

Ellipticin, alkaloid z rostlin čeledi Apocynaceae, vykazuje významný protinádorový a anti-HIV účinek. Je pro-léčivem, jehož farmakologická účinnost a vedlejší genotoxické účinky závisí na metabolické aktivaci cytochromy P450 (CYP) a peroxidasami (Px). Z toho důvodu bylo cílem disertační práce poznání příspěvku jednotlivých CYP a Px k oxidaci ellipticinu v různých tkáních (játra, plíce a ledviny) laboratorního potkana, který byl vybrán jako vhodný model ilustrující osud ellipticinu v lidském organismu. Dále byly využity mikrosomální systémy myši s „deletovanou“ reduktasou v játrech (HRNTM) a myši kontrolní linie (WT) a purifikované enzymy CYP1A1 a 3A4. Sledován byl i vliv cytochromu b₅ na produkci jednotlivých metabolitů (aktivačních a detoxikačních) ellipticinu a tvorba aduktů aktivovaného ellipticinu s DNA.

Karcinogenní benzo[a]pyren (BaP) je po své aktivaci cytochromy P450 (CYPs) schopný kovalentní vazby na DNA. Sledovali jsme jeho schopnost tvorby aduktů s DNA a indukce enzymů CYP a NADPH:CYP reduktasy (RED) v myších játrech, hlavním orgánu tvorby aduktů BaP s DNA. CYP1A1 je označován za nejdůležitější enzym v metabolické aktivaci BaP. V práci jsme sledovali vliv jednotlivých složek systému monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO systému) na metabolismus BaP. V disertační práci byly využity mikrosomální systémy potkanů kontrolních a premedikovaných induktorem CYP1A1/2, Sudanem I, a purifikovanými enzymy, CYP1A1 rekonstituovaným s NADPH:CYP reduktasou. Sledována byla produkce jednotlivých metabolitů BaP (aktivačních a detoxikačních) a tvorba aduktů aktivovaného BaP s DNA.

V obou případech jsme pro separaci metabolitů vzniklých oxidací ellipticinu a/nebo BaP využili HPLC. Adukty vzniklé aktivací těchto dvou sloučenin byly kvantifikovány metodou „³²P-postlabeling“

Z výsledků získaných při studii osudu ellipticinu v organismu vyplývá, že cytochrom b₅ ovlivňuje oxidaci ellipticinu CYP1A1 a 1A2 ve prospěch aktivačních metabolitů, v případě CYP3A4 je stimulována tvorba 9-hydroxyellipticinu a aktivačního metabolitu, 13-hydroxyellipticinu. V játrech potkanů premedikovaných ellipticinem dochází k nárůstu jak aktivačních metabolitů, tak i aduktů s DNA. Za tuto skutečnost je odpovědný CYP1A1 v komplexu s cytochromem b₅, které jsou ellipticinem indukované. V plicní a ledvinné tkáni dochází vlivem CYP1A1 k detoxikaci ellipticinu a zároveň k aktivaci ellipticinu katalyzovaném peroxidasami.

Ze studie sledující metabolismus BaP vyplývá, že BaP je oxidován mikrosomálním systémem potkana i myši na šest metabolitů (9,10-diOH-; 4,5-diOH-; ?; 3,6-chinon-; 1,6-chinon a 3-OH-BaP). V rekonstituovaném systému CYP1A1 s NADPH:CYP reduktasou však vznikají metabolity pouze tři (3,6-chinon-; 1,6-chinon a 3-OH-BaP). K nejučinnější oxidaci BaP dochází při nízké koncentraci NADPH:CYP reduktasy v rekonstituovaném systému s CYP1A1, a to v poměru CYP:RED 1:0.05. Cytochrom b₅ stimuluje oxidaci BaP cytochromem P450 1A1 v rekonstituovaném systému s NADPH:CYP reduktasou. Epoxidhydrolasa je esenciálním enzymem pro tvorbu aduktu BaP č. 2, tvořeného ze 7,8,-dihydroxy-9,10-epoxy-BaP. Tento adukt není tvořen v systému, který obsahuje pouze CYP1A1 a NADPH:CYP reduktasu. V systému bez epoxidhydrolasy je tvořen pouze adukt č. 1, generovaný z jiného metabolitu BaP, 9-hydroxy-4,5-epoxy-BaP. Cytochrom b₅ výrazně ovlivňuje tvorbu obou kovalentních aduktů BaP s DNA.