PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA BIOCHEMIE

Studium metabolismu 3-aminobenzanthronu a indukce biotransformačních enzymů

Autoreferát disertační práce

RNDr. Jana Mizerovská

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

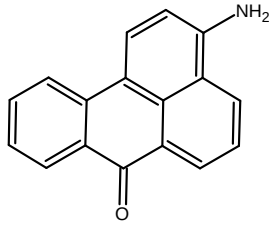
Praha 2010

ÚVOD

3-Nitrobenzanthron jako prekurzor 3-aminobenzanthronu

3-Nitrobenzanthron, 3-nitro-7H-benz-[d,e,]-anthracen-7on, (3-NBA), je polycyklická aromatická nitrosloučenina, která je jedním z nejsilnějších mutagenů a karcinogenů pro hlodavce. 3-NBA se vyskytuje ve složkách životního prostředí a jako součást výfukových plynů dieselových motorů. Jeho výskyt v prostředí byl prokázán teprve nedávno[9, 8, 14]. Tvořen je pravděpodobně buď nedokonalým spalováním nafty nebo reakcí parentálního polycyklického aromatického uhlovodíku (benzanthronu) s oxidy dusíku z atmosféry. Výskyt 3-NBA je však daleko širší. Byl rovněž prokázán v půdě, na zemském povrchu a jako součást srážkových vod[14, 17, 18, 23]. Jeho mutagenita byla prokázána v testech s několika kmeny *Salmonella typhimurium*. Genotoxicita 3-NBA pak byla prokázána jeho potenciálem tvořit kovalentní adukty s DNA. Ty byly detekovány jak v experimentech *in vitro* a v buněčných kulturách, tak i v experimentech *in vivo* (laboratorní potkan, myš[12, 13, 15, 2]). V organismu laboratorního potkana indukuje 3-NBA vývoj nádorů plic[19]. 3-NBA je i potenciálním karcinogenem pro člověka[14, 1, 9, 19].

3-Aminobenzanthron



Obr. 1
3-aminobenzanthron

3-Aminobenzanthron (3-amino-7H-benz-[d,e]-anthracen-7-on, 3-ABA, *Obr. 1*), je hlavním redukčním metabolitem 3-NBA, který byl nalezen v moči pracovníků solných dolů[21], kde byli tito pracovníci v pracovním prostředí vystaveni vysokým

koncentracím emisí produkovaných dieselovými motory. Uvedené výsledky naznačují, že by 3-ABA mohl být vhodným bimarkerem pro sledování expozice člověka 3-NBA.

V porovnání s 3-NBA je 3-ABA je méně cytotoxickou sloučeninou, ale zdá se, že by se mohl podílet na modulaci imunitní odpovědi, např. zvýšenou indukcí cytokininů[16, 20].

Všechny procesy metabolické aktivace 3-NBA a 3-ABA jsou v organismu zprostředkovány enzymově katalysovanými reakcemi. Na metabolické aktivaci 3-ABA se podílí především cytochromy P450[7]. Kromě nich pak i další oxidoredukční enzymy. Takovými enzymy, aktivujícími 3-ABA *in vitro,* jsou peroxidasy, jako např.: prostaglandin H synthasa[23], která se hojně vyskytuje v močovém měchýři, a dále pak laktoperoxidasa, myeloperoxidasa a křenová peroxidasa[3]. Všechny zmíněné enzymy jsou schopné aktivovat 3-ABA za tvorby aduktů s DNA

Biotransformace 3-nitrobenzanthronu v organismu probíhá především redukčními reakcemi jeho nitro skupiny. Enzymy, které participují na těchto reakcích jsou zejména NAD(P)H:chinooxidoreduktasa 1 (NQO1), xanthinoxidasa a NADPH:CYP oxidoreduktasa[7, 9].

V metabolických studiích bylo zjištěno, že po enzymové aktivaci 3-ABA dochází k tvorbě takových aduktů s DNA[7, 5, 6, 4], které jsou shodné s adukty tvořenými z jeho nitroaromatického prekurzoru, 3-NBA. Adukty v DNA byly detekovány metodou ^{32}P postlabeling[22], a to jak v experimentech *in vitro*[7, 5, 15, 2, 9, 6, 4, 11, 12, 10], tak i *in vivo,* v různých tkáních laboratorního potkana a myši. Nicméně, informace o detailním metabolismu jak 3-ABA, tak i parentálního 3-NBA, jsou stálé velmi malé. Proto byla disertační práce zaměřena na studium této problematiky

.

CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce bylo studium metabolické aktivace 3-nitrobenzanthronu a jeho metabolitu 3-aminobenzanthronu. Dalším cílem práce bylo studium potenciálu obou sloučenin indukovat biotransformační enzymy, které participují na jejich metabolismu.

V rámci disertační práce byly řešeny následující problematiky:

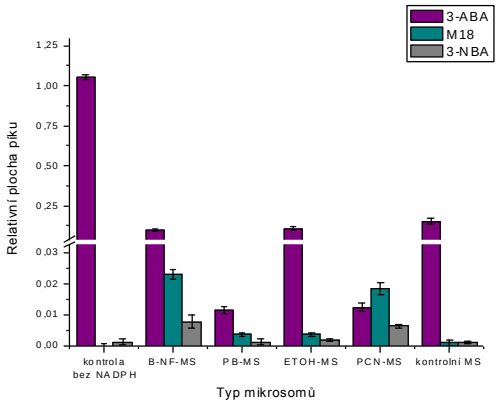
- Studium metabolismu 3-aminobenzanthronu cytochromy P450 jaterních mikrosomů potkanů. Určení majoritních cytochromů P450 oxidujících
  3-aminobenzanthron v těchto subcelulárních systémech.
- Studium metabolismu 3-aminobenzanthronu rekombinantními cytochromy P450. Určení majoritních lidských a potkaních cytochromů P450 oxidujících 3-aminobenzanthron.
- Poznání metabolismu 3-aminobenzanthronu peroxidasami.
- Studium indukčního potenciálu 3-nitrobenzanthronu na expresi biotransformačních enzymů po intraperitoneální premedikaci potkanů.
- Studium indukčního potenciálu 3-aminobenzanthronu na expresi biotransformačních enzymů po intraperitoneální premedikaci potkanů.
- Studium indukčního potenciálu 3-nitrobenzantronu na expresi biotransformačních enzymů po jeho aplikaci potkanům intratracheální instilací.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Předkládaná disertační práce přispívá k rozšíření znalostí v oblasti studia oxidace metabolitu karcinogenní sloučeniny 3-nitrobenzanthronu, 3-aminobenzanthronu. Přispívá též k poznání funkce cytochromů P450 participujících na oxidaci výše uvedené sloučeniny. V neposlední řadě rozšiřuje znalosti v oblasti studia 3-nitrobenzanthronu a jeho potenciálu indukovat biotransformační enzymy. Rozvíjí tak široké spektrum biochemických poznatků. Nejdůležitější výsledky zjištěné v disertační práci lze shrnout následovně:

3-Aminobenzanthron je oxidován jaterními mikrosomálními systémy potkana

Metabolismus 3-aminobenzanthronu byl studován jaterními mikrosomálními systémy potkana premedikovaného vybranýni induktory cytochromů P450 v podmínkách *in vitro*. 3-Aminobenzanthron je přeměňován na tři metabolity, *N*-hydroxy-3-aminobenzanthron (*N*-OH-ABA), 3-NBA a metabolit s dosud neurčenou strukturou, označovaný jako metabolit M18. Nejúčinnější v oxidaci 3-aminobenzanthronu je mikrosomální systém potkana premedikovaného fenobarbitalem (induktor CYP2B) (*Obr. 2, str. 5*), přičemž u tohoto systému předpokládáme detoxikační metabolickou cestu. Dalším vysoce efektivním systémem v oxidaci 3-ABA byl mikrosomální systém potkana premedikovaného PCN (induktor CYP3A1/2), následovaný mikrosomálním systémem potkana premedikovaného ß-naftoflavonem (induktor CYP1A1/2). Získané výsledky prokazují participaci CYP1A, 2B a 3A na metabolismu 3-ABA (*Obr. 2, str. 5*). Pro potvrzení těchto výsledků byly provedeny inhibiční studie se selektivními inhibitory cytochromů P450 (*Tabulka 1, str. 5*). I výsledky z těchto studií potvrzují, že v oxidaci 3-ABA jaterními mikrosomy hrají nejdůležitější roli cytochromy P450 1A, 2B a 3A.



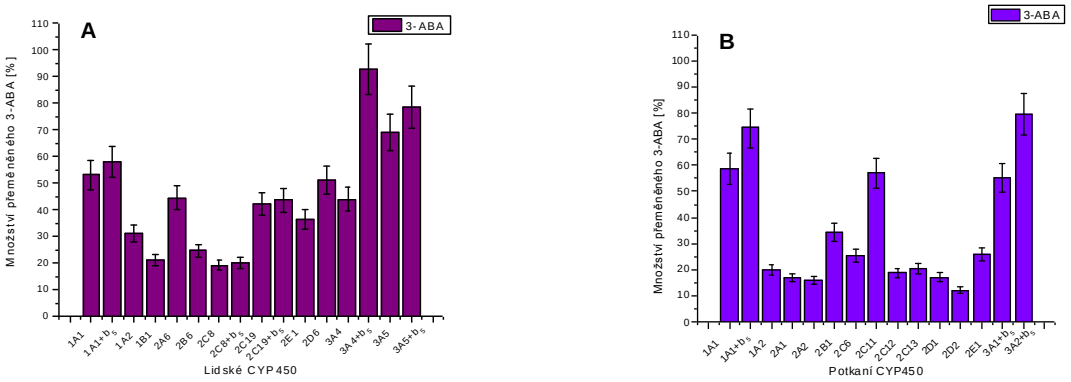
Obr. 2 Oxidace 3-ABA jaterními mikrosomy potkana indukovaného induktory CYP. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

Tabulka 1 Inhibice metabolismu 3-ABA specifickými inhibitory CYP

Inhibitor CYP 450	Jaterní mikrosomy potkana	IC_{50} [μM]
α-naftoflavon (CYP1A1/2)	β-NF - MS (CYP1A1/2)	10,9
furafylin (CYP1A2)	β-NF - MS (CYP1A1/2)	16,6
diamantan (CYP2B)	PB-MS (CYP2B)	0,9
ketokonazol (CYP 3A1/2)	PCN-MS (CYP 3A1/2)	20,0
DDTC (CYP2E1)	EtOH-MS (CYP2E1)	80,6
DDTC (CYP2E1)	kontrolní MS	96,8
sulfafenazol (CYP2C)	kontrolní MS	10,8
ketokonazol (CYP 3A1/2)	kontrolní MS	3,5

Potkaní a lidské rekombinantí cytochromy P450 oxidují 3-aminobenzanthron

V případě potkaních rekombinantních cytochromů P450 dominovala v oxidaci 3-ABA podrodina cytochromů P450 3A, následovaná podrodinou 1A. Lidské rekombinační cytochromy P450 také oxidují 3-ABA, přičemž neefektivnější byly orthologní cytochromy P450, jmenovitě cytochromy P450 3A a 1A. Cytochrom b_5 stimuloval oxidaci 3-ABA těmito enzymy. 3-Aminobenzanthron je rovněž oxidován potkaním CYP2C11 a lidským CYP2D6 (*Obr. 3, str. 6*). U vybraných cytochromů P450 byly určeny kinetické parametry oxidace 3-ABA (*Tabulka 2, str. 6*).



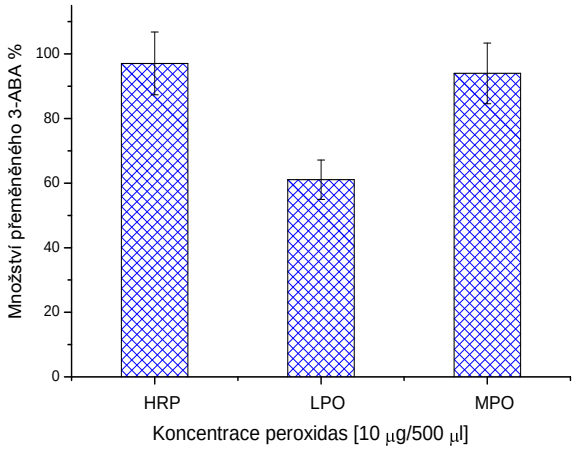
Obr. 3 Oxidace 3-ABA lidskými (A) a potkaními (B) rekombinantními CYP. Data v obrázku jsou průměry a standardní odchylky určené ze tří paralelních experimentů.

Tabulka 2 Kinetické parametry K_m a V_{max} pro oxidaci 3-ABA rekombinantními CYP

Typ cytochromu P450	K_m [μM]	V_{max} [min^{-1}]	K_m/V_{max} [μM . min]
lidský CYP1A1	75,50	21,0	3,60
lidský CYP1A1+b_5	122,80	24,0	5,12
lidský CYP3A4	68,27	10,0	6,83
lidský CYP3A4+b_5	38,41	28,0	1,37
potkaní CYP1A1	27,70	7,0	3,96
potkaní CYP1A1+b_5	42,11	8,0	5,26
potkaní CYP3A1+b_5	49,99	13,0	3,85
potkaní CYP3A2+b_5	62,51	20,0	3,13

3-Aminobenzanthron je oxidován peroxidasami

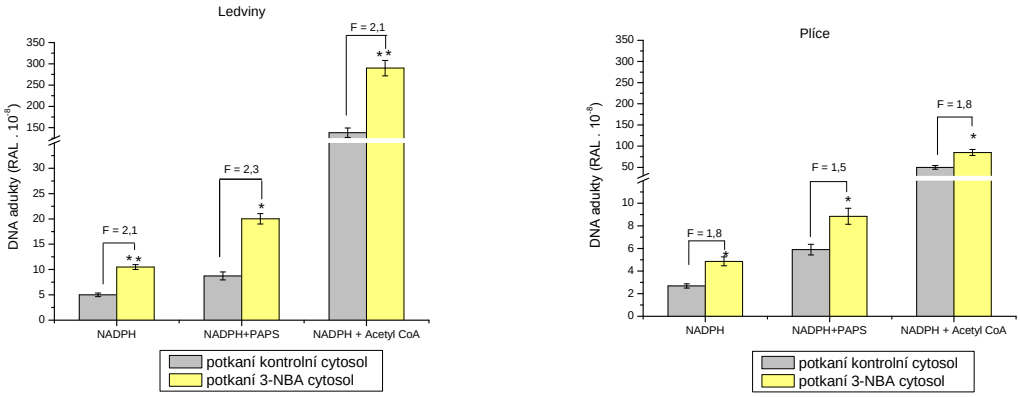
Nejefektivnější v oxidaci 3-ABA je křenová peroxidasa, následovaná živočišnými peroxidasami, myeloperoxidasou a laktoperoxidasou (*Obr. 4*).



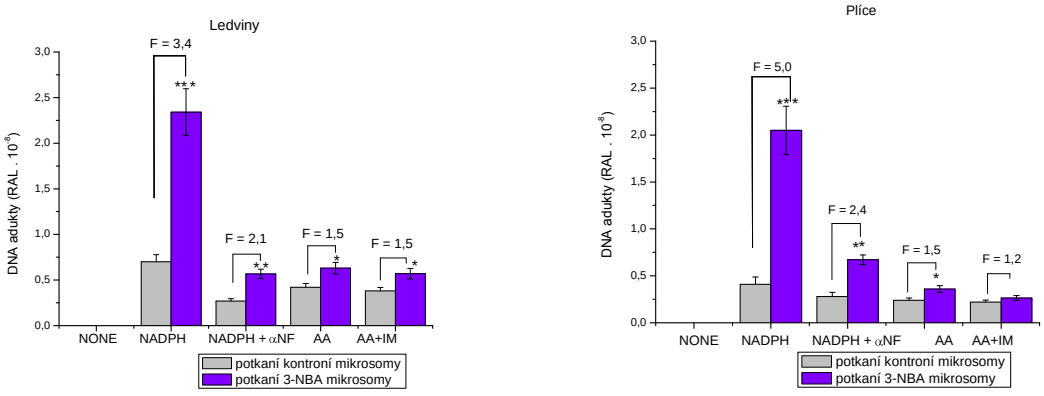
Obr. 4 Oxidace 3-ABA peroxidasami. Data v obrázku jsou průměrem dvou paralelních stanovení.

3-Nitrobenzanthron indukuje expresi biotransformačních enzymů v ledvinách a plicích po intraperitoneální premedikaci

Vystavení organismu laboratorního potkana 3-nitrobenzanthronu (i.p.) vede k signifikantnímu zvýšení exprese i enzymových aktivit CYP1A1 a NQO1 v ledvinné a plicní tkáni potkana. 3-NBA tedy působí jako účinný induktor těchto enzymů. Vlivem indukce dochází k navýšení redukce 3-NBA a oxidace 3-ABA, a tím následně ke zvýšené tvorbě aduktů 3-NBA a 3-ABA s DNA (*Obr. 5 a 6*).



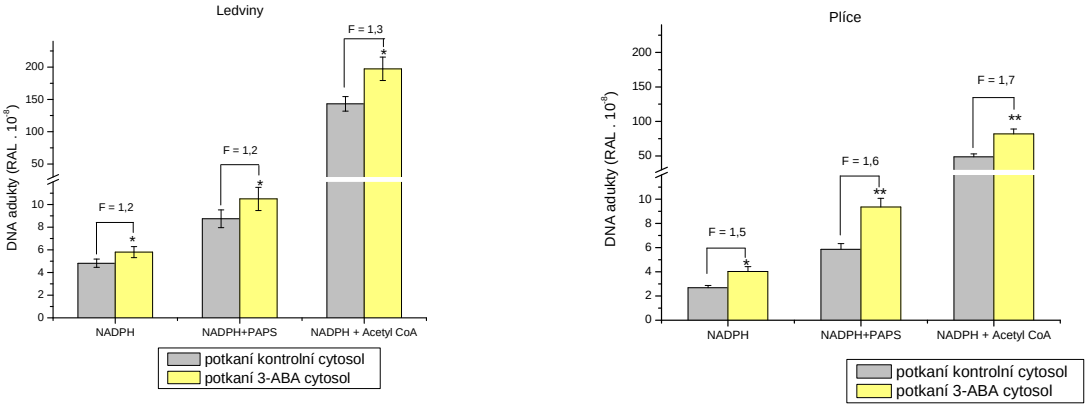
Obr. 5 Tvorba aduktů 3-NBA s DNA po aktivaci cytosolem kontrolních potkanů a cytosolem zvířat premedikovaných 40 mg/kg 3-NBA, **p*<0.05, ***p*<0.01. Hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření.



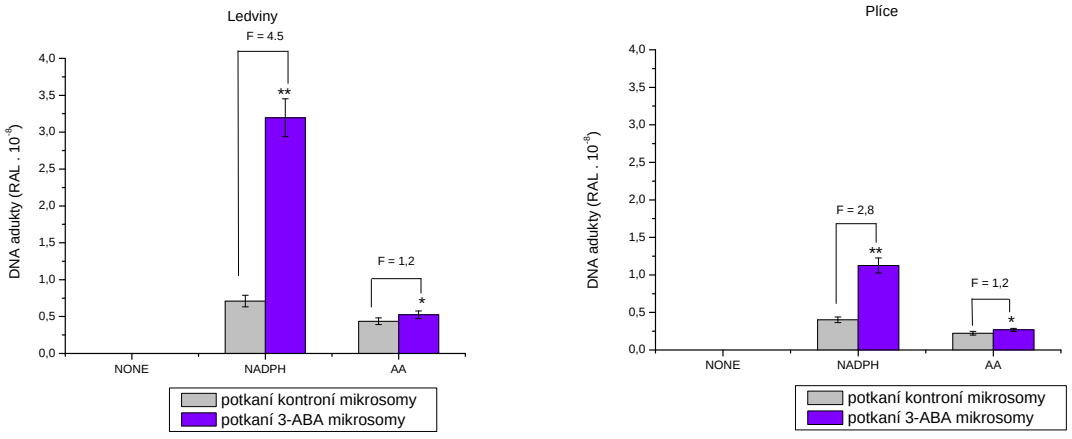
Obr. 6 Tvorba aduktů 3-ABA s DNA po aktivaci mikrosomy kontrolních potkanů a mikrosomy potkanů premedikovaných 40 mg/kg 3-NBA, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001. Hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření.

3-Aminobenzanthron indukuje biotransformační enzymy v ledvinách a plicích po intraperitoneální premedikaci

Intraperitoneální aplikace 3-aminobenzanthronu laboratorním potkanům rovněž vedla k signifikantnímu zvýšení exprese i aktivit CYP1A1 a NQO1 v plicní tkáni tohoto experimentálního modelu. V případě ledvinné tkáně byl zaznamenán nárůst hladiny exprese pouze u CYP1A. 3-ABA je tedy též induktorem těchto enzymů, avšak méně účinným než je 3-nitrobenzanthron. Vlivem indukce biotransformačních enzymů pak dochází k navýšení redukce 3-NBA a oxidace 3-ABA, a tím následně ke zvýšené tvorbě aduktů 3-NBA a 3-ABA s DNA (*Obr. 7 a 8*)



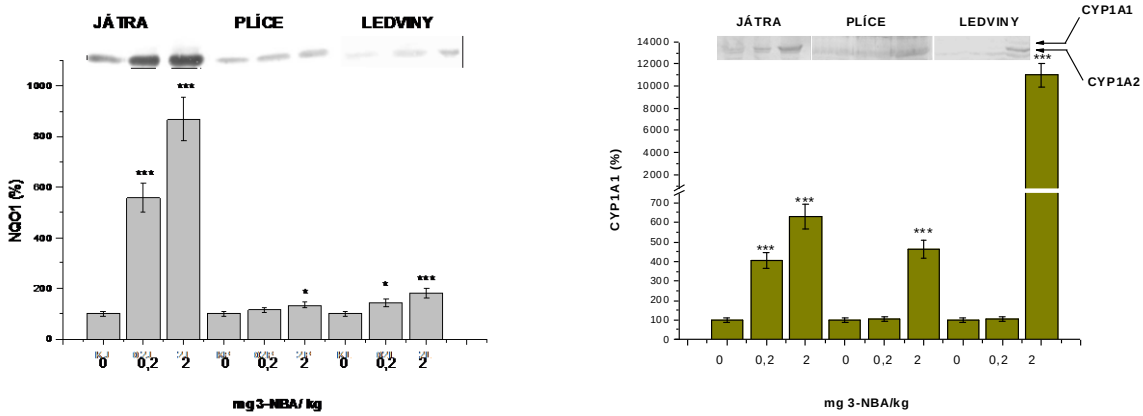
Obr. 7 Tvorba aduktů 3-NBA s DNA po aktivaci cytosolem kontrolních potkanů a cytosolem potkanů premedikovaným 40 mg/kg 3-ABA, **p*<0.05, ***p*<0.01, Hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření.



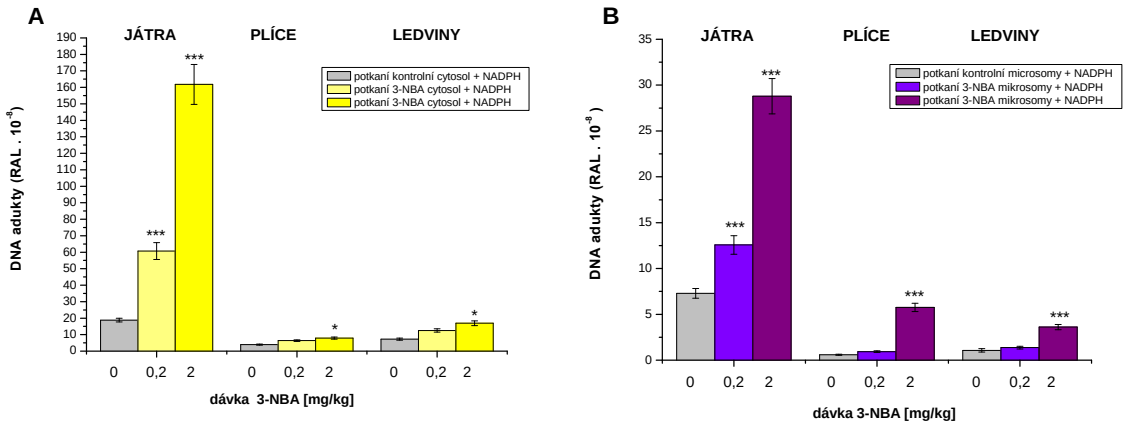
Obr. 8 Tvorba aduktů 3-ABA s DNA po aktivaci mikrosomy kontrolních potkanů a mikrosomy potkanů premedikovaným 40 mg/kg 3-ABA, **p*<0.05, ***p*<0.01. Hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření.

3-Nitrobenzanthron indukuje biotransformační enzymy v játrech, ledvinách a plicích po intratracheální instilaci

3-Nitrobenzanthron zvyšuje expresi i enzymové aktivity CYP1A1 a NQO1 v jaterní, ledvinné i plicní tkáni potkana i po intratracheální instilaci touto karcinogenní látkou (0,2 a 2 mg 3-NBA/kg) (*Obr. 9*). Zvolená intratracheální instilace simuluje přirozenou expozici lidské populace 3-NBA, kdy běžně dochází k jeho expozici prostřednictvím dýchacích cest (inhalačně). 3-Nitrobenzanthron zvyšoval i hladinu CYP1A2, a to především v jaterní tkáni potkana. Působí tedy i touto formou expozice jako účinný induktor studovaných biotransformačních enzymů. Vlivem uvedené indukce dochází rovněž k významnému zvýšení redukce 3-NBA a oxidace 3-ABA, a tím následně ke zvýšené tvorbě aduktů 3-NBA a 3-ABA s DNA (*Obr. 10*, *str.10*).



Obr. 9 Vliv intratracheální aplikace 3-NBA na indukci exprese cytosolárního proteinu NQO1 a mikrosomálních proteinů CYP1A1/2 v játrech, ledvinách a plicích potkanů kontrolních a premedikovaných 3-NBA v dávkách 0,2, a 2 mg/kg hmotnosti zvířete. Hodnoty v obrázku jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření. Pro NQO1: **p*<0.05, ****p*<0.001, pro CYP1A1/2: **p*<0.05, ****p*<0.01.



Obr. 10 Tvorba aduktů 3-NBA s DNA po aktivaci cytosoly kontrolních potkanů a cytosoly potkanů instilovaných dávkou 0,2 a 2 mg/kg 3-NBA (**A**), **p*<0.05, ****p*<0.01. Tvorba aduktů 3-ABA s DNA po aktivaci mikrosomy kontrolních potkanů a mikrosomy potkanů instilovaných dávkou 0,2 a 2 mg/kg 3-NBA (**B**), ***p<0.001. Hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky určené ze tří nezávislých měření.

Jak je z výše uvedeného souhrnu patrné, předkládaná disertační práce přináší originální vědecké poznatky na poli studia metabolismu karcinogenních látek a indukce biotransformačních enzymů. Část těchto poznatků již byla také publikována formou časopiseckých publikací ve vědeckých periodikách. Takto bylo publikováno 5 prací, které tvoří součást disertační práce jako přílohy 1-5. Jedna práce je pak připravena k zaslání do časopisu k publikaci (viz rukopis publikace v přípravě uvedený jako příloha 6 disertační práce).

Práce byla podporována grantovou agenturou České republiky (granty 303/09/0472 a 305/09/H008) a Ministerstvem školství a tělovýchovy České republiky (granty MSM0021620808 a 1M0505).