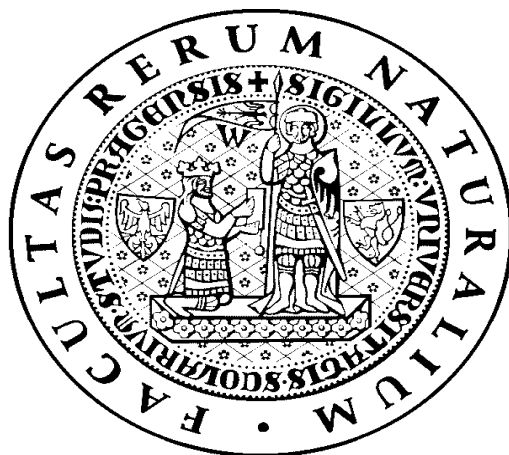


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



Mechanismus karcinogenních účinků nitroaromátů,
polutantů přítomných v životním prostředí

Bakalářská práce

Mechanism of carcinogenicity of nitroaromatic environmental pollutants

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2010

Tereza Čechová

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....
Tereza Čechová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své školitelce Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. za zadání velmi zajímavého tématu bakalářské práce, odborné vedení a laskavý a trpělivý přístup při vypracování této práce.

Práce byla vypracována jako součást řešení grantů GAČR (301/09/0472) a MŠMT ČR (MSM 0021620808).

OBSAH

Seznam použitých zkratk	5
Abstrakt	6
Abstract	7
1. Úvod	8
2. Cíl práce	9
3. Nitroaromáty	10
2.1 Nitroaromáty – základní informace.....	10
2.2 Nitroaromáty ve složkách životního prostředí a biochemicky významné nitroaromáty.....	11
2.3 Nitrobenzanthrony.....	15
4. 3-nitrobenzanthron	19
3.1 Metabolismus 3-nitrobenzanthronu.....	20
3.2 Mechanismus mutagenního a karcinogenního působení 3-nitrobenzanthronu.....	22
5. Mechanismus rozdílného působení 3-nitrobenzanthronu a 2-nitrobenzanthronu	29
4.1 2-nitrobenzanthron.....	29
4.2 Srovnání mutagenních účinků 2- nitrobenzanthronu a 3- nitrobenzanthronu	30
6. Závěr	34
Seznam použité literatury	35

Seznam použitých zkratek

3-ABA	3-aminobenzanthron
3-NBA	3-nitrobenzanthron
COX	cyklooxygenasa
CYP1A1, CYP1A2	cytochrom P450 1A1, 1A2
dA	deoxyadenosin
dA-C8-N-ABA	<i>N</i> -(2'-deoxyadenosin-8-yl)-3-aminobenzanthron
dA- <i>N</i> ⁶ -ABA	2-(2'-deoxyadenosin- <i>N</i> ⁶ -yl)-3-aminobenzanthron
dG	deoxyguanosin
dG-C8-N-ABA	<i>N</i> -(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthron
dG- <i>N</i> ² -ABA	<i>N</i> -(2'-deoxyguanosin- <i>N</i> ² -yl)-3-aminobenzanthron
DNA	deoxyribonukleová kyselina
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography)
HRP	křenová peroxidasa
LPO	laktoperoxidasa
M(D)NBA	mono(di)nitrobenzanthrony
MPO	myeloperoxidasa
NAT1, NAT2	<i>N,O</i> -acetyltransferasa 1,2
nitro-PAH	nitro-polycyklické aromatické uhlovodíky
N-OH-ABA	<i>N</i> -hydroxy-3-aminobenzanthron
NQO1	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PHS	prostaglandin H synthasa
POR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
p.p.m.	miliontina z celku (parts per milion)
SULT1A1, SULT1A2	sulfotransferasa 1,2
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)
XO	xanthinoxidasa

Abstrakt

Aromatické nitrosloučeniny jsou látky přítomné ve všech složkách životního prostředí. Jsou považovány za jeho toxické a karcinogenní kontaminanty. Nitroaromáty vznikají z oxidů dusíku produkovaných všemi vysokoteplotními procesy (spalování fosilních paliv, tepelná likvidace odpadů, zpracování kovů aj.) a z polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH), které patří také mezi vzdušné polutanty produkované spalovacími procesy automobilové dopravy. Většina nitroaromátů vykazuje v bakteriálních a savčích systémech mutagenní aktivitu. Jsou též karcinogeny vyvolávající nádorové procesy, především v játrech, plicích a prsních žlázách. Mezi tyto látky patří i nitrobenzanthrony (NBA), nedávno nalezené ve složkách životního prostředí, především v ovzduší.

3-nitrobenzanthron (3-NBA, 3-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on) je jednou z polycyklických aromatických nitrosloučenin s vysokými toxickými účinky. 3-NBA se vyskytuje ve složkách životního prostředí a je přítomný i ve výfukových plynech, byl také detekován v půdě a jeho výskyt byl prokázán i v dešťové vodě.

Bakalářská práce popisuje metabolismus této látky v organismu a zabývá se jeho mutagenními a karcinogenními účinky. Práce rovněž srovnává mutagenní a karcinogenní účinky 3-NBA a jeho derivátu, isomeru 2-nitrobenzanthronu (2-NBA, 2-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on), který se také vyskytuje jako polutant ve znečištěném ovzduší.

Klíčová slova: aromatické nitrosloučeniny, polutanty, 3-nitrobenzanthron, 2-nitrobenzanthron, 3-aminobenzanthron, *N*-hydroxy-3-aminobenzanthron, cytochrom P450, *N,O*-acetyltransferasa, sulfotransferasa, NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa, NADPH:cytochrom P450 reduktasa, prostaglandin H synthasa, myeloperoxidasa, laktoperoxidasa, cyklooxygenasa, mutagenita, karcinogenita, DNA adukty, „³²P-postlabelling“, vysokotlaká kapalinová chromatografie, chromatografie na tenké vrstvě.

Abstract

Nitroaromatic compounds are mutagenic and carcinogenic substances present in all environmental compartments. Polycyclic aromatic hydrocarbons react with nitrogen oxides to form nitroaromatics under the conditions that might be expected in polluted air and in combustion processes (fossil fuel combustion, waste heat recovery, metal processing, etc.). Most of nitroaromatic compounds are potent mutagens in bacterial and mammalian systems. They are also carcinogens causing cancer, primarily in the liver, lungs and mammary glands. Nitrobenzanthrones (NBA) are nitroaromatic compounds which were recently found in environmental compartments, especially in the air.

3-Nitrobenzanthrone (3-NBA, 3-nitro-7H-benz [de] anthracene-7-one) is one of the polycyclic aromatic nitro compounds with high toxic effects. 3-NBA is present in environmental pollution, in diesel exhaust and was also detected in soil and in rain water.

Bachelor's thesis describes the metabolism of this substance and it also studies its mutagenic and carcinogenic effects. This work also compares the mutagenic and carcinogenic effects of 3-NBA and its derivative, isomer 2-nitrobenzanthrone (2-NBA, 2-nitro-7H-benz [de] anthracene-7-one), which also occurs as a pollutant in air. (In Czech)

Keywords: aromatic nitro-compounds, air pollutant, 3-nitrobenzanthrone, 2-nitrobenzanthrone, 3-aminobenzanthrone, *N*-hydroxy-3-aminobenzanthrone, cytochrome P450, *N,O*-acetyltransferase, sulfotransferase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase, NADPH:cytochrome P450 reductase, prostaglandin H synthase, myeloperoxidase, lactoperoxidase, cyclooxygenase, mutagenicity, carcinogenesis, DNA adducts, ³²P-postlabelling, high-pressure liquid chromatography, thin layer chromatography

1. ÚVOD

Aromatické nitrosloučeniny, které jsou přítomné ve všech složkách životního prostředí, jsou považovány za jeho toxické a karcinogenní kontaminanty. Právě proto představují značný rizikový faktor pro lidské zdraví [Stiborová, 2002].

Z výše uvedených důvodů je tedy velmi důležité rozvíjet chemické, biochemické a biomedicínální metody, které bychom mohli využít pro léčbu chorob způsobených intoxikací lidské populace ze znečištěného životního prostředí. Právě tyto metody by umožňovaly diagnostikovat změny v lidském organismu již na molekulární úrovni, a tak zabránit prvotním fázím poškození organismu. Chorobám, jako jsou nádorová onemocnění, by pak bylo možné předcházet, a nebo je léčit dříve, než by propukly v plné šíři. Jde hlavně o poznání mechanismu toxicity a karcinogenicity těchto sloučenin. Vedle tohoto problému jsou uvedené látky dále zkoumány z hlediska koncentrací, při nichž jsou toxické a karcinogenní, jak jsou v organismu metabolizovány, a jaké množství těchto látek a jejich metabolitů přetrvává ve složkách životního prostředí a v organismech samotných [Stiborová, 2002].

2. CÍL PRÁCE

Cílem předkládané bakalářské práce je literární přehled (rešerše) informující o biochemických a fyziologických vlastnostech biologicky významných nitroaromátů, se zvláštním zaměřením na nitrobenzanthrony.

3. NITROAROMÁTY

3.1 NIROAROMÁTY – ZÁKLADNÍ INFORMACE

Již od konce 70. let minulého století je prokázáno, že aromatické sloučeniny jsou přítomny ve všech složkách životního prostředí. Vyskytují se např. ve výfukových plynech, jsou adsorbovány na vzdušné prachové částice, nacházíme je také ve vodních sedimentech, jsou přítomny v cigaretovém kouři a vznikají i při úpravě některých potravin např. grilováním mastných výrobků. Regionální znečištění těmito sloučeninami je spojeno s řadou procesů. Jedním z nich je vznik nitroaromátů.

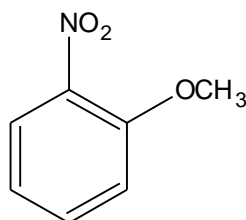
Nitroaromáty vznikají z oxidů dusíku produkovaných všemi vysokoteplotními procesy (spalování fosilních paliv, tepelná likvidace odpadů, zpracování kovů aj.) a z polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH), které patří také mezi vzdušné polutanty produkované spalovacími procesy automobilové dopravy. Lokální znečištění aromatickými nitrosloučeninami je vyvoláno především úniky z technologií jejich vývoje a zpracování [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, 2007, 2008; Nagy *et al.*, 2005, 2007; Stiborová, 2002; Stiborová *et al.*, 2005, 2006; Takamura-Enya *et al.*, 2006; Bieler *et al.*, 2007; Reynisson *et al.*, 2008].

Mezi aromatické nitrosloučeniny patří celá řada látek, které se liší různým působením na organismus. Tato speciální působení vyplývají z různorodosti jejich metabolických cest a enzymů, které se jich účastní. Většina nitroaromátů vykazuje v bakteriálních a savčích systémech mutagenní aktivitu a jsou též karcinogeny vyvolávajícími nádorové procesy, především v játrech, plicích a prsních žlázách. Podíl nitroaromátů na vývoji nádorových procesů v lidském organismu nebyl dosud jednoznačně prokázán. Výsledky některých epidemiologických studií však naznačují, že se prostředí kontaminované nitroaromáty může na výskytu nádorových onemocnění prsu a plic u obyvatel žijících v těchto lokalitách významně podílet. Riziko nádorových onemocnění, především močových cest, je také u pracovníků provozů chemického průmyslu, které nitroaromáty vyrábí a zpracovávají. Některé z aromatických nitrosloučenin se používají jako léčiva (nitrofurany, nitroimidazoly) [Stiborová, 2002].

3.2 NITROAROMÁTY VE SLOŽKÁCH ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ A BIOCHEMICKY VÝZNAMNÉ NITROAROMÁTY

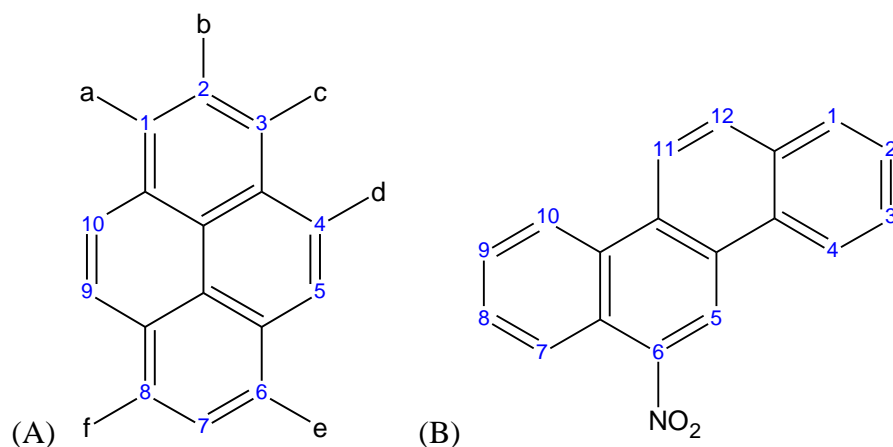
Národní toxikologický program USA označil jako silně podezřelé karcinogeny pro lidský organismus tyto nitrosloučeniny: 2-nitroanisol, 1-nitropyren, 4-nitropyren, 1,6-dinitropyren, 1,8-dinitropyren, 6-nitrochrysen a nitrofen [National Toxicology Program, 1998]. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny IARC uvádí ještě 2-nitrofluoren [IARC, 1989]. Mezi další fyziologicky účinné nitroaromáty patří nitrofurany a nitroimidazoly používané jako léčiva v humánní a veterinární medicíně a též rostlinné produkty aristocholové kyseliny [Stiborová, 2002].

2-nitroanisol (1-methoxy-2-nitrobenzen) (Obr. 1) se hlavně využívá jako prekurzor při výrobě o-anisidinu (2-methoxyanilinu) pro výrobu různých azobarviv. Dále pak ve farmaceutickém průmyslu jako meziprodukt při syntéze některých léčiv [Stiborová, 2002].



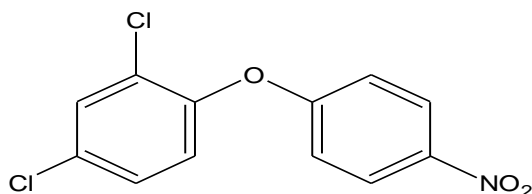
Obr. 1 Strukturální vzorec 2-nitroanisolu

Nitropyreny (Obr. 2, str. 12) patří mezi vzdušné polutanty, vyskytující se ve výfukových plynech, 1-nitropyren je hlavní složkou a dinitropyreny (substituovány v polohách 1,3, 1,6 a 1,8) jsou minoritními složkami. Všechny mono- a dinitropyreny jsou pro experimentální zvířata karcinogenní. Z těchto sloučenin jsou nejnebezpečnější 1-nitropyren a 6-nitrochrysen, které jsou spojovány s vývojem nádorových onemocnění (1-nitropyren - plicní nádory, 6-nitrochrysen - nádory plic, jater a prsních žláz) [Stiborová, 2002].



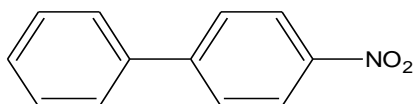
Obr. 2 Strukturální vzorce nitropyrenů (A) (*a* je NO₂ a *b-f* jsou vodíky (H) pro 1-nitropyren; *b* je NO₂ a *a* a *c-f* jsou H pro 2-nitropyren; *d* je NO₂ a *a-c*, *e* a *f* jsou H pro 4-nitropyren; *a* a *c* jsou NO₂, a *b* a *d-f* jsou H pro 1,3-dinitropyren; *a* a *e* jsou NO₂ a *b-d* a *f* jsou H pro 1,6-dinitropyren; *a* a *f* jsou NO₂ a *b-e* jsou H pro 1,8-dinitropyren) a 6-nitrochrysenu (B).

Nitrofen [(2,4-dichlorfenyl)(4-nitrofenyl)ether] (Obr. 3) se dlouhou dobu používal jako kontaktní herbicid v ochraně kulturních plodin (rýže, květák, brokolice, zelí, cibule, česnek a celer). Jeho používání bylo však zakázáno, kvůli silným karcinogenním účinkům na experimentální zvířata [Stiborová, 2002].



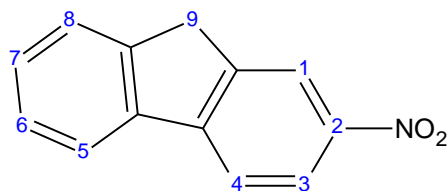
Obr. 3 Strukturální vzorec nitrofenu

4-nitrobifenyl (Obr. 4) a jeho redukční derivát 4-aminobifenyl jsou polutanty pracovního prostředí chemického průmyslu, které vyvolávají nádory močového měchýře [Stiborová, 2002].



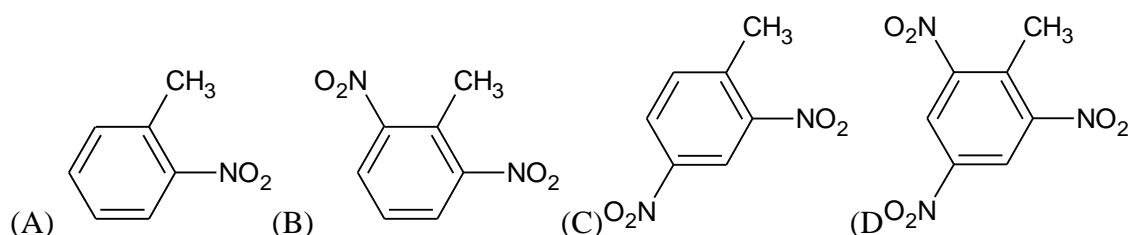
Obr. 4 Strukturální vzorec 4-nitrobifenylu

Další silně karcinogenní nitroaromáty vykazující mutagenní a karcinogenní účinky u hlodavců jsou **2-nitrofluoren** (Obr. 5), **dinitrofluoreny** (substituovány v polohách 2,5 a 2,7) a **9-oxoderiváty nitrofluorenů** [Stiborová, 2002].



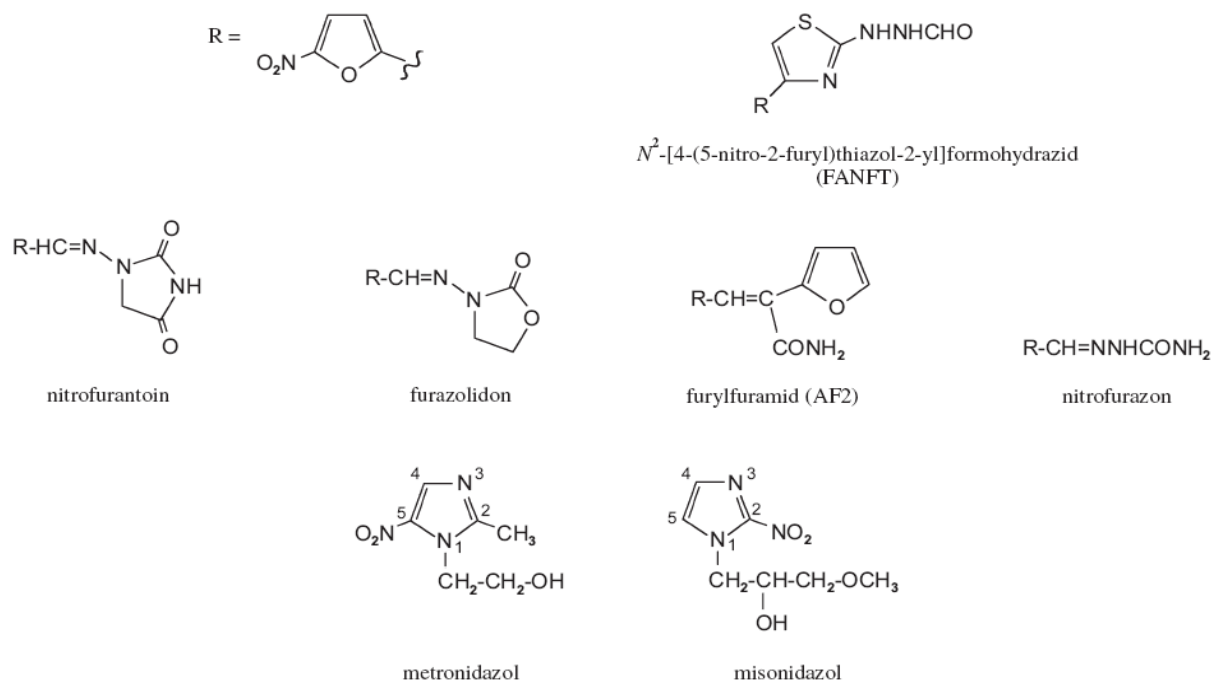
Obr. 5 Strukturální vzorec 2-nitrofluorenu

Mezi nitroaromáty patří také mono-, di- a trinitrotolueny. Z nich **2-nitrotoluen**, **2,4-dinitrotoluen**, **2,6-dinitrotoluen** a **2,4,6-trinitrotoluen** (Obr. 6) patří mezi karcinogenní látky vyvolávající abnormality ve struktuře erytrocytů a rakovinu močových cest [Sabbioni *et al.*, 2006].



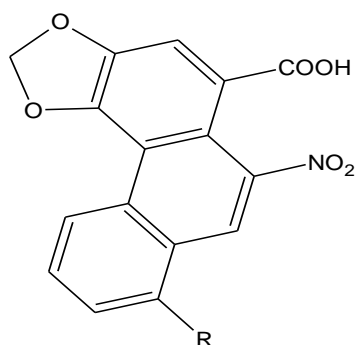
Obr. 6 Strukturální vzorce 2-nitrotoluenu (A), 2,4-dinitrotoluenu (B), 2,6-dinitrotoluenu (C) a 2,4,6-trinitrotoluenu (D).

Nitrofurany a **nitroimidazoly** (Obr. 7, str. 14) jsou používané jako léčiva v humánní a veterinární medicíně vzhledem k jejich antibakteriálním účinkům. Nitroimidazoly vykazují v bakteriálních testech mutagenní aktivitu, u savců je však tato aktivita mnohem menší. 5-nitroimidazoly (např. metrinidazol) jsou účinné proti *Trichomonas vaginalis* a některým infekčním onemocněním [Stiborová, 2002]. Misonidazol (2-nitroimidazol) zvyšuje účinek v radiační terapii [Stiborová, 2002]. Nitrofurantoin se využívá k léčbě močových a pohlavních infekcí [Race *et al.*, 2005]. Nitrofurazon zase našel uplatnění při léčbě popálenin nebo u pacientů s transplantací kůže [Race *et al.*, 2005].



Obr. 7 Struktura nitrofurenů a nitroimidazolů [převzato z Stiborová, 2002]

Aristocholové kyseliny (Obr. 8) jsou přírodní látky, které také patří mezi nebezpečné nitroaromáty. Vyskytují se ve všech částech (především v kořenech a listech) rostlin čeledi *Aristolochiaceae* (podražcovité). V lidovém léčitelství se používaly již od nepaměti [Stiborová *et al.*, 2000, 2005]. Jejich použití v léčbě nadváhy pomocí čínských bylin však bylo fatální [Stiborová *et al.*, 2000, 2005]. Způsobují především ledvinná selhání a vznik nádorů močových cest. Jejich farmaceutické používání proto bylo zakázáno [Stiborová, 2002].

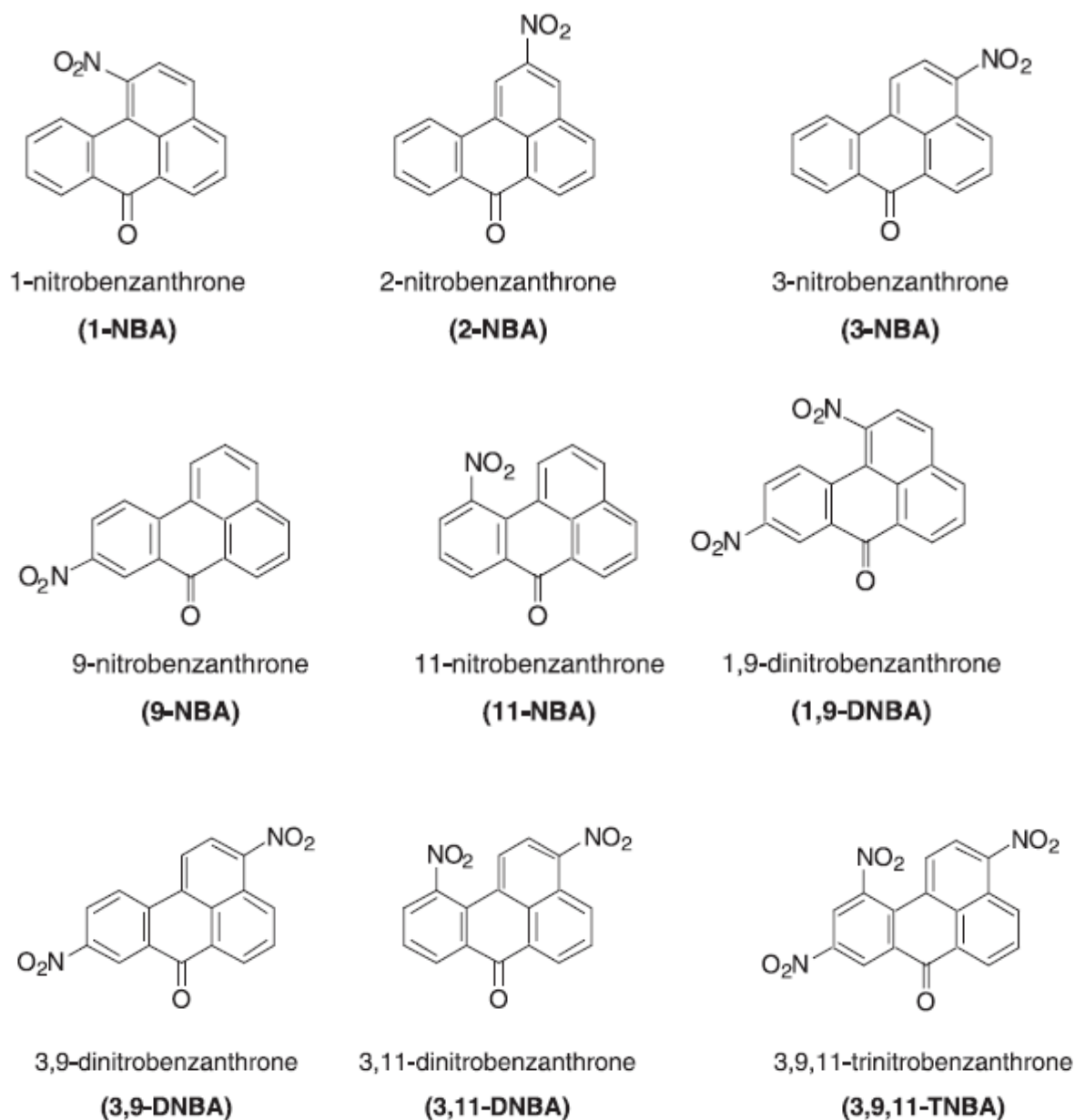


Obr. 8 aristocholové kyseliny I: R = OCH₃
aristocholové kyseliny II: R = H

3.3 NITROBENZANTHRONY

Koncentrace nitro-derivátů polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) v ovzduší jsou mnohem menší než koncentrace nesubstituovaných PAH, přesto je mutagenní aktivita nitro-PAH testovaná *in vivo* a *in vitro* výrazně vyšší než v případě nesubstituovaných PAH [Arlt *et al.*, 2007, 2008; Reynisson *et al.*, 2008]. Uváděné množství nitro-PAH v atmosféře obvykle nepřekračuje koncentraci 1 ng/m³ [Arlt, 2005]. Tato koncentrace je závislá na ročním období, způsobu vytápění, na hustotě dopravní infrastruktury a typu vozidel používaných populací [Arlt, 2005]. Mutagenní vlastnosti již známých nitroaromátů vyskytujících se ve znečištěném ovzduší, jako jsou např. výše zmíněné nitropyreny, představují jen asi 40% z celkové mutagenní aktivity látek ve znečištěném ovzduší. Je tedy velmi pravděpodobné, že se v něm vyskytují ještě další, více polárnější a zatím neidentifikované sloučeniny, které také vykazují mutagenní aktivitu [Umbuzeiro *et al.*, 2007].

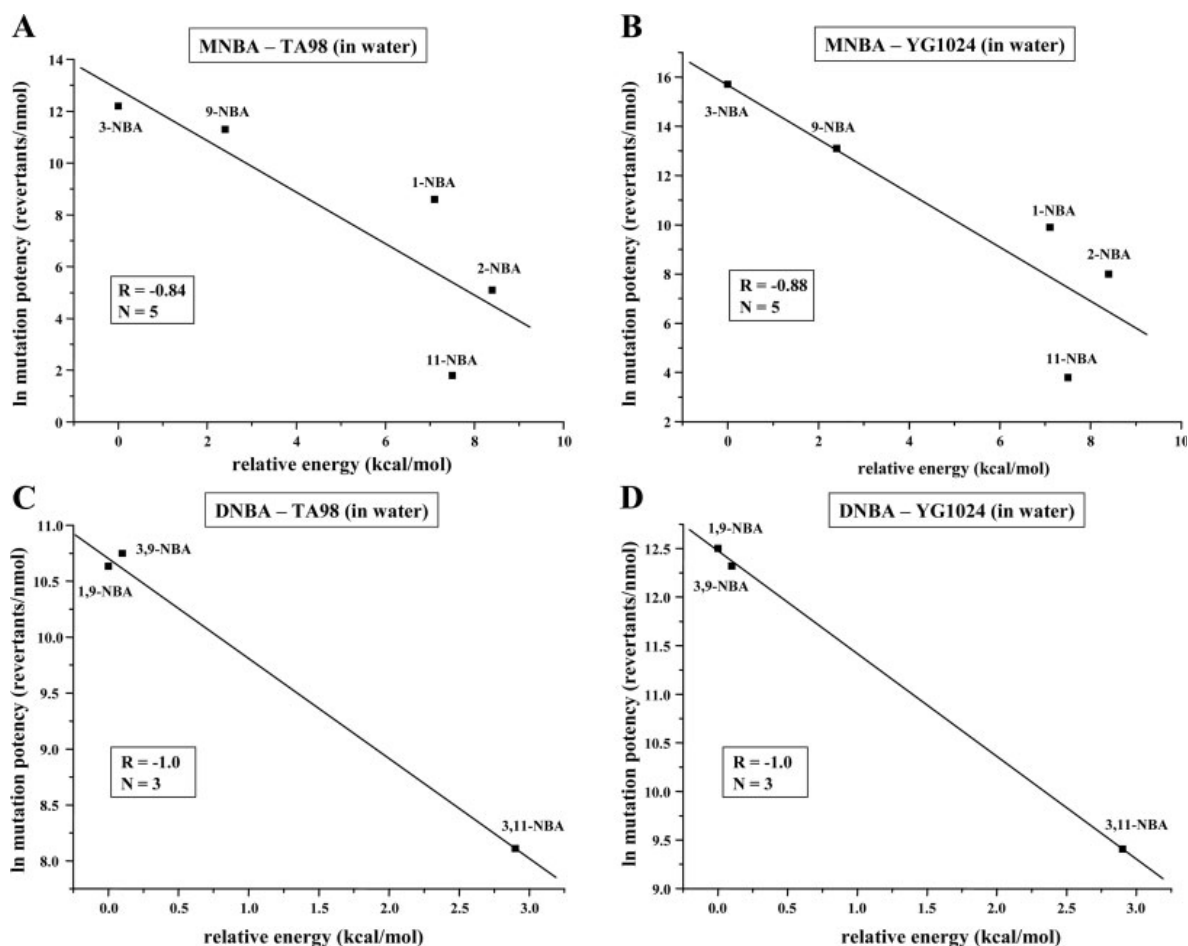
Mezi nitro-PAH nebezpečné pro zdraví člověka patří i nitrobenzanthrony (NBA). Tyto látky byly nedávno nalezené ve složkách životního prostředí, především v ovzduší. (Obr. 9, str. 16).



Obr. 9 Strukturní vzorce nitrobenzanthronů [Převzato z Takamura-Enya *et al.*, 2006]

Jejich mutagenní aktivita byla testována na bakteriích pomocí Amesova testu. Zjistilo se, že pro jednotlivé NBA se jejich mutagenita výrazně liší. Některé z nich nevykazují téměř žádnou mutagenní aktivitu (11-NBA) a některé naopak velmi vysokou (3-NBA). Ve studiích popsanych Takamura-Enyaou *et al.* (2006) a Reynissonem *et al.* (2008) bylo zjištěno, že mutagenní aktivita jednotlivých derivátů NBA v bakteriálních buňkách není ovlivněna ani tak jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jako jsou redukční potenciál, hydrofobicita nebo orientace nitro- skupiny v

molekule, ale spíše stabilitou nitréniového iontu vznikajícího v průběhu jejich metabolismu. Mutagenita řady nitrobenzanthronů testována v bakteriích *Salmonella typhimurium* korelovala pouze se stabilitou jejich nitréniových iontů, které jak již bylo uvedeno vznikají metabolickou aktivací těchto látek (Obr. 10).



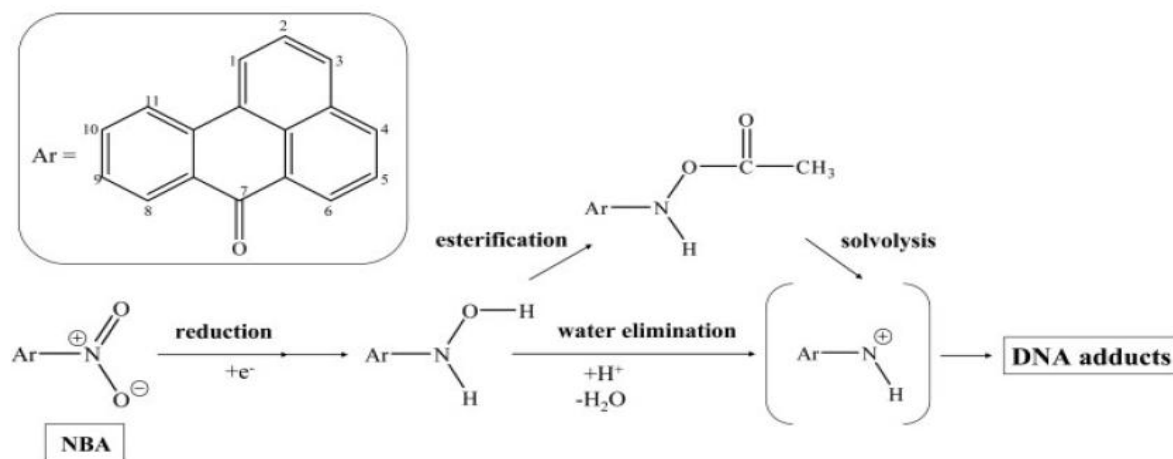
Obr. 10 Závislost přirozeného logaritmu mutagenity nitrobenzanthronů a dinitrobenzanthronů na relativní energii nitréniového iontu ve vodě u bakterií rodu *Salmonella typhimurium* TA98 (A a C) a YG1024 (B a D) pro MNBA (A a B) a DNBA (C a D)

R – korelační koeficient (vyjadřuje vzájemný lineární vztah mezi veličinami x a y, nabývá hodnot od -1 tj. zcela nepřímá úměra do 1 tj. zcela přímá úměra)

N – počet bodů v grafu

[Převzato z Reynisson *et al.*, 2008]

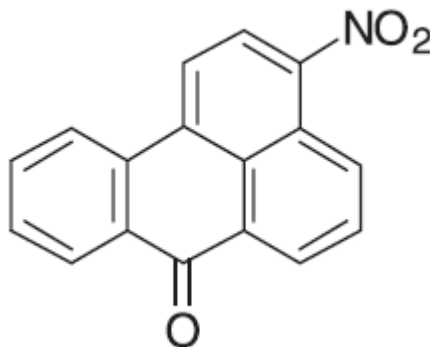
Aktivace NBA vedoucí ke tvorbě kovalentních aduktů je uvedena na Obr. 11 (str. 18) (Proces metabolické aktivace NBA bude podrobně popsán v dalších kapitolách).



Obr. 11 Předpokládaný aktivační metabolismus NBA vedoucí ke vzniku nitréniových iontů a následně pak aduktů s DNA. [Převzato z Reynisson *et al.*, 2008]

V bakteriích jsou více stabilní elektrofilní sloučeniny, jako jsou nitréniové ionty, schopné projít přes membrány a interagovat s nukleofilními centry makromolekul, jako je DNA, snadněji, než látky méně stabilní. U savců je však mutagenita pravděpodobně ovlivňována ještě jinými faktory, jako jsou aktivity enzymů, které se účastní procesu metabolické aktivace, a které se od aktivit bakteriálních enzymů liší [Takamura-Enya *et al.*, 2006; Arlt *et al.* 2007; Reynisson *et al.*, 2008].

4. 3-NITROBENZANTHRON



Obr. 12 Vzorec 3-nitrobenzanthronu

3-nitrobenzanthron (3-NBA, 3-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on) (Obr. 12) je jednou z polycyklických aromatických nitrosloučenin s vysokými toxickými účinky.

Patří mezi nejsilnější mutageny, je karcinogenem pro hlodavce [Nagy *et al.*, 2005] a také potenciálním karcinogenem pro člověka [Arlt, 2005]. Genotoxicita 3-NBA byla prokázána jeho schopností vytvářet specifické adukty s DNA. Výskyt těchto aduktů byl pozorován *in vitro* v buněčných kulturách a *in vivo* v organismu laboratorního potkana a myši [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, 2007, 2008; Nagy *et al.*, 2005; Stiborová *et al.*, 2005, 2006, 2008, 2009; Bieler *et al.*, 2007; Brocke *et al.*, 2008].

Teprve nedávno se prokázalo, že se 3-NBA vyskytuje ve složkách životního prostředí a je přítomný i ve výfukových plynech [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, 2007, 2008; Nagy *et al.*, 2005; Stiborová *et al.*, 2005, 2006; Bieler *et al.*, 2007; Brocke *et al.*, 2008]. Proto jeho genotoxické účinky mohou reprezentovat vysoké riziko především pro pracovníky benzínových stanic, profesionální řidiče či mechaniky autoopraven [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002]. Jeho koncentrace v ovzduší je srovnatelná s koncentracemi běžných polutantů jako jsou 1-nitropyren, 1,3-, 1,6-, a 1,8-dinitropyreny nebo benzo[a]pyren a pohybuje se v rozmezí od 0,6 do 6,6 p.p.m.. Z toho lze vyvodit, že člověk za den přijme dýcháním asi 90 pg této látky [Nagy *et al.*, 2007]. 3-NBA je tvořen pravděpodobně buď nedokonalým spalováním nafty nebo reakcí parentálního polycyklického uhlovodíku s oxidy dusíku v atmosféře [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2007, 2008; Stiborová *et al.*, 2005, 2006; Bieler *et al.*, 2007]. Byl

také detekován v půdě a jeho výskyt byl prokázán i v dešťové vodě [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2004, 2005, 2007; Stiborová *et al.*, 2005].

Protože 3-NBA vstupuje do organismu převážně inhalační cestou, jsou plíce hlavním rizikovým orgánem pro jeho toxické účinky [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2005; Stiborová *et al.*, 2005, 2008; Bieler *et al.*, 2007].

Redukčním metabolitem 3-NBA je 3-aminobenzanthron (3-ABA). Přítomnost této látky byla nedávno prokázána v moči pracovníků solných dolů, kteří byli vystaveni působení výfukových plynů. Proto by tato sloučenina mohla sloužit jako „marker“ výskytu 3-NBA. Také pro tuto sloučeninu byly prokázány její genotoxické vlastnosti, a to detekcí tvorby specifických aduktů s DNA [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, 2007, 2008; Stiborová *et al.*, 2005, 2006, 2008, 2009; Nagy *et al.*, 2007; Bieler *et al.*, 2007; Brocke *et al.*, 2008].

4.1 METABOLISMUS 3-NITROBENZANTHRONU

Předpokládaná metabolická aktivace 3-NBA a jeho derivátu 3-ABA vedoucí ke vzniku aduktů s DNA je uvedena na Obr. 13 (str. 22). Biotransformace 3-NBA probíhá hlavně redukční cestou, která je v organismech závislá na enzymové katalýze [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, 2008; Nagy *et al.*, 2005; Stiborová *et al.*, 2005, 2006, 2008, 2009; Bieler *et al.*, 2007; Brocke *et al.*, 2008].

V první fázi biotransformace 3-NBA se nejdříve redukuje nitro-skupina ($-\text{NO}_2$) přes nitrosoderivát na N-hydroxylamin ($-\text{NHOH}$), dochází tedy k přeměně 3-NBA na N-hydroxy-3-aminobenzanthron (N-OH-ABA) (Obr. 13). Tato reakce je v lidských a potkaních játrech katalyzována cytosolárním enzymem NAD(P)H:chinon oxidoreduktasou (NQO1) neboli DT – diaforasou a v menší míře též xanthinoxidasou (XO) a mikrosomálním enzymem NADPH:cytochrom P450 reduktasou (POR). Dále bylo zjištěno, že NQO1 je mnohem účinnější než POR [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, 2008; Nagy *et al.*, 2005; Stiborová *et al.*, 2005, 2006, 2008, 2009; Bieler *et al.*, 2007].

Vzniklý N-hydroxylamin je pravděpodobně kritickým intermediátem pro tvorbu aduktů s DNA. Je nestabilní, přeměňuje se na nitréniový ion, a ten buď sám, nebo po přeměně na karbéniový ion reaguje s DNA a vytváří specifické adukty s DNA [Arlt,

2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2008; Nagy *et al.*, 2005; Stiborová *et al.*, 2005, 2006, 2008, 2009; Bieler *et al.*, 2007].

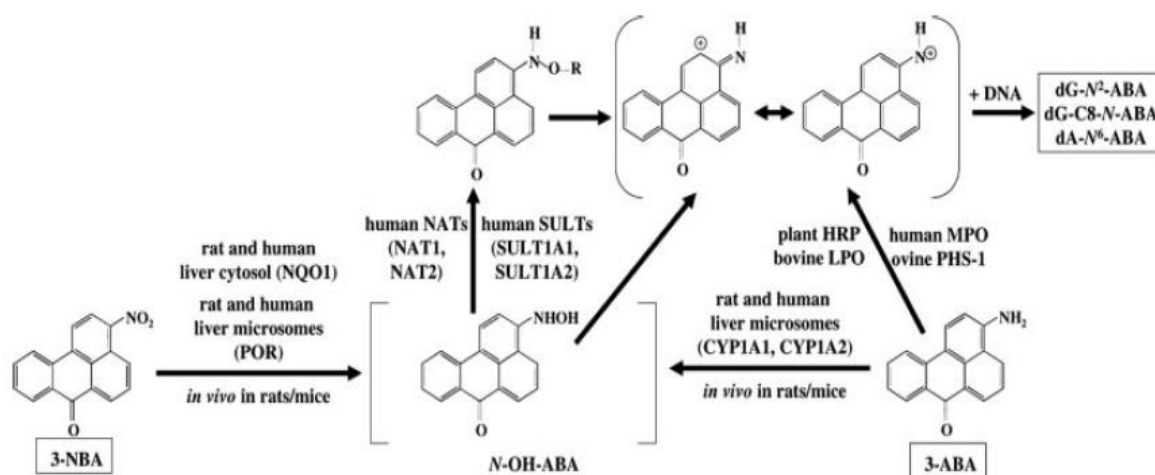
Konjugace N-hydroxylaminu s aktivním acetátem nebo sulfátem, probíhající v druhé fázi biotransformace, usnadňuje tvorbu nitréniového iontu. Tyto reakce jsou v lidském organismu katalyzovány *N,O*-acetyltransferasami (NAT), převážně NAT2 a v menší míře NAT1, a sulfotransferasami (SULT), převážně SULT1A1 a SULT1A2. Všechny tyto enzymy NAT1, NAT2 stejně jako SULT1A1 a SULT1A2 se vyskytují v buňkách dýchacích cest a NAT2 a SULT1A1 jsou obsaženy i v buňkách lidských jater [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, 2008; Nagy *et al.*, 2005; Stiborová *et al.*, 2005, 2006, 2008, 2009; Bieler *et al.*, 2007].

N-OH-ABA se může dále redukovat až na 3-ABA, nalezený v moči populace vystavené působení dieselových exhalátů [Stiborová *et al.*, 2005, 2006, 2008, 2009]. Tato sloučenina je hlavním metabolitem 3-NBA. Naopak, 3-ABA může být také zpětně oxidován na *N*-OH-ABA. Oxidace 3-ABA může být tedy aktivační cestou této sloučeniny, vedoucí ke tvorbě aduktů s DNA. V jaterních mikrosomech je tato reakce katalyzována cytochromy P450 (CYP), a to především CYP1A1 a CYP1A2, které jsou majoritními enzymy katalyzující tuto reakci. Kromě jaterní tkáně tyto enzymy aktivují 3-ABA i v plicích a ledvinách [Stiborová *et al.*, 2005, 2006, 2008, 2009]. Schopnost aktivovat 3-ABA mají též enzymy jaterního cytosolu, plic a ledvin, ve kterých se CYP1A1/2 téměř nevyskytují. V těchto orgánech je pak tato reakce katalyzována peroxidasami. Jedním ze substrátů peroxidasy je peroxid vodíku, který může být dodáván xanthinoxidasou, savčí nitroreduktasou schopnou aktivovat 3-NBA. Mezi peroxidasy aktivující 3-NBA patří prostaglandin H synthasa (PHS, neboli cyklooxygenasa, COX), myeloperoxidasa (MPO), laktoperoxidasa (LPO) nebo křenová peroxidasa (HRP) [Stiborová *et al.*, 2005, 2006, 2008, 2009].

PHS i MPO jsou exprimovány v plicích, které jsou vystaveny působení 3-NBA primárně, neboť 3-NBA vstupuje do organismu převážně inhalační cestou. Dále se PHS hojně vyskytuje i v močových cestách, kde může aktivovat i jiné genotoxikanty než je 3-NBA. MPO se také vytváří v primárních granulích neutrofilů, ze kterých se do plic dostává po chemickém nebo biochemickém poškození těchto buněk. MPO spolu s LPO mohou být také exprimovány v prsní tkáni epiteliálními buňkami a jsou i součástí mateřského mléka. Stejně jako jiné lipofilní látky se 3-ABA může akumulovat

v tukových tkáních, jako je prsní tkáň, a přetrvávat zde v závislosti na množství aktivujících enzymů (MPO a/nebo LPO) [Stiborová *et al.*, 2005].

Při oxidaci 3-ABA peroxidasami mohou také vznikat volné radikály, které nekovalentně modifikují molekuly DNA a přispívají tak k jeho mutagenitě či karcinogenitě v promoční fázi karcinogeneze [Stiborová, 2002; Stiborová *et al.*, 2005].



Obr. 13 Metabolická aktivace 3-NBA a 3-ABA vedoucí k tvorbě aduktů s DNA.

NQO1 = NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa

CYP = cytochrom P450

POR = NADPH:cytochrom P450 oxdoreduktasa

NAT = N,O-acetyltransferasa

SULT = sulfotransferasa

R = -COCH₃ nebo -SO₃H

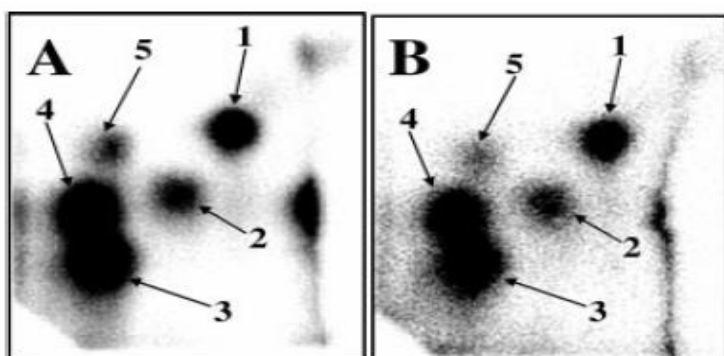
[Převzato z Stiborová *et al.*, 2006]

4.2 MECHANISMUS MUTAGENNÍHO A KARCINOGENNÍHO PŮSOBENÍ 3-NITROBENZANTHRONU

Hlavní faktory mající vliv na vznik nádorových procesů vyvolaných karcinogeny regulujících intermediální metabolismus jsou v organismu pravděpodobně rozdílná vnímavost k různým polutantům životního prostředí, různorodost v enzimech metabolizující cizorodé látky, životní styl (způsob výživy, kouření, množství užívaných léků aj.), genetický polymorfismus, a také množství hormonů [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2005].

Nejčastějším zhoubným, a pro mnoho pacientů často smrtelným, onemocněním na světě je v současné době rakovina plic. Jeden z hlavních faktorů přispívajících ke vzniku této nemoci je kouření. Předpokládá se také, že neméně významnými v této souvislosti jsou i znečištěné ovzduší a zplodiny z výfukových plynů. Zvýšené riziko rakoviny plic ze znečištěného ovzduší potvrzují i nálezy nitro-PAH (též 3-NBA) v plicích nekuřáků trpících tímto onemocněním [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2003, 2005; Stiborová *et al.*, 2005, 2006, 2008].

Jeden ze způsobů prokazujících mutagenní (genotoxické) účinky 3-NBA je detekce jeho aduktů s DNA, ke které se používá metoda „³²P-postlabelling“, spolu s metodami chromatografickými, nejčastěji vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) nebo chromatografie na tenké vrstvě (TLC) [Nagy *et al.*, 2009]. Těmito analysami byla detekována tvorba pěti majoritních kovalentních aduktů s DNA *in vitro* i *in vivo*. Aduky tvořené z 3-NBA i 3-ABA po aktivaci cytosolárními a mikrosomálními subcelulárními systémy člověka i potkana jsou identické (Obr. 14).



Obr. 14

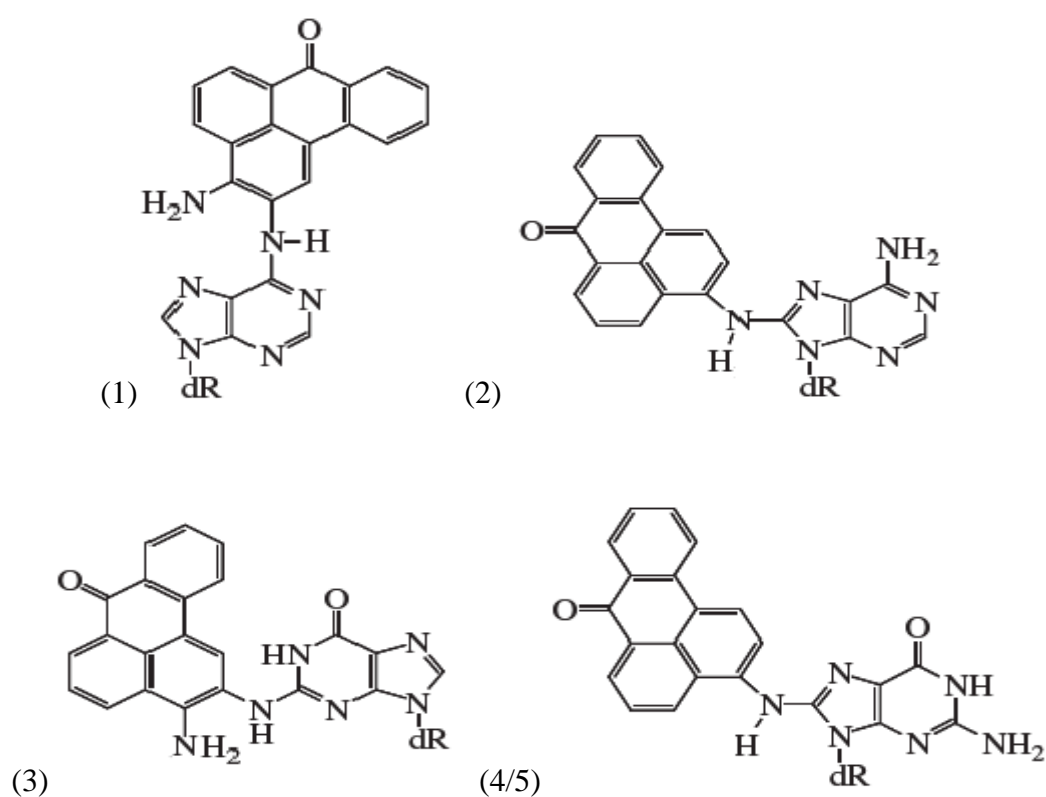
A- Aduky vzniklé po aktivaci 3-NBA cytosolem izolovaném z jater potkana s DNA. B- Aduky vzniklé po aktivaci 3-ABA mikrosomy izolovanými z jater potkana s DNA, detekované pomocí metody „³²P-postlabelling“.

1 – dA-*N*⁶-ABA, 3 - dG-*N*²-ABA, 4/5 - dG-C8-*N*-ABA

[Převzato z Stiborová *et al.*, 2006]

Aduky aktivovaného 3-NBA a 3-ABA s DNA vznikají vazbou aktivovaného metabolitu na purinové báze, tedy buď na deoxyadenosin (dA) (adukt 1 a 2) nebo na deoxyguanosin (dG) (adukt 3, 4 a 5) (Obr. 14) [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003,

2004, 2005, 2008; Nagy *et al.*, 2005; Stiborová *et al.*, 2005, 2006; Bieler *et al.*, 2007; Brocke *et al.*, 2008]. Jejich zastoupení je asi 70% deoxyguanosinových aduktů a 30% deoxyadenosinových aduktů [Nagy *et al.*, 2005]. Všechny tyto adukty byly za použití tenkovrstvé chromatografie nalezeny v diagonální zóně, která je typická pro adukty tvořené z látek znečištěného životního prostředí (Obr. 14, str. 23) [Arlt, 2005; Stiborová *et al.*, 2006]. Tři z nich byly identifikovány jako 2-(2'-deoxyadenosin- N^6 -yl)-3-aminobenzanthron (dA- N^6 -ABA, adukt 1), N -(2'-deoxyguanosin- N^2 -yl)-3-aminobenzanthron (dG- N^2 -ABA, adukt 3) a N -(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthron (dG-C8- N -ABA, adukt 4/5) (Obr. 15).



Obr. 15 Struktura aduktů aktivovaného 3-NBA a 3-ABA s DNA: 1 – dA- N^6 -ABA, 2 - dA-C8- N -ABA, 3 - dG- N^2 -ABA, 4/5 - dG-C8- N -ABA

dR = 2' deoxyribosa

[Převzato z Arlt., 2005]

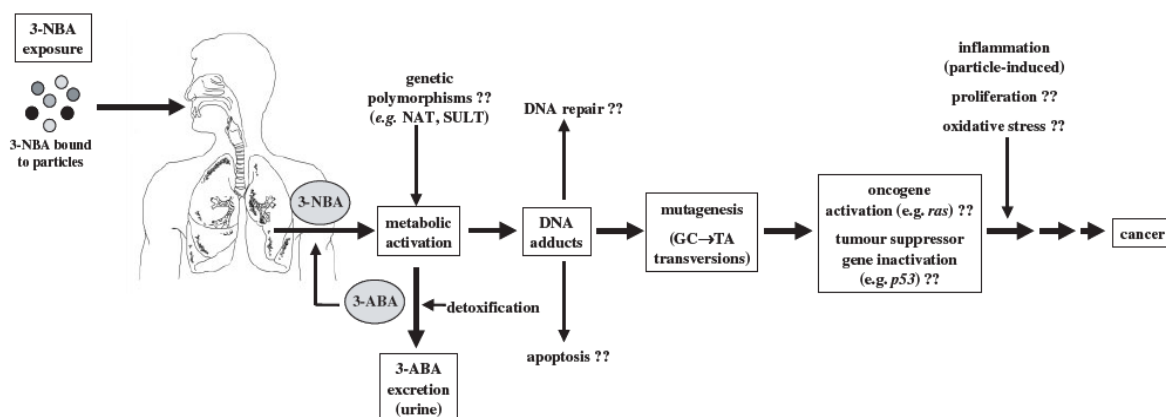
Struktura aduktu 2 ještě nebyla charakterizována, ale mohlo by se jednat o N -(2'-deoxyadenosin-8-yl)-3-aminobenzanthron (dA-C8- N -ABA). Zajímavé je, že dG-C8- N -ABA je nestabilní a rozpadá se na adukty detekované metodou „ 32 P-postlabelling” na

jeho dvě složky (4 a 5) (Obr. 14, str. 23) [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2008; Stiborová *et al.*, 2006, 2008, 2009; Bieler *et al.*, 2007; Brocke *et al.*, 2008]

Velké množství aduktů tvořených z 3-NBA s DNA a jejich schopnost dlouhou dobu přetrvávat v cílových tkáních, jako jsou plíce, výrazně přispívají k mutagenitě těchto látek [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2008; Bieler *et al.*, 2007]. Nejvýznamnější mutací vyvolanou 3-NBA je GC → TA transverze, což je v souladu s množstvím aduktů dG-N²-ABA a dG-C8-N-ABA identifikovaných v jaterních tkáních (70 – 80%) [Nagy *et al.*, 2005, 2007; Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2007, 2008; Stiborová *et al.*, 2009; Bieler *et al.*, 2007; Brocke *et al.*, 2008]. Je pravděpodobné, že právě nedostatečné opravy mutované DNA způsobují perzistenci aduktů ve specifických genech důležitých pro karcinogenesi a vývoj nádorových procesů [Arlt, 2005].

Geny jejichž změny se mohou podílet na vzniku zhoubného bujení se nazývají onkogeny, nealterované buněčné onkogeny se pak nazývají protoonkogeny. Tyto geny kódují proteiny regulující normální růst buňky. Další významnou skupinou genů pro karcinogenesi jsou pak tumorové supresorové geny, jejichž produkty zasahují do buněčného růstu a regulace buněčné proliferace [Stiborová *et al.*, 2002]. V případě chemických karcinogenů byla velmi často prokázána mutace aktivující ras onkogen a deaktivující tumorový supresorový gen p53 (mutace genu p53 se vyskytuje asi v polovině z celkového počtu pacientů s rakovinou) (Obr. 16, str. 26) [Arlt, 2005; Brocke *et al.*, 2008].

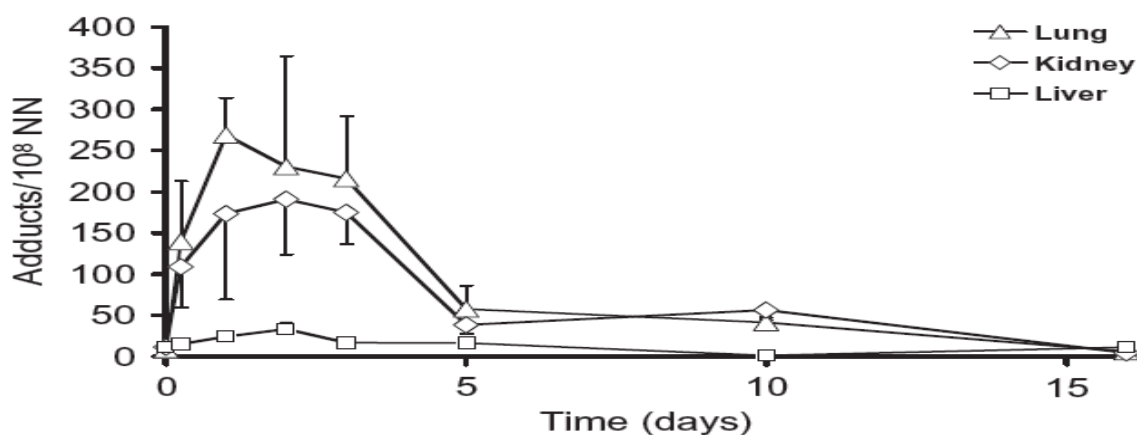
Ke vzniku rakoviny způsobené 3-NBA může též významnou měrou přispívat genetický polymorfismus enzymů, které ho metabolizují. Ten byl prokázán u enzymů, které se účastní aktivace 3-NBA v lidském organismu, jmenovitě NAT, SULT, CYP1A1 i NQO1 [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003; Stiborová *et al.*, 2009; Nagy *et al.*, 2005].



Obr. 16 Mechanismus karcinogeneze 3-NBA u potkanů a lidí. [Převzato z Arlt, 2005]

Karcinogenita 3-NBA byla plně prokázána za použití experimentálního modelu laboratorního potkana [Nagy *et al.*, 2005]. 3-NBA je karcinogenem způsobujícím tumory plic [Nagy *et al.*, 2005].

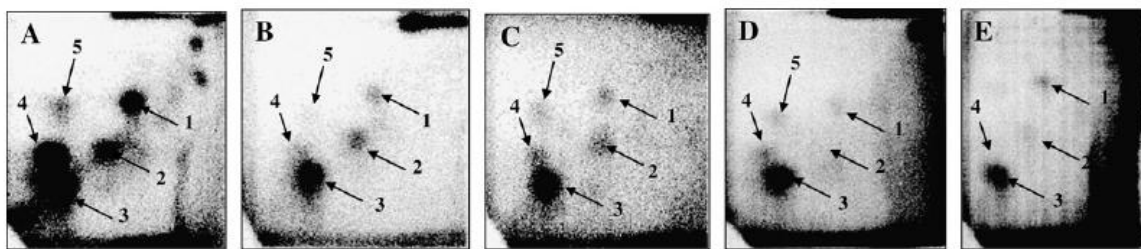
Nagy *et al.* (2005) sledovali účinky 3-NBA po jeho intratracheálním podání potkanům F344 a pro detekce aduktů této sloučeniny s DNA používali metodu ^{32}P -postlabelling spojenou s HPLC. Nejvíce aduktů bylo nalezeno v plicích, jen o něco méně v ledvinách a výrazně méně v játrech. Největší zastoupení měl adukt dG- N^2 -ABA. K jejich výraznému poklesu došlo dva dny po podání 3-NBA. Šestnáct dnů po podání již nebylo možné detekovat žádné adukty (Graf 1), což svědčí o vysoké efektivitě systému způsobujícího opravy poškozené DNA [Nagy *et al.*, 2005].



Graf 1 Množství aduktů tvořených 3-NBA s DNA v plicích, ledvinách a játrech po jeho intratracheálním podání potkanům. Časový průběh přetrvání těchto aduktů. [Převzato z Nagy *et al.*, 2005]

Další testy sledující perzistenci aduktů tvořených z 3-NBA v DNA byly provedeny Bielerem *et. al.* (2007), a to s potkany Sprague-Dawley. Pokusným zvířatům bylo intratracheální instalací podáno v jedné dávce 0,2 mg 3-NBA na kg tělesné hmotnosti a byly pozorovány vzniklé adukty s DNA a jejich přetrvání v plicích (Obr. 17, str. 28), slinivce břišní, ledvinách, močovém měchýři, v srdci, tenkém střevu, játrech a v krvi po dobu 36 týdnů. V souladu s prací Nagy *et al.* (2005) bylo největší množství aduktů nalezeno v plicích, o něco méně v ledvinách a ve slinivce břišní. Výrazně méně jich pak bylo detekováno v srdci, močovém měchýři, tenkém střevě a v játrech. Výsledky ukazující výskyt aduktů 3-NBA s DNA v různých orgánech naznačují, že 3-NBA nebo jeho metabolity jsou distribuovány k jednotlivým orgánům krve. Vysoká koncentrace aduktů ve slinivce břišní může být vysvětlena vysokým množstvím nitroreduktas v tomto orgánu [Anderson *et al.*, 1997]. V souladu s výsledky s Nagy *et al.* (2005) bylo Bielerem *et. al.* (2007) také pozorováno maximální množství aduktů s DNA dva dny po podání 3-NBA. Majoritním aduktem je rovněž detekován dG-N²-ABA (Obr. 17, str. 28). Rozpor byl však nalezen u perzistence aduktů. Zatímco v testech Nagy *et. al.* (2005) nebyly žádné adukty s DNA pozorovány již 16 dnů po aplikaci 3-NBA, v experimentech prováděných Bielerem *et. al.* (2007) byly detekovatelné i 36 týdnů po aplikaci. Možné příčiny pravděpodobně tkví v rozdílnosti pokusných zvířat nebo v použitých metodách. Nicméně přesné důvody těchto diskrepancí musí být dále zkoumány.

Zajímavý výsledek byl nalezen při studiu perzistence aduktů 3-NBA s DNA v krvi experimentálních zvířat [Bieler *et al.*, 2007]. Adukty 3-NBA s DNA byly pozorovány až 20 týdnů po vystavení 3-NBA (Obr. 18, str. 28) [Bieler *et al.*, 2007]. Tyto výsledky naznačují možnost využití sledování aduktů 3-NBA s DNA v krvi jako „marker“ vystavení populace tomuto karcinogenu.

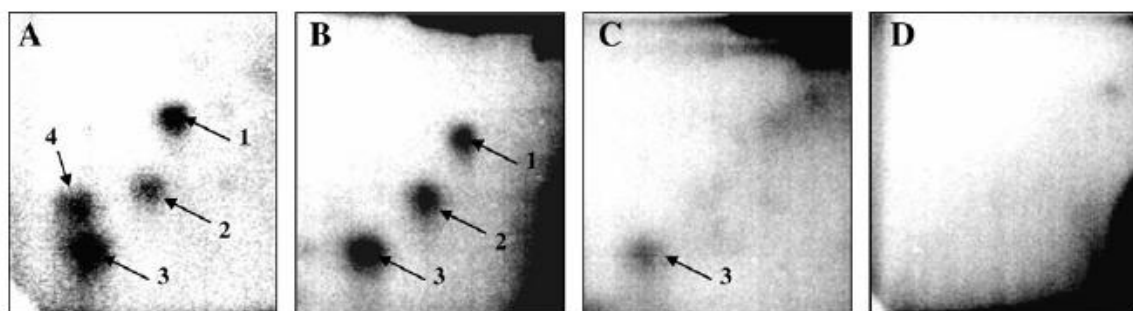


Obr. 17 Adukty 3-NBA s DNA nalezené v plicní tkáni potkanů Sprague-Dawley po intratracheálním podání 0,2 mg/kg tělesné váhy 3-NBA, detekované pomocí metody „³²P-postlabelling”.

A – 2 dny, B – 2 týdny, C – 10 týdnů, D – 20 týdnů, E – 36 týdnů po podání.

1 – dA-N⁶-ABA, 3 - dG-N²-ABA, 4/5 - dG-C8-N-ABA

[Převzato z Bieler *et al.*, 2007]



Obr. 18 Adukty 3-NBA s DNA nalezené v krvi potkanů Sprague-Dawley po intratracheálním podání 0,2 mg/kg tělesné váhy 3-NBA, detekované pomocí metody „³²P-postlabelling”.

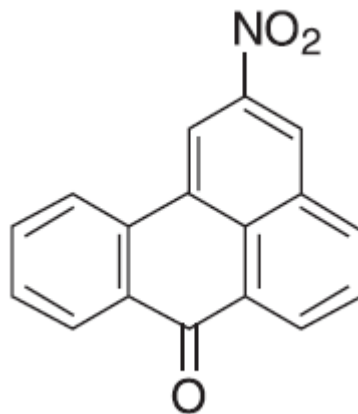
A – 2 dny, B – 2 týdny, C – 20 týdnů, D – 36 týdnů po podání.

1 – dA-N⁶-ABA, 3 - dG-N²-ABA, 4/5 - dG-C8-N-ABA

[Převzato z Bieler *et al.*, 2007]

5. MECHANISMUS ROZDÍLNÉHO PŮSOBENÍ 3-NITROBENZANTHRONU A 2-NITROBENZANTHRONU

5.1 2-NITROBENZANTHRON



Obr. 19 Vzorec 2-nitrobenzanthronu

2-nitrobenzanthron (2-NBA, 2-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on) (Obr. 19) je další polycyklickou aromatickou nitrosloučeninou nalezenou jako polutant znečištěného ovzduší.

2-NBA je izomerem 3-NBA, který byl detekován ve znečištěném ovzduší v koncentracích výrazně vyšších než v případě 3-NBA. Např. v jednom vzorku vzduchu byla koncentrace 2-NBA 495 pg/m³ a 3-NBA 6,8 pg/m³. Jejich poměr, 2-NBA/3-NBA, byl tedy 70 [Arlt, 2005]. 2-NBA vzniká převážně procesy probíhajícími v atmosféře, zatímco 3-NBA, vyskytující se hlavně ve výfukových plynech, je tvořen při spalovacích procesech [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2007].

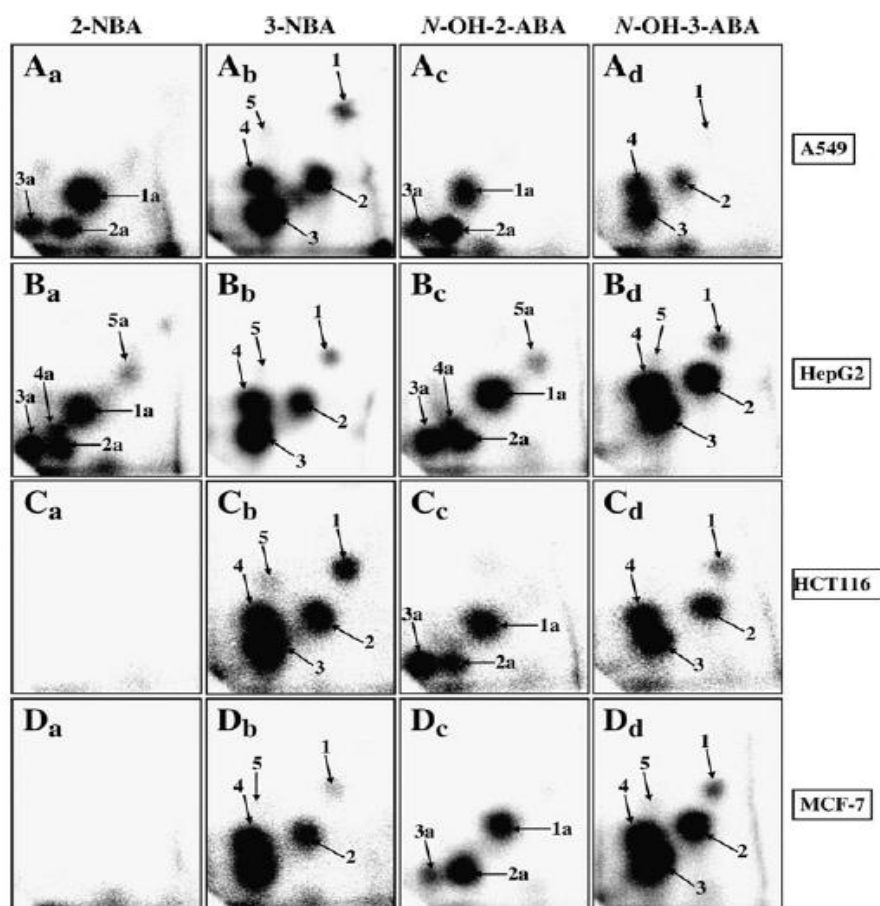
Genotoxicita obou látek byla testována řadou experimentů *in vitro* a *in vivo* v organismu laboratorního potkana. Z těchto experimentů vyplývá, že i 2-NBA může vytvářet adukty s DNA. Ve srovnání s 3-NBA je však schopnost tvorby aduktů s DNA pro 2-NBA jen velmi nízká, a proto je 2-NBA sloučeninou pouze slabě toxickou [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 2007].

I když je 2-NBA ve srovnání s 3-NBA látkou slabě toxickou, jeho vysoká koncentrace v ovzduší by však mohla představovat vysoké zdravotní riziko pro lidskou populaci [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2007].

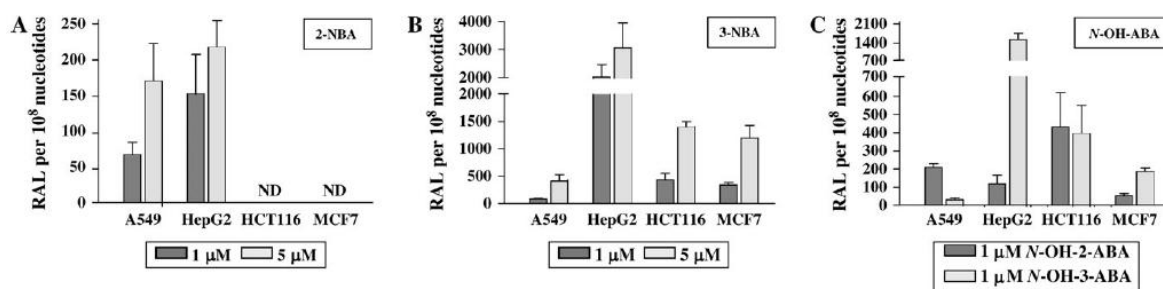
5.2 SROVNÁNÍ MUTAGENNÍCH ÚČINKŮ

2-NITROBENZANTHRONU A 3-NITROBENZANTHRONU

Arlt *et al.* (2007) testovali efektivitu jak 2-NBA a jeho hydroxylovaného derivátu N-OH-2-ABA, tak i 3-NBA a N-OH-3-ABA *in vitro* na různých lidských nádorových buněčných liniích (plicní A549, jaterní HepG2, HCT116 - nádorů tlustého střeva, MCF-7- buňky prsního adenokarcinomu) tvořit adukty s DNA (Obr. 20, 21).



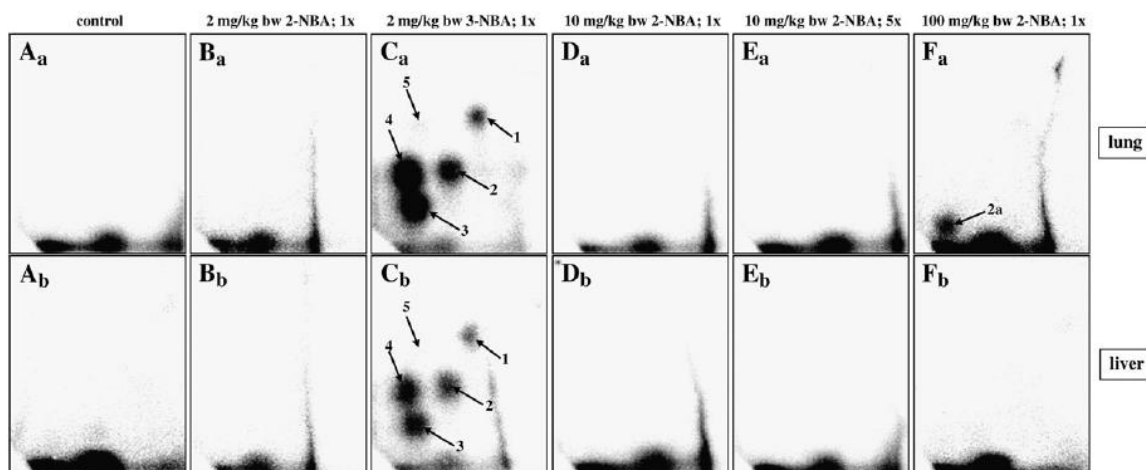
Obr. 20 Aduky s DNA detekované po expozici 2-NBA (A), 3-NBA (B), N-OH-2-ABA (C) a N-OH-3-ABA (D) v různých lidských buněčných liniích (A549, HepG2, HCT116, MCF-7), detekované pomocí metody „³²P-postlabelling” [Arlt *et al.*, 2007].



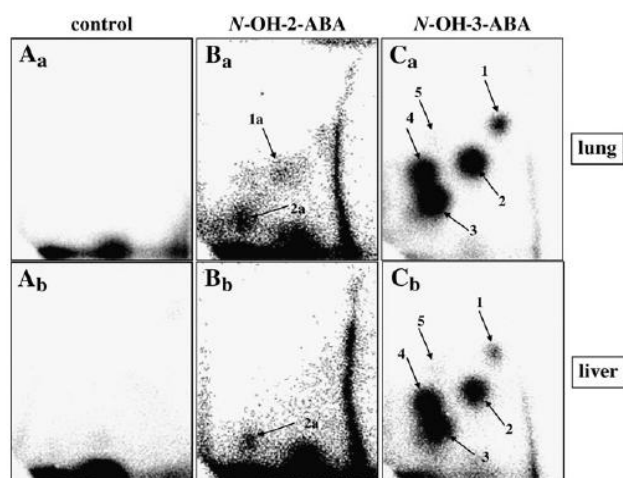
Obr. 21 Množství aduktů s DNA po expozici 2-NBA (A), 3-NBA (B), N-OH-2-ABA a N-OH-3-ABA (C) v různých lidských buněčných liniích [Arlt *et al.*, 2007]

V případě 2-NBA byly nalezeny adukty s DNA pouze v buňkách A549 a HepG2 (adukty 1a-5a, Obr. 20Aa a 20Ba). Jejich množství bylo závislé na koncentraci 2-NBA, které byly buněčné linie vystaveny (Obr. 21). Podobné adukty byly pozorovány při použití 3-NBA (adukty 1-5, Obr. 20Ab a 20Bb), jejich množství ale bylo porovnáním s 2-NBA výrazně vyšší (Obr. 21). Tvorba aduktů 2-NBA s DNA však nebyla detekována v buňkách HCT116 a MCF-7 (Obr. 20Ca a 20Da), zatímco adukty DNA s 3-NBA byly tvořeny s vysokou efektivitou (Obr. 20Cb a 20Db). Možné vysvětlení tohoto rozdílu je v odlišné vazebné afinitě 2-NBA do aktivního centra enzymů přeměňujících tuto látku v buňkách HCT116 a MCF-7. Při použití N-OH-2-ABA byly detekovány adukty s DNA ve všech lidských buněčných liniích (Obr. 20Ac-Dc), a byly shodné s adukty pozorovanými po působení 2-NBA na buňky A549 a HepG2. Také jejich množství bylo srovnatelné (Obr. 21). Navíc pro obě látky platí, že majoritní adukty jsou 1a, 2a a 3a. Při srovnání tvorby aduktů z N-OH-2-ABA a N-OH-3-ABA s DNA v testovaných buněčných nádorových liniích je patrné, že jsou jejich hladiny rozdílné. V případě buněk HepG2 a MCF-7 tvoří N-OH-3-ABA adukty v mnohem vyšších koncentracích než tvoří N-OH-2-ABA. V případě buněk A549 je tomu naopak (Obr. 21C).

Potenciál 2-NBA, 3-NBA a jejich N-hydroxylovaných derivátů tvořit adukty s DNA byl testován i *in vivo*. Jako experimentální model byl použit laboratorní potkan kmene Wistar (Obr. 22, 23, str. 32) [Arlt *et al.*, 2007]. Adukty byly analyzovány v DNA řady orgánů, jmenovitě plic, jater, ledvin, slinivky břišní a střev.



Obr. 22 Aduky s DNA detekované po intratracheálním podání 2-NBA nebo 3-NBA v plicích a játrech u potkanů Wistar. Kontrola (A), 1x 2 mg 2-NBA na kg tělesné hmotnosti (B) nebo 3-NBA (C), 1x 10 mg 2-NBA na kg tělesné hmotnosti (D) 1x denně po dobu 5 dnů 10 mg 2-NBA na kg tělesné hmotnosti (E), 1x 100 mg 2-NBA na kg tělesné hmotnosti (F), detekované pomocí metody „³²P-postlabelling” [Arlt *et al.*, 2007].



Obr. 23 Aduky s DNA detekované po intratracheálním podání N-OH-2-ABA nebo N-OH-3-ABA v plicích a játrech u potkanů Wistar. Kontrola (A), 1x 10 mg N-OH-2-ABA na kg tělesné hmotnosti (B) nebo N-OH-3-ABA (C), detekované pomocí metody „³²P-postlabelling” [Arlt *et al.*, 2007].

Při aplikaci 2 mg 3-NBA na kg tělesné hmotnosti byly nalezeny adukty s DNA ve všech orgánech, zatímco u stejné dávky 2-NBA žádné adukty detekovány nebyly [Arlt *et al.*, 2007]. Aduky DNA nebyly pozorovatelné ani po podání vyšší dávky 2-NBA (10 mg/kg), a také ani při opakovaném podání této zvýšené dávky (1x denně po

dobu 5 dnů). Jediný adukt v DNA byl detekován pouze v plicích, a to až při dávce 100 mg 2-NBA na kg tělesné hmotnosti. Zdá se, že se jedná o adukt 2a nalezený v DNA lidských nádorových buněk při expozici 2-NBA [Arlt *et al.*, 2007].

Výsledky tohoto experimentu jsou v rozporu se studií Nagy *et al.* (2007), kteří pozorovali tvorbu aduktů s DNA po intratracheálním podání 2-NBA potkanům F344 mírně modifikovanou metodou „³²P-postlabelling” kombinovanou se separací aduktů pomocí HPLC již při dávce 5 mg 2-NBA na kg tělesné hmotnosti. Tento rozpor může být důsledkem různých typů potkanů použitých v experimentu (Wistar x F344), odlišným způsobem podání 2-NBA (intraperitoneálně x intratracheálně) nebo použitím odlišné metody separace aduktů (TLC x HPLC). Nicméně přesné důvody těchto rozporů bude nutné ještě dále zkoumat [Arlt *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 2007].

Ze studií obou laboratoří [Arlt *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 2007] však jednoznačně vyplývá, že efektivita tvorby aduktů 2-NBA (či jeho hydroxylovaného derivátu) je výrazně nižší, než je efektivita 3-NBA (a N-OH-3-ABA). Důvody této rozdílnosti nejsou dosud vysvětleny.

Proto se této problematice věnujeme i v naší laboratoři. Poslední, dosud nepublikované výsledky naší laboratoře [Stiborová *et al.*, zasláno k publikaci] ukazují, že 2-NBA není dobrým substrátem žádných enzymů, které aktivují 3-NBA (NQO1, XO, NADPH:CYP reductasa). V experimentech *in vitro*, využívajících tyto enzymové systémy bylo pozorováno, že oproti 3-NBA, 2-NBA tyto enzymy neaktivují (netvoří se adukty s DNA) [Stiborová *et al.*, zasláno k publikaci]. Otevřenou otázkou tedy je, jakými enzymovými systémy je 2-NBA metabolizován v nádorových buněčných liniích, kde adukty s DNA byly detekovány [Arlt *et al.*, 2007]. V dalších studiích se tedy zaměříme na zodpovězení této otázky.

6. ZÁVĚR

Aromatické nitrosloučeniny jsou látky přítomné ve všech složkách životního prostředí, které jsou považovány za jeho toxické a karcinogenní kontaminanty. Mezi tyto látky patří i nedávno nalezené nitrobenzanthrony (NBA) vyskytující se převážně ve znečištěném ovzduší.

3-nitrobenzanthron (3-NBA, 3-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on) je jednou z polycyklických aromatických nitrosloučenin s vysokými toxickými účinky, který se vyskytuje ve složkách životního prostředí, je přítomný i ve výfukových plynech, byl také detekován v půdě a jeho výskyt byl prokázán i v dešťové vodě. Patří mezi nejsilnější mutageny, je karcinogenem pro hlodavce a také potenciálním karcinogenem pro člověka.

2-nitrobenzanthron (2-NBA, 2-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on), isomer 3-NBA, je další polycyklickou aromatickou nitrosloučeninou nalezenou jako polutant znečištěného ovzduší.

Poznání mechanismu toxicity a karcinogenicity těchto sloučenin, zjištění koncentrací, při nichž jsou 3-NBA a 2-NBA toxické a karcinogenní, jak jsou v organismech metabolizovány, a jaké množství těchto látek a jejich metabolitů přetrvává ve složkách životního prostředí a v organismech samotných, jsou podmínkou ke zlepšení prognózy vývoje chorob způsobených přítomností těchto látek ve znečištěném životním prostředí. Těmito chorobami jsou především různá nádorová onemocnění. Studium této problematiky směřuje i k návrhům vedoucím k prevenci před vznikem těchto chorob. Z těchto důvodů je velmi důležité pokračovat ve výzkumu těchto látek.

Seznam použité literatury

K. E. Anderson, G. J. Hammons, F. F. Kadlubar, J. D. Potter, K. R. Kaderlik, K. F. Ilett, R. F. Minchin, C. H. Teitel, H-C. Chou, M. V. Martin, F. P. Guengerich, G. W. Barone, N. P. Lang, L. A. Peterson; Metabolic activation of aromatic amines by human pankreas, *Carcinogenesis*, **18**, 1085-1092 (1997)

V. M. Arlt, H. Glatt, E. Muckel, U. Pabel, B. L. Sorg, H. H. Schmeiser, D. H. Phillips: Metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferases, *Carcinogenesis*, **23**, 1937-1945 (2002)

V. M. Arlt, M. Stiborová, A. Hewer, H. H. Schmeiser, D. H. Phillips: Human enzymes involved in the metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone: evidence for reductive activation by human NADPH:cytochrome P450 reductase, *Cancer Res.*, **63**, 2752-2761 (2003)

V. M. Arlt, K. J. Cole, D. H. Phillips: Activation of 3-nitrobenzanthrone and its metabolites to DNA-damaging species in human B lymphoblastoid MCL-5 cells, *Mutagenesis*, **19**, 149-156 (2004)

V. M. Arlt: 3-Nitrobenzanthrone, a potential human cancer hazard in diesel exhaust and urban air pollution: a review of the evidence, *Mutagenesis*, **20**, 399-410 (2005)

V. M. Arlt, M. Stiborová, C. J. Henderson, M. R. Osborne, Ch. A. Bieler, E. Frei, V. Martínek, B. Sopko, C. R. Wolf, H. H. Schmeiser, D. H. Phillips: Environmental pollutant and potent mutagen 3-nitrobenzanthrone forms DNA adducts after reduction by NAD(P)H:quinone oxidoreductase and conjugation by acetyltransferases and sulfotransferases in human hepatic cytosols, *Cancer Res*, **65**, 2644-2652 (2005)

V. M. Arlt, H. Glatt, G. Gamboa da Costa, J. Reynisson, T. Takamura-Enya, D. H. Phillips: Mutagenicity and DNA adduct formation by the urban air pollutant 2-nitrobenzanthrone, *Toxicol Sci.*, **98**, 445-457 (2007)

V. M. Arlt, J. Gingerich, H. H. Schmeiser, D. H. Phillips, G. R. Douglas, P. A. White: Genotoxicity of 3-nitrobenzanthrone and 3-aminobenzanthrone in MutaTMMouse and lung epithelial cells derived from MutaTMMouse, *Mutagenesis*, **23**, 483-490 (2008)

Ch. A. Bieler, M. G. Cornelius, M. Stiborová, V. M. Arlt, M. Wiessler, D. H. Phillips, H. H. Schmeiser: Formation and persistence of DNA adducts formed by the carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone in target and non-target organs after intratracheal instillation in rats, *Carcinogenesis*, **28**, 1117-1121 (2007)

J. v. Brocke, A. Kraus, C. Whibley, M.C. Hollstein, H. H. Schmeiser: The carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone induces GC to TA transversion mutations in human *p53* sequences, *Mutagenesis*, **24**, 17-23 (2008)

IARC: Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes (Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans), *IARC*, **46** (1989)

E. Nagy, M. Zeisig, K. Kawamura, Y. Hisamutsa, A. Sugeta, S. Adachi, L. Möller: DNA adduct and tumor formations in rats after intratracheal administration of the urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone, *Carcinogenesis*, **26**, 1821-1828 (2005)

E. Nagy, S. Adachi, T. Takamura-Enya, M. Zeisig, L. Möller: DNA adduct formation and oxidative stress from the carcinogenic urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone and its isomer 2-nitrobenzanthrone, *in vivo* and *in vitro*, *Mutagenesis*, **22**, 135-145 (2007)

E. Nagy, M. G. Cornelius, L. Möller: Accelerated ³²P-HPLC for bulky DNA adducts, *Mutagenesis*, **24**, 183-189 (2009)

National Toxicology Program. U.S. Department of health and human services: eight report on carcinogens (1998)

P. R. Race, A. L. Lovering, R. M. Green, A. Oссор, S. A. White, P. F. Searle, Ch. J. Wrighton, E. I. Hyde: Structural and mechanistic studies of *escherichia coli* nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone, *J Biol Chem.*, **280**, 13256-13264 (2005)

J. Reynisson, M. Stiborová, V. Martínek, G. Gamboa da Costa, D. H. Phillips, V. M. Arlt: Mutagenic potential of nitrenium ions of nitrobenzanthrones: correlation between theory and experiment, *Environ Mol Mutagen.*, **49**, 659-667 (2008)

G. Sabbioni,¹ Ch. R. Jones, O. Sepai, A. Hirvonen, H. Norppa, H. Järventaus, H. Glatt, D. Pomplun, H. Yan, L. R. Brooks, S. H. Warren, D. M. DeMarini, Y.-Y. Liu: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility in workers exposed to nitrotoluenes, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **15**, 559-566 (2006)

M. Stiborová, E. Frei, H. H. Schmeiser: Aristocholové kyseliny a ledvinové onemocnění „Chinese herbs nephropathy”, *Chem. Listy*, **94**, 186-189 (2000)

M. Stiborová: Aromatické nitrosloučeniny: kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka, *Chem. Listy*, **96**, 784-791 (2002)

M. Stiborová, J. Patočka, E. Frei, H. H. Schmeiser: Biochemické a toxikologické aspekty etiologie balkánské endemické nefropatie, *Chem. Listy*, **99**, 782-788 (2005)

M. Stiborová, V. M. Arlt, C. J. Henderson, C. R. Wolf, E. Frei, H. H. Schmeiser, D. H. Phillips: Molecular mechanism of genotoxicity of the environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, **149**, 191-197 (2005)

M. Stiborová, H. Dračínská, J. Hájková, P. Kadeřábková, E. Frei, H. H. Schmeiser, P. Souček, D. H. Phillips, V. M. Arlt: The environmental pollutant and carcinogen 3-nitrobenzanthrone and its human metabolite 3-aminobenzanthrone are potent inducers of rat hepatic cytochromes P450 1A1 and -1A2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase, *Drug Metab Dispos.*, **34**, 1398-1405 (2006)

M. Stiborová, H. Dračínská, M. Martínková, J. Mizerovská, E. Frei, H. H. Schmeiser, J. Hudeček, P. Hodek, D. H. Phillips, V. M. Arlt: The environmental pollutant and carcinogen 3-nitrobenzanthrone induces cytochrome P450 1A1 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in rat lung and kidney, thereby enhancing its own genotoxicity, *Toxicology*, **247**, 11-22 (2008)

M. Stiborová, H. Dračínská, M. Martínková, J. Mizerovská, J. Hudeček, P. Hodek, J. Liberda, E. Frei, H. H. Schmeiser, D. H. Phillips, V. M. Arlt: 3-aminobenzanthrone, a human metabolite of the carcinogenic environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone, induces biotransformation enzymes in rat kidney and lung, *Mutat Res*, **676**, 93-101 (2009)

T. Takamura-Enya, H. Suzuki, Y. Hisamatsu: Mutagenic activities and physicochemical properties of selected nitrobenzanthrones, *Mutagen*, **21**, 399-404 (2006)

G. A. Umbuzeiro, A. Franco, M. H. Martins, F. Kummrow, L. Carvalho, H. H. Schmeiser, J. Leykauf, M. Stiborová, L. D. Claxton: Mutagenicity and DNA adduct formation of PAH, nitro-PAH and oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from Sao Paulo, Brazil, *Mutat Res*, **652**, 72-80 (2007)

