

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra biochemických věd

Kandidát **Mgr. Adam Skarka**

Školitel **Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.**

Název disertační práce **Účast membránově vázaných enzymů v metabolismu xenobiotik u člověka**

Cizorodé látky zvané xenobiotika se běžně vyskytují v širokém okolí člověka. Některé z nich jsou aktivně či pasivně přijímány do organismu a podstupují metabolickou přeměnu vedoucí k jejich vyloučení. Důležitou roli v tomto případě hrají různé enzymové systémy. Nejznámějším systémem je nadrodina cytochromů P450 katalyzující oxidační reakce, avšak v poslední době nabývají na významu i systémy redukční, mezi které patří například nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR), dehydrogenas/reduktas se středně dlouhým řetězcem (MDR) a aldo ketoreduktas (AKR). Karbonylová skupina, která je cílem redukce katalyzované nadrodinami SDR, MDR a AKR, se nachází také u různých skupin léčiv, např. antineoplastik a nesteroidních antiflogistik. Přeměna této skupiny může vést ke ztrátě účinku a/nebo ke zvýšení toxicity daného léčiva pro organismus.

Některá xenobiotika mají ve své struktuře tzv. prochirální funkční skupinu. Mezi takové patří například již zmíněná karbonylová skupina, jejíž přeměnou může dojít ke vzniku chirálních produktů. Poměr vzniklých enantiomerů není náhodný a je unikátní pro každý pár enzym substrát. Nazývá se enzymová stereospecifita, má obdobný význam jako enzymové kinetické konstanty a jako takový může být významným pomocníkem ve výzkumu nových enzymů. Tato vlastnost byla prokázána u mnoha zkoumaných látek a enzymů, mezi něž patří například dvojice alkyl p tolyl sulfidy a FMO, risperidon a CYP450, NNK a CBR1 či AKR1C1, benzimidazolová anthelmintika a FMO a fenytoin a CYP450. Porovnáním hodnot stereospecifit pro celé frakce a jednotlivé enzymy pak lze případně určit, zdali je ve frakci přítomen ještě další enzym účastnící se přeměny vybrané látky.

Nesoulad poměrů stereospecifit pro tvorbu dihydrooracinu (DHO) mezi lidskými jaterními mikrosomy (40 % tvorby (+)-DHO) a jedinou jaterní mikrosomální karbonylreduktasou s popsanou účastí na redukci xenobiotik HSD11B1 (24 % tvorby (+)-DHO) naznačoval přítomnost dalšího karbonyl redukujícího enzymu v jaterních mikrosomech. Byla provedena purifikace nové karbonylreduktasy z lidské jaterní tkáně. Optimalizací celého purifikačního procesu, který zahrnoval solubilizaci mikrosomů a dva purifikační kroky, bylo získáno dostatečné množství neznámé karbonylreduktasy k její částečné charakterizaci. Kinetické konstanty pro redukci oracinu na DHO byly srovnatelné s hodnotami cytosolických enzymů. Zvýšení čistoty enzymu purifikačním procesem bylo prokázáno vzestupem hodnoty specifické aktivity (aktivita enzymu vztahená na množství bílkoviny). Následná detekce pomocí hmotnostní spektrometrie nebyla možná z důvodu velmi nízké koncentrace proteinu.

Oracin je potenciální protinádorové léčivo, jehož vývoj byl pozastaven ve druhé fázi klinických testů z ekonomických důvodů. Velmi často používanou skupinou antineoplastik jsou antracykliny (ANT), mezi něž patří doxorubicin (DOX), daunorubicin (DAUN) a idarubicin (IDA), které jsou stejně jako oracin metabolizovány redukcí karbonylové skupiny za vzniku kardiotoxických produktů. I když jde o léčiva dlouhodobě klinicky používaná, detailní informace o jejich metabolické přeměně chybí. Na základě kinetických konstant pro redukci oracinu na DHO byla zkoumána účast neznámé karbonylreduktasy na redukci ANT. Byla prokázána pouze katalýza redukce DAUN ( $K_m=954\pm 129\mu\text{M}$ ,  $V_{max}=720\pm 27\text{ nmol/min na mg}$ ,  $CL_{int}=0,76\text{ ml/min na mg}$ ), která v porovnání s cytosolickými enzymy CBR1, CBR3 a AKR1A1 není příliš významná a katalýza redukce IDA ( $K_m=301\mu\text{M}$ ,  $V_{max}=158\pm 7\text{ nmol/min na mg}$ ,  $CL_{int}=0,52\text{ ml/min na mg}$ ). Rovněž bylo nutno ověřit, v jaké míře jsou vybrané antracykliny redukovány v jaterních mikrosomech. Bylo zjištěno, že při koncentracích ANT převyšujících  $100\mu\text{M}$  převažuje hydrolýza za vzniku příslušných aglykonů. Kinetické konstanty pro redukci DOX ( $K_m=248\mu\text{M}$ ,  $V_{max}=0,248\pm 0,025\text{ nmol/min na mg}$ ,  $CL_{int}=0,001\text{ ml/min na mg}$ ) byly řádově shodné s konstantami známými pro jaterní cytosol, pro redukci DAUN a IDA je nebylo

možné vypočítat.