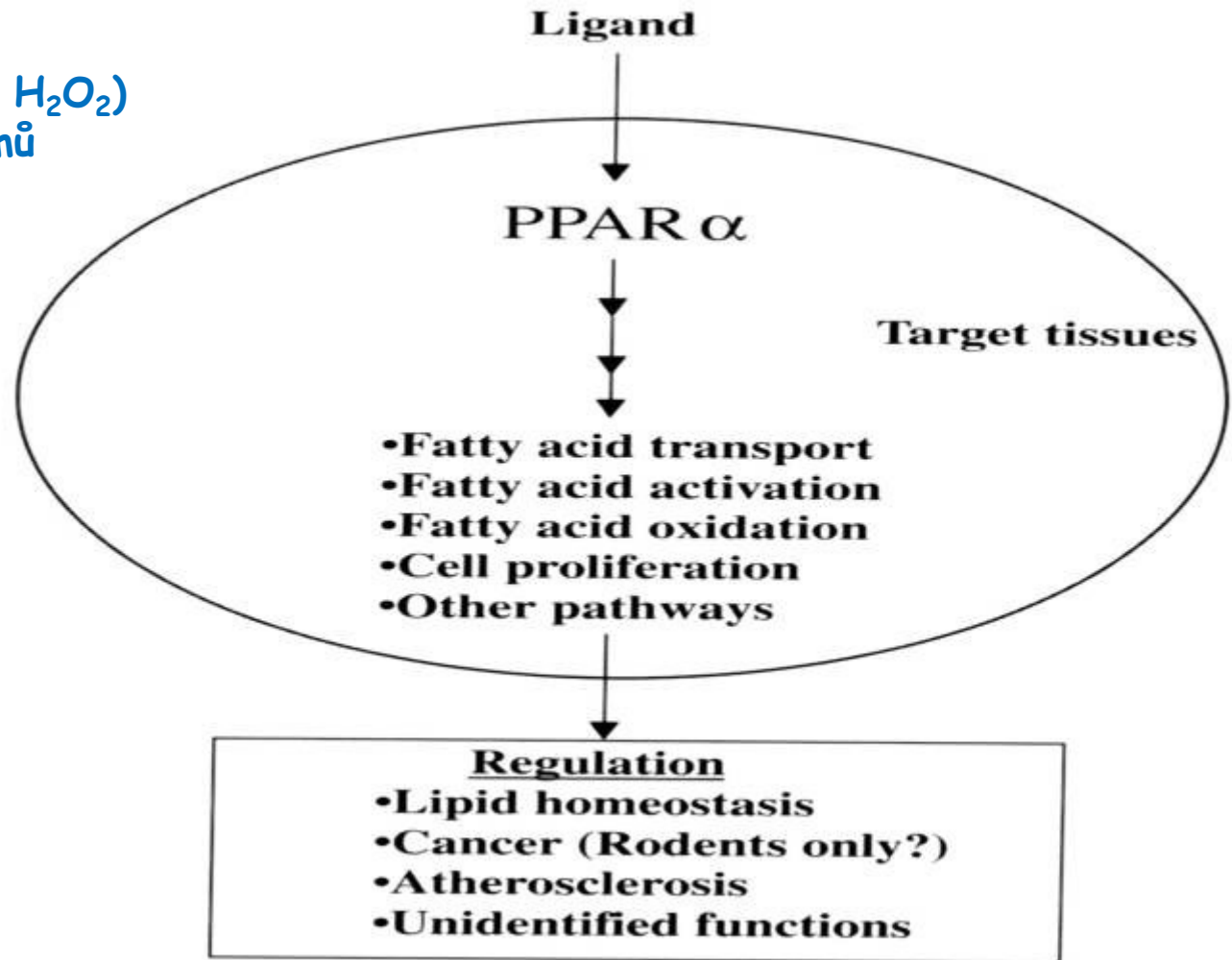


cis9 trans11 conjugated linoleic acid

(Endogenní) lipidy

DŮSLEDKY AKTIVACE PPAR α

Nerovnoměrná
indukce CYP4A
(vedl. produkt: H₂O₂)
a dalších enzymů
(např. CAT)
dependentních
na PPARalfa

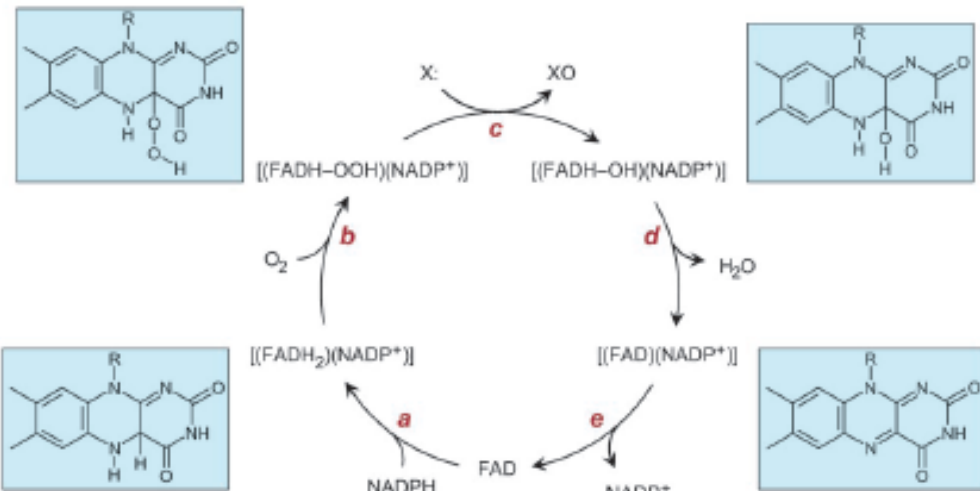


DALŠÍ ENZYMY 1.FÁZE BIOTRASFORMACE A JEJICH REGULACE

- flavinmonooxygenázy (FAD enzymy, NADPH přímo reaguje s enzymem);
- peroxidázy (hemoproteiny oxidující 2-aminofluoren, PAH, fenoly; radikálové jednoelektronové reakce);
- alkoholdehydrogenázy (koenzym NADH, oxidace prim. a sek. alkoholů);
- aldehyddehydrogenázy (oxidace= detoxikace aldehydů a ketonů);
- aldoketoreduktázy (AKR, oxidační reakce alkoholů - NAD⁺; redukce aldehydů a ketonů na alkoholy za účasti NADPH);
- reduktázy xenobiotik (aldoketoreduktázy AKR, dehydrogenázy s krátkým řetězcem SDR, dehydrogenázy se středně dlouhým řetězcem, NADPH/chinonoxidoreduktáza - dvouelektronová redukce chinonů);
- hydrolázy (štěpení substrátu za účasti vody; acetylcholinesterázy, karboxyesterázy, epoxidhydrolázy)

FLAVINMONOOXYGENÁZY (obsahuje flavinový koenzym FAD)

The catalytic cycle of FMO

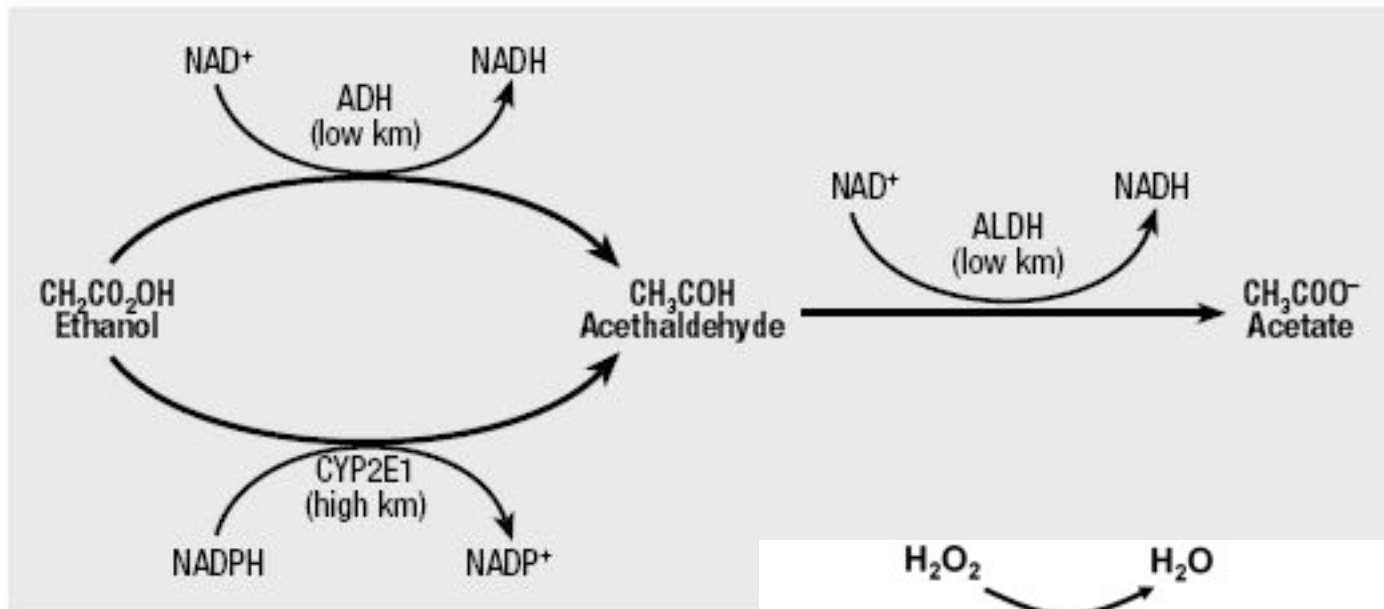


Some characteristics of FMO

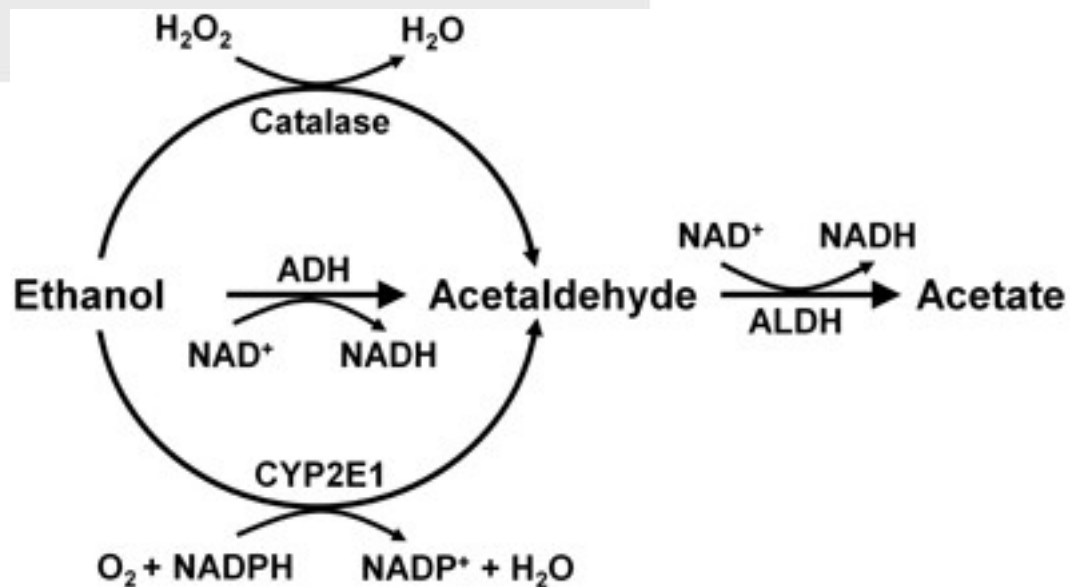
Isoforms most relevant for drug metabolism	<ul style="list-style-type: none"> FMO1 (fetal human liver, adult kidney, intestine, liver of nonhuman mammals) FMO2 (lung) FMO3 (adult liver)
Substrate characteristics	<ul style="list-style-type: none"> Soft nucleophiles (basic amines, sulfides, Se- or P-containing compounds) Favorable: neutral or with single positive charge Unfavorable: zwitterions, anions, dications
Typical reactions	<ul style="list-style-type: none"> Formation of <i>N</i>-oxides (aliphatic, heterocyclic amines), <i>S</i>-oxides, <i>Se</i>-oxides, phosphine oxides No direct dealkylations or deaminations by <i>C</i>-hydroxylation as with CYPs
Typical drug substrates	Albendazole, benzydamine, chlorpheniramine, cimetidine, clindamycin, fenbendazole, itopride, olopatadine, pargyline, ranitidine, sulindac sulfide, thioridazine, xanomeline, zimeldine
Endogenous substrates	Cysteamine, cysteine conjugates, lipoic acid, methionine, trimethylamine (FMO3)

Enzyme subclass and sub-subclass	<i>EC 1.14</i> : Oxidoreductases acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen // <i>EC 1.14.13</i> : With NADH or NADPH as one donor, and incorporation of one O-atom
Systematic name	<i>N,N</i> -Dimethylaniline,NADPH: oxygen oxidoreductase (<i>N</i> -oxide-forming)
Gene root, isoforms	<i>FMO</i> , five functional human enzymes (FMO1 to FMO5)
Prosthetic group	Flavin-adenine dinucleotide (FAD)
Cofactor	NADPH
Subcellular localization	Membrane of smooth endoplasmic reticulum
Organs (highest levels)	Liver, lungs, kidneys

ALKOHOLDEHYDROGENÁZY



Metabolismus etanolu třemi enzymovými systémy



ALDOKETOREDUKTÁZY

- většinou monomerní NAD(P)(H)-dependentní oxido-reduktázy; konvertují **karbonyl** \rightleftharpoons **alkohol**
- dosud 115 enzymů ve 14 „genových rodinách“;
- substrátová specifita: cukerné aldehydy; steroidní hormony; prostaglandiny a lipidové aldehydy; metabolizují také některé chemické karcinogeny (NNK, PAH-*trans*-dihydrodioly, aflatoxindialdehyd)

Příklady lidských AKR:

AKR1A1 (aldehydoreduktáza)

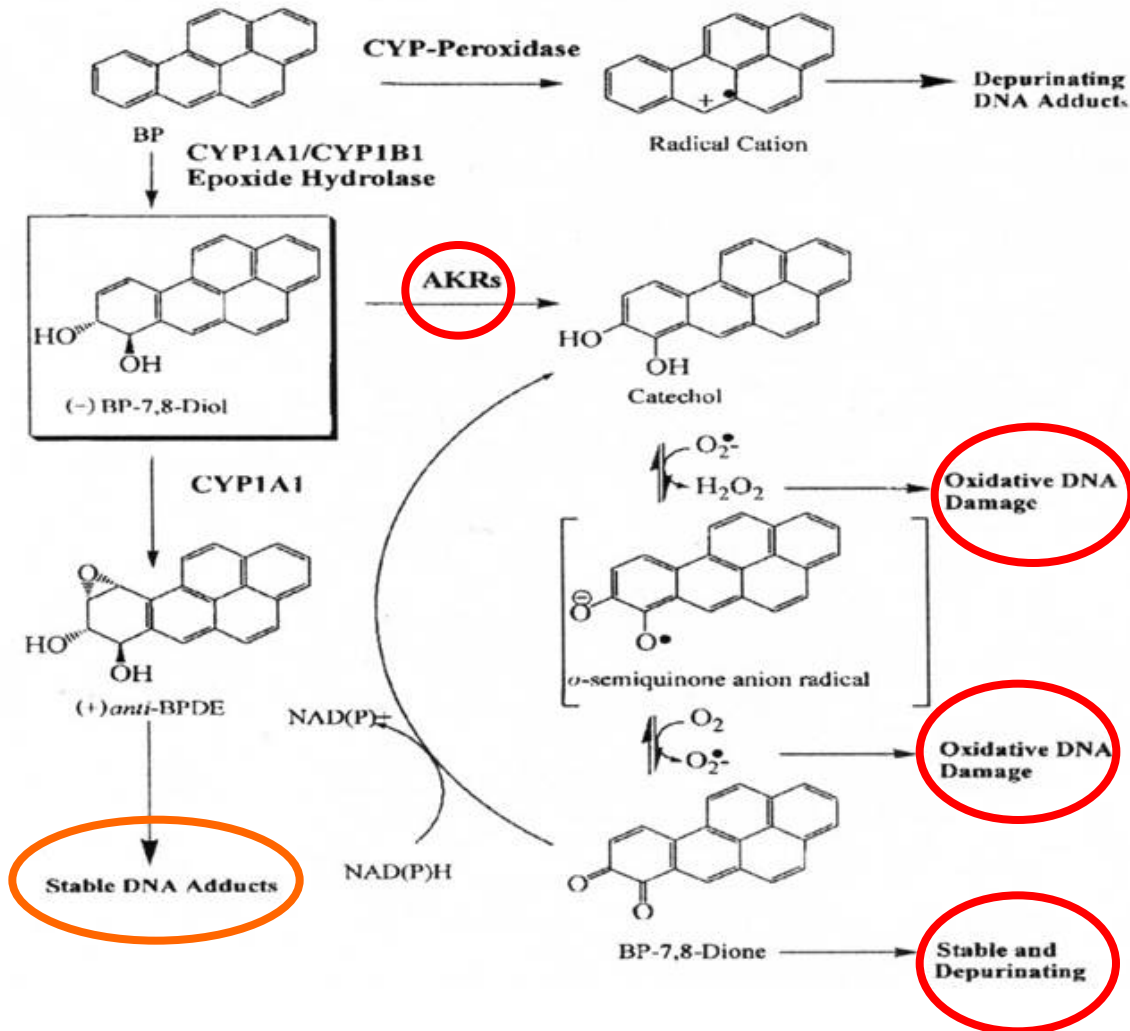
AKR1B1 (aldosareduktáza)

AKR1C1-1C4 (20 α -, 3 α -, 3 α /17 α -, 3 α -HSD)

AKR1D1 (5 β -reduktáza)

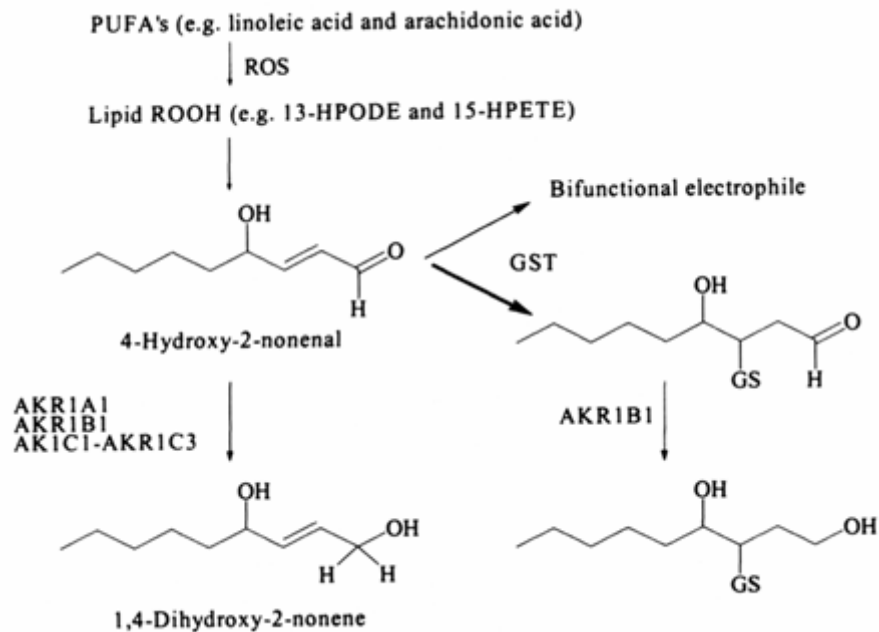
1. fáze biotransformace PAH: účast CYP1A1/1A2/1B1 (monooxygenace), EH (hydroláza) a AKR (reduktáza)

Detoxikace
versus
bioaktivace



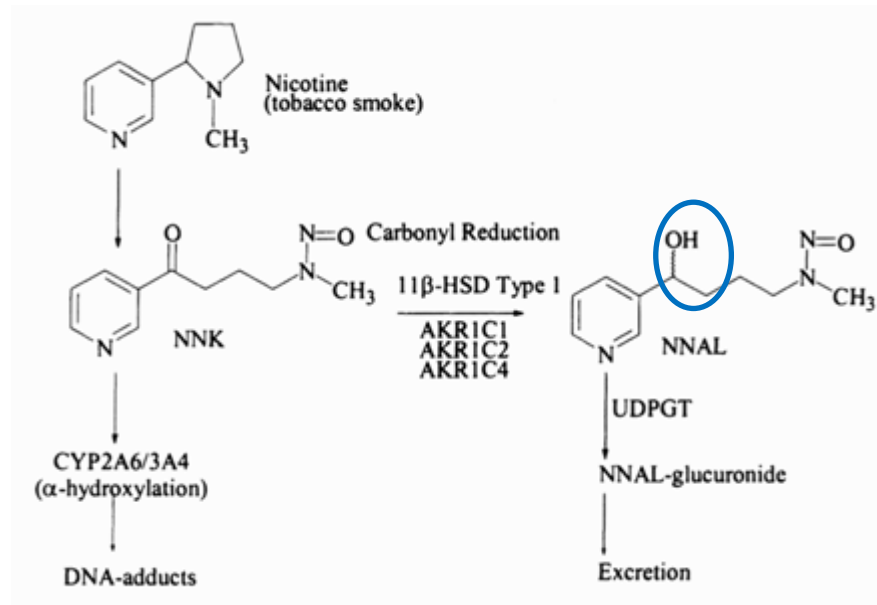
katecholy =
- metabolity PAHs,
- podobně
metabolity
steroidů (E2)

ALDOKETOREDUKTÁZY: příklady detoxikačních reakcí

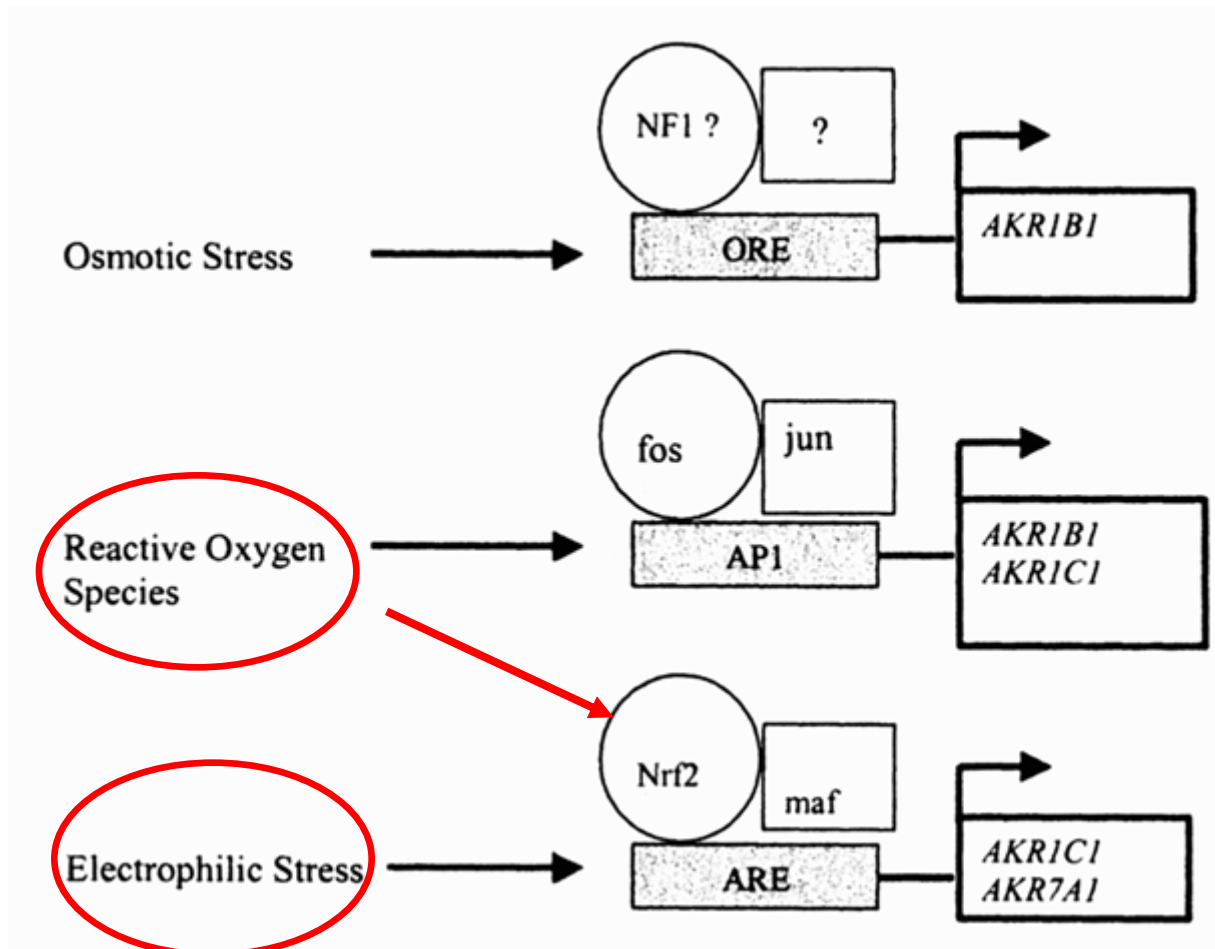


Detoxikace NNK
(redukce)

Biotransformace (detoxikace) aldehydů vzniklých v průběhu lipidní peroxidace



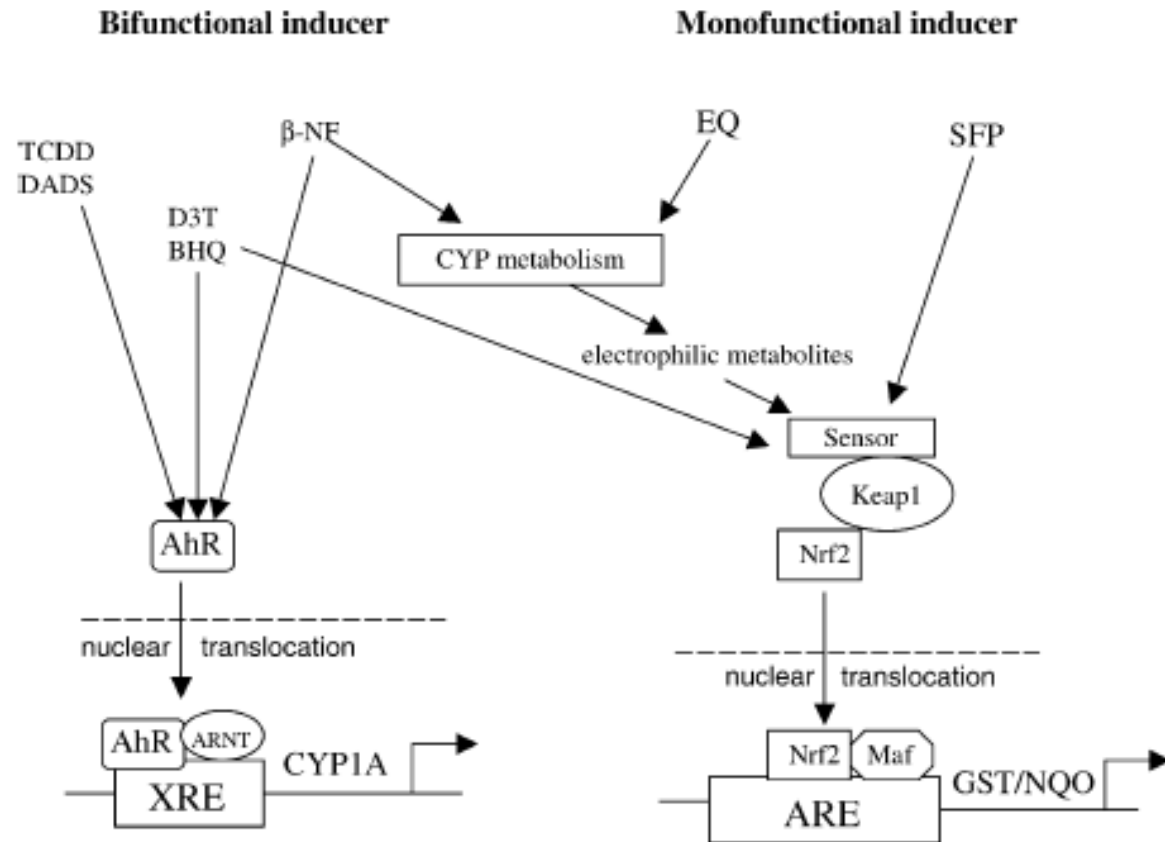
REGULACE ALDOKETOREDUKTÁZ



KLASICKÝ POHLED NA INDUKCI GENOVÉ EXPRESE KONTROLOVANOU XRE A ARE: transkripční faktor Nrf2 je indukován reaktivními metabolity a ox. stresem

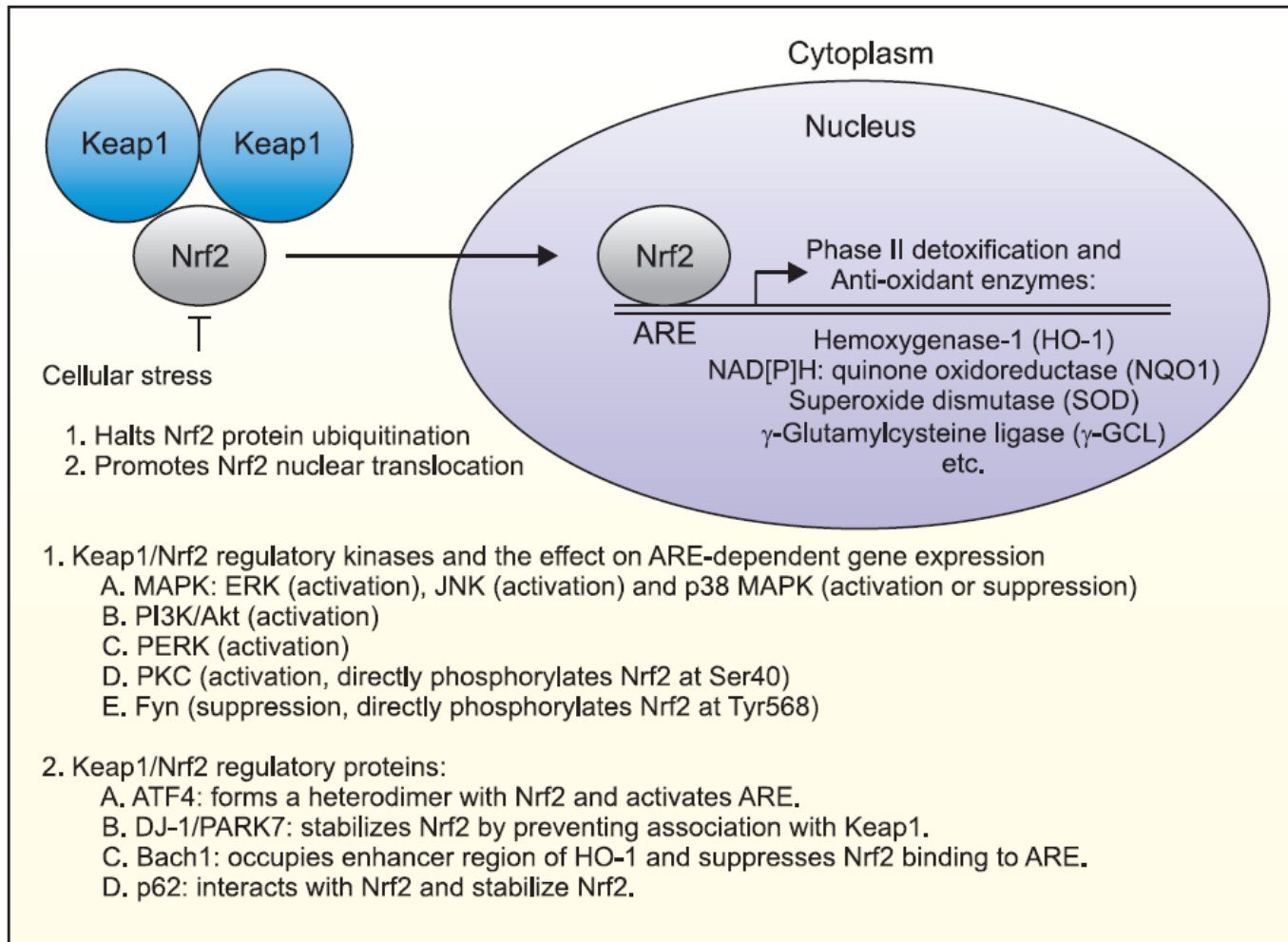
Bifunkční induktory = xenobiotika aktivující AhR a Nrf2

GST, NQO = enzym 2. fáze biotransformace



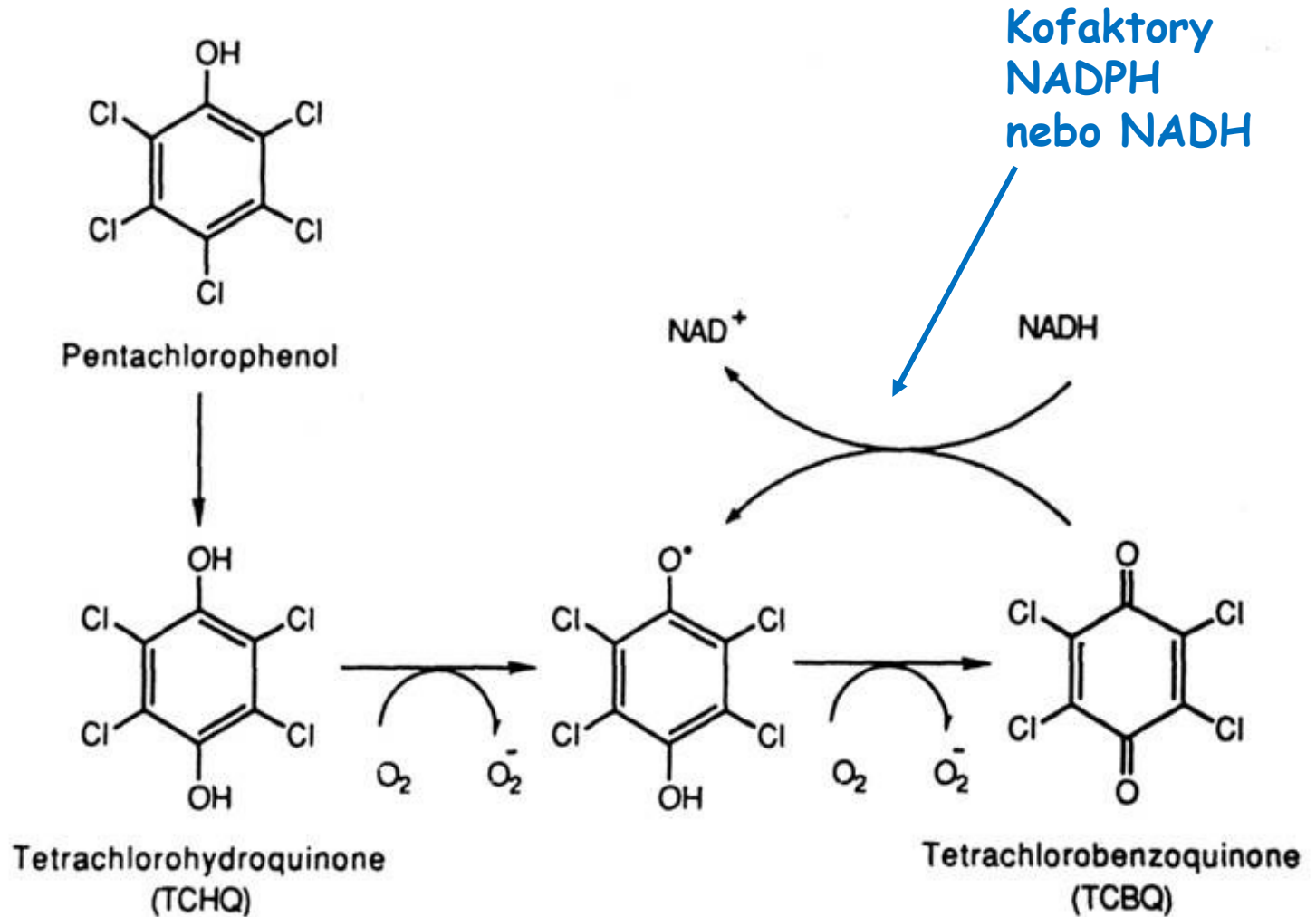
XRE = xenobiotic (dioxin) response element;
ARE = antioxidant response element

TRANSKRIPČNÍ FAKTOR Nrf2 JE REGULOVÁN OXIDATIVNÍM STRESEM / ELEKTROFILNÍMI METABOLITY A TAKÉ AKTIVACÍ AhR



Keum, Biomol
Ther, 2012

NQO: NADPH/CHINONOXIDOREDUKTÁZA (DT-DIAFORÁZA)



EPOXIDHYDROLÁZY

Funkce:

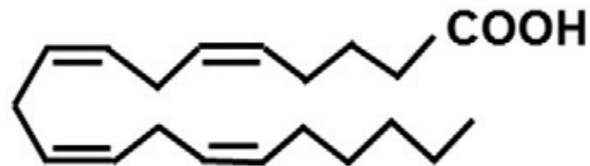
- metabolismus lipidů (epoxidů) v živočišných a rostlinných buňkách
- metabolismus intermediátů xenobiotik s epoxidovou skupinou

celkem 7 forem EH:

- savčí solubilní (cytosolová) EH - inaktivace epoxy-mastných kyselin
- mikrosomální EH - inaktivace BaP-dihydrodiolepooxidu
- leukotrien A4 hydroláza
- etc.

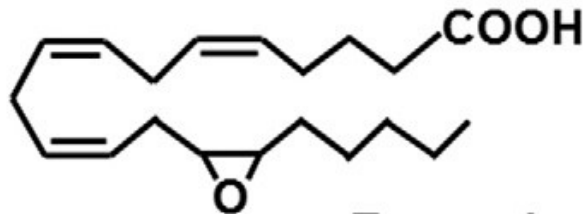
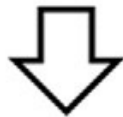
Regulace např. aktivací Nrf-2

EPOXIDHYDROLÁZY



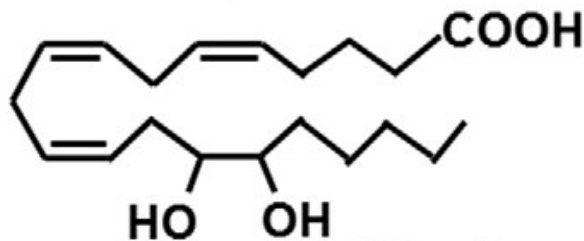
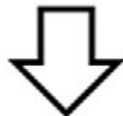
Arachidonic acid (ARA, LC-PUFA)

CYP450



Epoxyeicosatrienoic acid (14,15 EET, EpFA)

sEH



Dihydroxyeicosatrienoic acid (DHET, diol)

ROLE CYP1A1/CYP1A2/CYP1B1 A EPOXIDHYDROLÁZ V METABOLICKÉ AKTIVACI POLYCYKLIČKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ

