

Bogdan Koczanowski *

Cytochrom P-450 jako ograniczony wskaźnik biologicznego monitoringu

Streszczenie

W artykule przedstawiono wybrane aspekty biotransformacji ksenobiotyków przez układ oksydaz o mieszanym działaniu, a także rolę Cytochromu P-450 w molekularnym mechanizmie hydroksylacji ksenobiotyków. Podano jednocześnie zasadę i metodykę pomiaru ilości Cytochromu P-450 (Omura i Sato, 1964) we frakcji mikrosomalnej wątroby. Omówiono rolę ksenobiotyków w procesie hamowania i indukcji układu oksydaz o mieszanym działaniu. Wskazano jednocześnie na możliwość zastosowania pomiaru ilości Cytochromu P-450 oraz typu indukcji jako ograniczonego wskaźnika biologicznego monitoringu.

Wprowadzenie

Otoczająca nas biosfera jest miejscem włączania coraz to nowych obcych związków chemicznych (ksenobiotyków) do żywych organizmów. Ujemne efekty działania antropogenicznych trucizn środowiskowych zmuszają do badania oraz monitorowania interakcji chemiczno-biologicznych w organizmach żywych. W badaniu tych interakcji kluczową rolę odgrywają reakcje biotransformacji (faza I i II w terminologii Williama, 1974), których istotną komponentą jest Cytochrom P-450. Interesujący biologicznie jest fakt, że Cytochrom P-450 bierze udział obok egzogennej także w endogen-

* Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii WSP w Krakowie.

nym metabolizmie. Wykazanie obecności Cytochromu P-450 w organizmach bakteryjnych, roślinnych (Jähnig i Pfeil, 1984), a także u zwierząt i człowieka może wskazywać na jego ewolucyjną rolę. Cytochrom P-450 i inne komponenty układu oksydaz o mieszanym działaniu obecne są w skórze, płucach i układzie pokarmowym. Wątroba jest narządem o najwyższym fizjologicznym poziomie aktywności Cytochromu P-450 i z racji centralnej roli w metabolizmie ksenobiotyków większość obecnie prowadzonych badań dotyczy tego narządu. Obecność tej hemoproteiny wykazano także w nerkach, nadnerczach (kora i rdzeń), mózgu, łożysku, jądrach i jajnikach (Hodgson, 1974), a także w ciałku żółtym (Uzgiris i wsp., 1977), trombocytach (Cinti i Feinstein, 1976), limfocytach i szpiku kostnym (Burke i wsp., 1977). Pierwszy etap biotransformacji ksenobiotyków będący zazwyczaj reakcją utleniania (hydroksylacji) może mieć charakter przemian detoksykacyjnych (głównie Cytochrom P-450) lub bioaktywacyjnych (Cytochrom P-448) (Parke i Obrębska-Parke, 1987). Dla układu biorącego udział w procesach transformacji, w skład którego obok Cytochromu P-450 wchodzi reduktaza Cytochromu P-450, NADPH, Cytochrom b_5 oraz tlen cząsteczkowy, zaproponowano następującą sumaryczną sekwencję hydroksylacji ksenobiotyku (RH):



w którym istota reakcji polega na zaktywowaniu tlenu cząsteczkowego w sposób umożliwiający wykorzystanie jednego atomu tlenu do stworzenia grupy hydroksylowej, przy czym akceptorem drugiego atomu tlenu jest wodor nukleotydu wiążący tenże tlen w cząsteczkę wody. Natomiast molekularny mechanizm katalizy z udziałem układu oksydaz o mieszanym działaniu według Goksoyr (1987) ma następujący przebieg:

I etap (inicjalny) - odwracalne (hydrofobowe) wiązanie substratu (ksenobiotyku) do utlenionej formy (Fe^{+3}) Cytochromu P-450.

II etap - przeniesienie pierwszego elektronu (e^-) z kompleksu (Fe^{+3}) Cytochrom P-450-substrat przez NADPH zależną Reduktazę Cytochromu P-450 i powstanie zredukowanego kompleksu (Fe^{+2}) Cytochrom P-450-substrat.

III etap - interakcja (wiązanie) kompleksu zredukowany (Fe^{+2}) Cytochrom P-450-substrat z tlenem cząsteczkowym i powstanie trzeciorzędowego kompleksu Ferrooksytochrom P-450-substrat.

IV etap - przeniesienie drugiego elektronu (e^-) do kompleksu przez NADPH zależną reduktazę Cytochromu P-450 lub przez Cytochrom b_5 .

V etap - rozerwanie wiązania tlen-tlen i wbudowanie jednego atomu tlenu do nowo powstałej cząsteczki wody.

VI etap - przeniesienie drugiego atomu tlenu do substratu i oddysocjowanie (Fe^{+3}) Cytochromu P-450, wszystkie te etapy ilustruje ryc. 1.

Wiązanie substratów lub inhibitorów do Cytochromu P-450 prowadzi do zmian w właściwościach widmowych enzymu. Spektrum wiązania ligandów do Cytochromu P-450 jest klasyfikowane do trzech typów jako wynik zróżnicowania miejsc wiążących substraty lub inhibitory. Inny rodzaj zmian w zakresie widmowym Cytochromu P-450 jest rejestrowany podczas denaturacji kompleksu zredukowany Cytochrom P-450-CO, a mianowicie wzrost absorpcji przy 420 nm i następowy spadek przy 450 nm. Rejestrowane zmiany wynikające prawdopodobnie z zaburzeń w wiązaniu ugrupowań sulfhydrylowych (SH) (piąty ligand) do hemu (Sato i Omura, 1978) wykorzystano do pomiaru ilości Cytochromu P-450.

Ogólna zasada pomiaru ilości Cytochromu P-450 we frakcji mikrosomalnej polega na rejestracji widma różnicowego pomiędzy zredukowanym Cytochromem P-450 a kompleksem zredukowany Cytochrom P-450-CO. W tym celu do dwóch porcji mikrosomów, z których jedną nasycamy CO, dodaje się silnego reduktora (dwutionian sodowy), redukującego żelazo protoporfiryny.

Metoda pomiaru zawartości Cytochromu P-450 (Omura i Sato, 1964)

Odczynniki:

1. Bufor Tris-2.42 g Tris + 950 ml H_2O dest. Doprowadzić 1N HCL do pH 7.4 (ok.16.94). Dopełnić wodą dest. do 1000 ml.
2. Bufor Tris/KCL - 10,35 g KCL rozpuścić w 900 ml Buforu Tris.
3. Bufor Tris + sacharoza - 100 ml Buforu Tris/KCL + 8.55 g sacharozy.
4. Dwutionian sodowy

Przygotowanie frakcji mikrosomalnej:

1. 5 g wątroby przepłukać w buforze Tris/KCL o pH 7,4 i pociąć dokładnie nożyczkami.

2. Przenieść przygotowany fragment wątroby do próbki zawierającej 20 ml Buforu Tris/KCl. Homogenizować w lodzie!

3. Wirować przez 20 min. przy 11500 obr/min.

- supernatant przelać do probówek plastikowych z zaznaczoną wagą i dopełnić buforem do pełna. Zakręcić nakrętki.

4. Wirować przez 40 min. przy 35000 obr/min.

- supernatant zlać, paletę zważyć i dopełnić do 5 ml Buforem Tris + sacharoza (waga palety ok. 1.5 g).

- zawiesić na politronie.

mikrosomy rozlać do małych probówek z zatyczką.

Pomiar ilości Cytochromu P-450:

1. Do 0.5 ml zawiesiny mikrosomalnej dodać 7 ml Buforu Tris/KCl

- dokładnie wymieszać i rozdzielić na pół.

2. Jedną część nasycić tlenkiem węgla przez 30 sek.

3. Zmierzyć na spektrofotometrze UV-VIS transmisję (zarejestrować widmo 400-500 nm - krzywa podstawowa) obu próbek nienasyconej i nasyconej CO.

4. Do obu kuwet dodać oki. 10 mg dwutlenku sodu. Wymieszać i ponownie zarejestrować widmo w zakresie 400-500 nm, przy czym próbkę nasyconą CO ustawiamy z przodu.

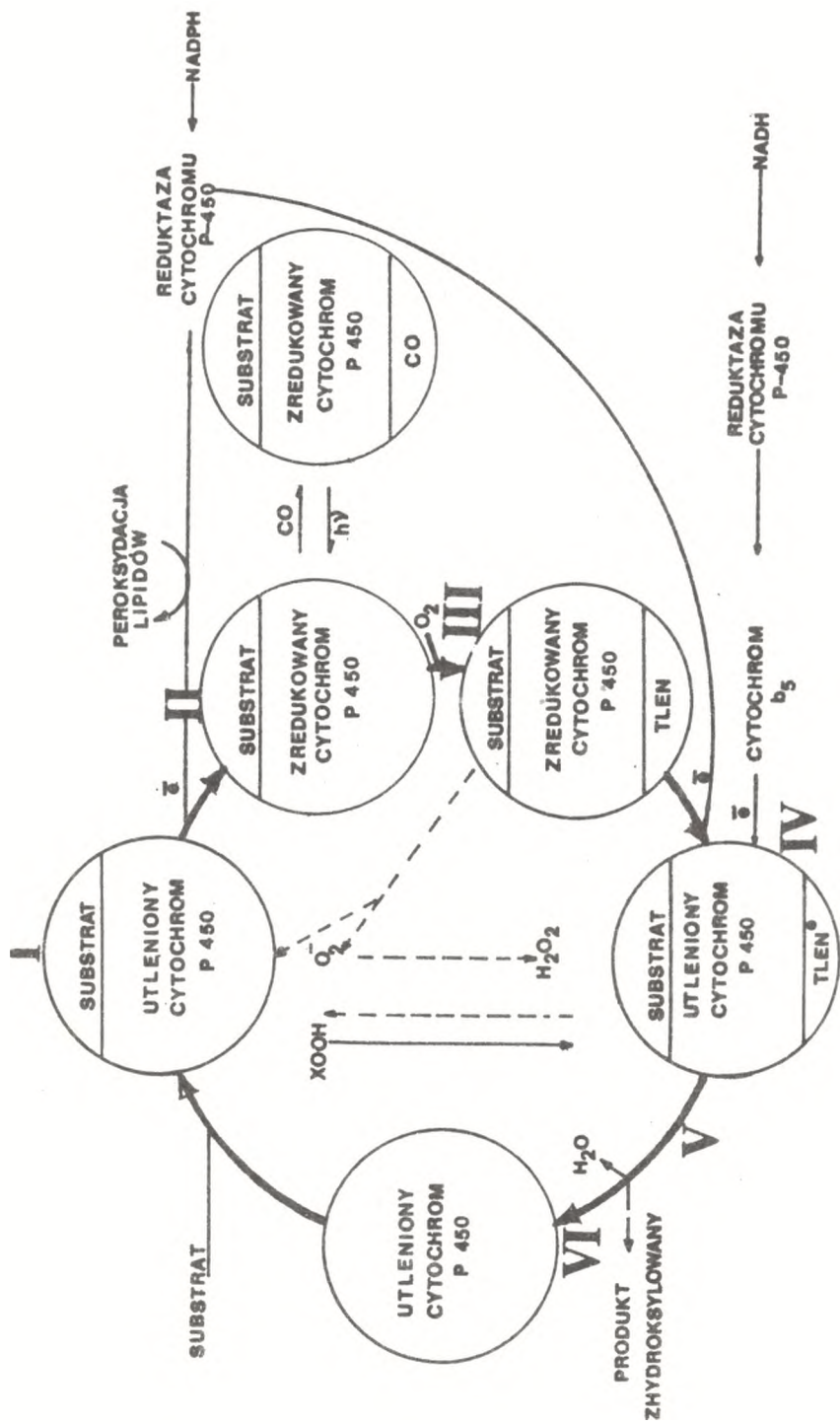
Obliczenia:

$$C = \frac{\log 100 - \log T}{E \times b} \times 15 \text{ (rozcieńczenie)} = \frac{2 - \log T}{0.091} \times 15 = \text{nm}$$

wynik należy przeliczyć na mg białka.

Inhibitory i mechanizm indukcji Cytochromu P-450

Inhibitory Cytochromu P-450 i innych składników systemu oksydaz o mieszanym działaniu noszące także nazwę "samobójczych inhibitorów" ("suicide inhibitors") działają według różnych mechanizmów. Głównymi miejscami działania inhibitorów są kofaktory (spadek lub destrukcja NADPH/NADH), a także nieodwracalne wiązanie do hemu (CO), hamowanie kompetycyjne poprzez alternatywne substraty (SKF-525-A), brak tlenu (Goksfyryl)



Ryc. 1. Mechanizm reakcji katalizowanej przez Cytochrom P-450 (za: Hodgson i Dauterman, 1982 w modyfikacji własnej)

1987). Niektóre inhibitory wywierają supresyjny wpływ na specyficzne izoenzymy Cytochromu P-450. Przykładem może być ∞ naftoflawon selektywnie blokujący izoenzym indukowany 3-metylocholanrenem. Wykazano również blokujący wpływ metali ciężkich takich, jak kadm (Ando, 1982) i ołów (Hanke i Piotrowski, 1985) na system Cytochromu P-450.

Mechanizm indukcji Cytochromu P-450 pod wpływem działania toksycznych związków chemicznych nie jest w pełni poznany. Wiadomo jednak, że proces indukcji wywołany ekspozycją na ksenobiotyki może zachodzić według dwóch różnych mechanizmów. Pierwszym typem jest indukcja substratowa (pentobarbital, DDT), drugi natomiast to typ indukcji hormonalnej (3-metylocholanren, benzo/a/piren). W przypadku niektórych ksenobiotyków (barbital) efekt indukcyjny zależy od RNA i syntezy białka. Inne badania (Ruckpaul i Rein, 1984) wskazują również na udział w procesie indukcyjnym cyklicznych nukleotydów. Liczba wskaźników biochemicznych monitorujących stopień intoksykacji (zmiany składu białek surowicy, poziomu lipidów, zmiany aktywności enzymów surowicy, uszkodzenie błon lizosomalnych, zmiany profilu aminokwasowego) były omówione przez Bayne (1985). Coraz częściej uważa się (Goksólyr, 1987), że w monitoringu, zwłaszcza środowiskowym, istotną rolę mogą odegrać dwa specyficzne systemy biochemiczne - układ metalotioneiny (metale ciężkie) i system Cytochromu P-450 (środki farmakologiczne, pestycydy, policykliczne węglowodory). Na podstawie badań i obserwacji sądzi się (Payne, 1984, 1987), że typ indukcji może być czułym wskaźnikiem użytym w biologicznym monitoringu.

Literatura

- Bayne B. L., 1985. Cellular and physiological measures of pollution effect. *Marine Poll. Bull.* 16, 127-128.
- Burke M. D., Mayer R. T., and Kouri R. E., 1977. 3-Methylcholanthrene-induced monooxygenase (O-deethylation) activity of human lymphocytes. *Cancer Res.* 37, 460-463.

- Cinti D. L., and Feinstein M. B., 1976. Platelet cytochrome P-450
A possible role in arachidonate-induced aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 1028-1035.
- Goksoyr A., 1987. Characterization of the Cytochrome P-450 Monooxygenase System in Fish Liver. *Metabolism and Effects of Organic Xenobiotics. Praca doktorska.* University of Bergen.
- Hanke J., Piotrowski J. K., 1980. *Biochemiczne Podstawy Toksykologii.* PZWL. Warszawa.
- Hodgson E., Kulkarni A. P., 1974. Interactions of pesticides with cytochrome P-450. in: *Mechanisms of Pesticide Action* eds. Kohn G.
- Jänig G. R., Pfeil D., 1984. Structure-Function Relationships of the Essential Components of the Liver Microsomal Monooxygenase System in: *Cytochrome P-450* eds. Ruckpaul K., and Rein H.
- Omura T., and Sato R., 1964. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239. 2370-2385.
- Parke D. V., Obrębska-Parke M. J., 1987. *Biochemical Mechanisms of Chemical Toxicity.* *Folia Med. Cracoviensia* XXVIII, 27-46.
- Payne J. F., 1985. Mixed-function oxygenases in biological monitoring programs. In: *Ecotoxicological testing for the marine environment.* eds. Persoone G., Jaspers E., Claus C. Belgium 1, 625.
- Payne J. F., Fancey L. L., Rahimtula A. D., Porter E. L., 1987. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp. Biochem. Physiol.* 86 C, 233-245.
- Sato R., Omura T.(eds.), 1978. *Cytochrome P-450.* Kodanska Scientific Books. Acad. Press Tokyo/New York.
- Uzgiris V. I., Graver P. E., and Salhanick H. A., 1977. Ligand modification of corpus luteum mitochondrial cytochrome P-450 spectra and cholesterol monooxygenation. An essay of specific inhibitors. *Biochem. N. Y.* 16, 593-600.
- Williams R. T., 1974. Inter-species variations in the metabolism of xenobiotics. *Biochem. Soc. Trans.* 2, 359-377.

Цитохром П-450 как лимитированный индикатор
биологического мониторинга

Резюме

В работе были представлены аспекты биотрансформации ксенобиотиков через взаимную связь оксидаз с смешанным действием, а также роль Цитохрома П-450 в молекулярном механизме гидроксильации ксенобиотиков. Одновременно изложен принцип и метод измерения количества Цитохрома П-450 / Omura i Sato, 1964/ в микросомальной фракции печени. Обсуждена роль ксенобиотиков в процессе торможения и индукции оксидазных систем с смешанным действием. Одновременно указана возможность применения измерения количества Цитохрома П-450, а также типа индукции как индикатора биологического мониторинга.

CYTOCHROME P-450 AS LIMITED INDICATOR OF BIOLOGICAL MONITORING

Abstract

This article presents some aspects of xenobiotic biotransformation underlying the system of mixed function oxidases and the role played by Cytochrome P-450 in the molecular mechanism of xenobiotic hydroksylation. It describes both the principle and the methods of the quantity measurement of Cytochrome P-450 (Omura i Sato, 1964) in the microsomal fraction of liver. It presents the role of xenobiotics in the process of inhibition and induction of the system of mixed function oxidases. It indicates that it is possible to use the quantity measurement of Cytochrome P-450 and the type induction as an indicator of biological monitoring.