

Abstrakt

Environmentální polutant benzo[a]pyren (BaP) je prokazatelným lidským karcinogenem, který se po aktivaci cytochromu P450 (CYP) kovalentně váže na DNA. V rámci dizertační práce byl studován vliv jednotlivých složek systému monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO), systému lokalizovanému v membráně endoplasmatického retikula, na metabolismus benzo[a]pyrenu a na tvorbu aduktů BaP s DNA. Zaměřili jsme se především na porovnání vlivu cyt b₅ na tento metabolismus a potenciál cyt b₅ sloužit jako donor elektronů v rámci reakčního cyklu cytochromu P450 1A1. Tento vliv byl studován jednak z pohledu tvorby metabolitů BaP, a jednak z pohledu tvorby jeho aduktů s DNA. Byl také studován vliv dvou expresních systémů pro cytochrom P450 1A1 (prokaryotický a eukaryotický), na jeho účinnost v metabolismu BaP.

Vliv cyt b₅ na účinnost monooxygenasového systému byl studován i s další cizorodou látkou, rostlinným alkaloidem ellipticinem, jenž vykazuje protinádorové účinky. Jeho protinádorový efekt, stejně jako vedlejší účinky, závisí na jeho metabolické aktivaci cytochromu P450. Významný z tohoto hlediska je zejména CYP3A4. Ten byl proto použit i v našich experimentech.

Dále byla v práci studována vhodnost laboratorního potkana sloužit jako model metabolického osudu BaP v lidském organismu.

Při studiu metabolismu obou testovaných látek byla k separaci metabolitů použita vysokoúčinná chromatografie (HPLC). Aduktů s DNA vzniklé aktivací BaP byly kvantifikovány metodou „³²P-postlabeling“.

Ze získaných výsledků sledujících potenciál potkana sloužit jako model metabolického osudu BaP v lidském organismu je zřejmé, že lidské a potkaní jaterní mikrosomy přeměňují BaP na téměř analogické metabolity, s výjimkou tvorby BaP-9-olu, který v případě lidských mikrosomů nebyl tvořen. Metabolity generované potkaním CYP1A1 se od metabolitů tvořených lidským CYP1A1 liší také tvorbou BaP-4,5-dihydrodiolu v potkaním systému. Ostatní metabolity jsou pro enzymy obou organismů shodné. To naznačuje vhodnost laboratorního potkana jako modelového organismu pro studium metabolického osudu BaP u člověka. Enzym epoxidhydróláza je esenciální pro tvorbu dihydrodiolů BaP a jednoho ze dvou majoritních aduktů tvořených aktivací BaP cytochromem P450 1A1 s DNA. Její absence v prokaryotním expresním systému pro CYP1A1 (Bactosomech) limitovala použití tohoto systému pro studium metabolismu BaP oproti eukaryotnímu expresnímu systému pro tento enzym (SupersomyTM). Cyt b₅ stimuloval tvorbu metabolitů BaP katalyzovanou CYP1A1 i aduktů BaP s DNA po aktivaci těmito enzymy. Výsledky získané v dizertační práci prokazují, že redukci CYP1A1 v jeho reakčním cyklu, při kterém je oxidován BaP, může poskytovat elektrony nejen systém NADPH a NADPH:CYP reductasy, ale i systém NADH, NADH: cytochrom b₅ reductasy a cytochromu b₅. A to v obou redukčních krocích.

Schopnost cyt b₅ poskytovat oba elektrony cytochromu P450 (CYP3A4) byla pozorována i při studiu vlivu cyt b₅ na metabolismus ellipticinu.