

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



**Metabolismus karcinogenního *o*-nitroanisolu,
jeho metabolitu *o*-nitrofenolu
a environmentálních polutantů
2-nitrobenzanthronu a 3-nitrobenzanthronu**

Autoreferát disertační práce

RNDr. Martina Svobodová

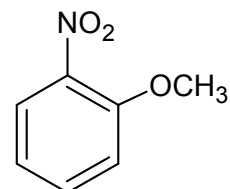
Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2010

ÚVOD

2-Nitroanisol

2-Nitroanisol (2-methoxynitrobenzen, 2-NA, *obrázek 1*) je významný průmyslový polutant a silný karcinogen vyvolávající u myši a potkanů tvorbu nádorů močového měchýře, v menší míře také nádory sleziny, jater a ledvin ^[19, 30, 31]. Tato sloučenina má také toxické účinky a způsobuje anémii. 2-NA je primárně používán jako prekursor při výrobě *o*-anisidinu (2-methoxyanilinu), intermediátu, který je dále využíván v barvářském průmyslu při výrobě azobarviv. Rovněž je využíván ve farmaceutickém průmyslu jako meziproduct při syntéze některých léčiv ^[30, 31].



Obrázek 1

Vzorec 2-nitroanisolu

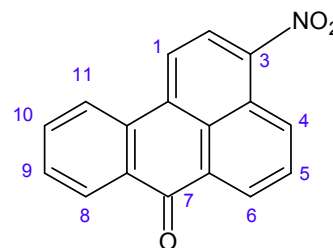
Navzdory tomu, že 2-nitroanisol je silným karcinogenem pro hlodavce, vykazuje jen slabou mutagenní aktivitu v Amesově testu pro kmen *Salmonella typhimurium*. Tato karcinogenní látka vykazuje též nízkou aktivitu v cytogenetických testech. Indukuje nepatrný nárůst chromosomálních aberací a sesterských chromatidových výměn, ale pouze při vysokých koncentracích ^[31].

2-Nitroanisol může být metabolisován dvěma cestami. Hlavní cestou metabolismu této sloučeniny *in vivo* je oxidační demethylace na 2-nitrofenol, který je vylučován z těla močí ve formě buď sulfátového konjugátu vytvořeného reakcí s fosfoadenosinfosulfátem katalyzovanou enzymem sulfotransferasou, nebo konjugátu s kyselinou glukuronovou vzniklého reakcí s UDP-glukuronovou kyselinou ^[22]. Druhou, minoritní cestou metabolismu 2-nitroanisolu, je jeho redukce na *o*-anisidin, která probíhá v játrech ^[22]. Nitroredukce 2-nitroanisolu, která je obecně považována za aktivační cestu metabolismu aromatických nitrosloučenin, byla prokázána ve studii *in vivo* ^[22]. Ve studiích *in vitro* bylo prokázáno, že *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin, který je tvořen jako redukční metabolit 2-nitroanisolu po inkubaci s jaterním cytosolem nebo xanthinoxidasou, tvoří kovalentní adukty s DNA ^[21, 34, 37]. Dále bylo ukázáno, že 2-nitroanisol tvoří adukty s DNA *in vivo* v organismu laboratorních potkanů, kteří byli premedikováni touto sloučeninou ^[37]. Tyto výsledky potvrzující kovalentní vazbu 2-nitroanisolu na DNA po

aktivaci lidskými cytosolárními reduktasami *in vitro* a v organismu potkana *in vivo* naznačují, že 2-nitroanisol působí genotoxickým mechanismem.

3-Nitrobenzanthron

3-Nitrobenzanthron (3-NBA, 3-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on, *obrázek 2*) patřící mezi polycyklické aromatické nitrosloučeniny je silným mutagenem, karcinogenem pro laboratorního potkana [16] a podezřelým karcinogenem pro člověka [20]. Jeho genotoxicita byla prokázána v řadě testů na mutagenitu [9, 16] a potenciálem tvořit specifické adukty s DNA [2]. Výskyt těchto aduktů byl pozorován *in vitro* v buněčných kulturách a *in vivo* v organismu laboratorního potkana a myši [2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 27, 36].



Obrázek 2

Vzorec 3-nitrobenzanthronu

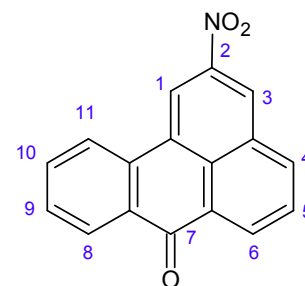
3-NBA se nachází ve složkách životního prostředí, byl detekován v půdě a také jako součást srážkových vod [24, 25, 40]. Jeho výskyt ve výfukových plynech byl prokázán teprve v roce 1997 [16]. 3-NBA byl detekován ve výfukových plynech v rozsahu 0,1 - 24 pmol/mg [16, 23], v atmosféře od 1,4 do 249 fmol/m³ [16, 17] a v půdě v rozsahu 4,3 - 4211 fmol/g [25, 40]. 3-NBA pravděpodobně vzniká majoritně nedokonalým spalováním nafty. V menší míře může 3-NBA vznikat také reakcí parentálního polycyklického uhlovodíku s oxidy dusíku z atmosféry, zejména v přítomnosti ozonu [16, 17]. Jeho genotoxické účinky mohou představovat vysoké riziko především pro profesionální řidiče, pracovníky garáží či benzínových stanic, mechaniky a horníky [18, 28, 29, 33].

Biotransformace 3-NBA probíhá zejména redukční cestou [5, 7, 8, 35]. V první (derivatizační) fázi biotransformace je nitro-skupina (-NO₂) 3-NBA nejprve redukována přes nitrosoderivát na N-hydroxylamin (-NHOH). Na katalýze této reakce participuje zejména cytosolární enzym NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa [7], v menší míře také xanthinoxidasa [1, 13] a mikrosomální NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (POR) [8]. Vzniklý N-hydroxylamin je velmi nestabilní a rozpadá se na nitréniový ion, který buď sám nebo po přeměně na karbéniový ion reaguje s nukleofilními centry DNA za tvorby specifických aduktů [2, 3]. Ve druhé fázi biotransformace dochází ke konjugaci

N-hydroxylaminu s aktivním sulfátem či acetátem, která usnadňuje tvorbu nitréniového iontu. Tyto reakce jsou v lidském organismu katalyzovány *N,O*-acetyltransferasami (NAT1 a NAT2) a sulfottransferasami (SULT1A1 a SULT1A2) [5, 7].

2-Nitrobenzanthron

2-Nitrobenzanthron (2-NBA, 2-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on, *obrázek 3*) je další polycyklická aromatická nitrosloučenina vyskytující se jako polutant znečištěného ovzduší. Tento izomer 3-NBA byl detekován ve znečištěném ovzduší v koncentracích až 70x vyšších než v případě 3-NBA. 2-NBA vzniká převážně procesy probíhajícími v atmosféře, zatímco 3-NBA, vyskytující se zejména ve výfukových plynech, je tvořen spalovacími procesy [32, 39].



Obrázek 3

Vzorec 2-nitrobenzanthronu

Genotoxicita obou izomerů byla testována v řadě studiích *in vitro* a *in vivo* v organismu laboratorního potkana. Z těchto experimentů vyplývá, že i 2-NBA může vytvářet adukty s DNA [4, 26]. V porovnání s 3-NBA je však u 2-NBA schopnost tvorby aduktů s DNA jen velmi nízká. Proto je 2-NBA považován za sloučeninu slabě toxickou [4, 38]. Navzdory této skutečnosti, vysoká koncentrace 2-NBA v ovzduší by mohla znamenat vysoké zdravotní riziko pro lidskou populaci.

CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo rozšíření současných znalostí v oblasti studia metabolismu karcinogenních aromatických nitrosloúčenin, konkrétně průmyslového polutantu 2-nitroanisolu a dvou environmentálních polutantů 2-nitrobenzanthronu a 3-nitrobenzanthronu.

V rámci disertační práce byly řešeny následující problematiky:

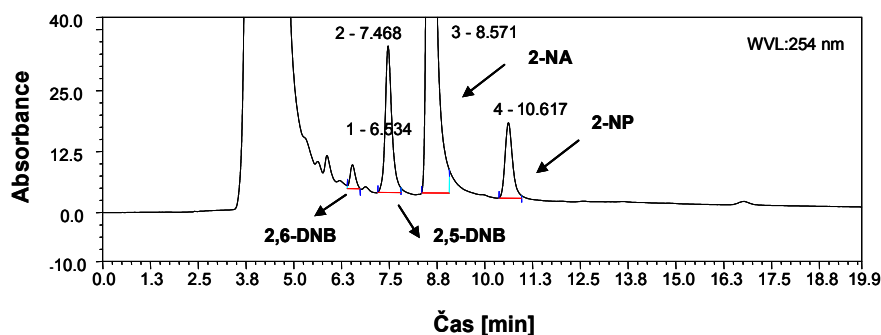
- Příprava a charakterizace 2,5-dihydroxynitrobenzenu jako metabolitu 2-nitroanisolu
- Metabolismus 2-nitroanisolu cytochromy P450 jaterních mikrosomů potkana
- Metabolismus 2-nitroanisolu potkaními a lidskými cytochromy P450
- Metabolismus 2-nitrofenolu potkaními a lidskými cytochromy P450
- Studium kinetiky oxidace 2-nitrofenolu cytochromem P450 2E1
- Studium metabolismu a aktivace environmentálních polutantů 2-nitrobenzanthronu a 3-nitrobenzanthronu

VÝSLEDKY A DISKUSE

Předkládaná disertační práce přispívá k rozšíření znalostí v oblasti metabolismu karcinogenních aromatických nitrosloučenin, konkrétně průmyslového polutantu 2-nitroanisolu a dvou environmentálních polutantů, 2-nitrobenzanthronu a 3-nitrobenzanthronu, ohrožujících lidskou populaci. Nejdůležitější poznatky zjištěné v disertační práci lze shrnout následovně:

Charakterizován byl dosud neznámý metabolit 2-nitroanisolu, který je tvořen vedle 2-nitrofenolu a 2,6-dihydroxynitrobenzenu. Tímto metabolitem je 2,5-dihydroxynitrobenzen

Na základě srovnání chromatografických vlastností neznámého metabolitu 2-NA se syntetizovaným standardem a s použitím „ko-chromatografické“ analýzy s inkubační směsí byl tento metabolit identifikován jako 2,5-dihydroxynitrobenzen (obrázek 4).

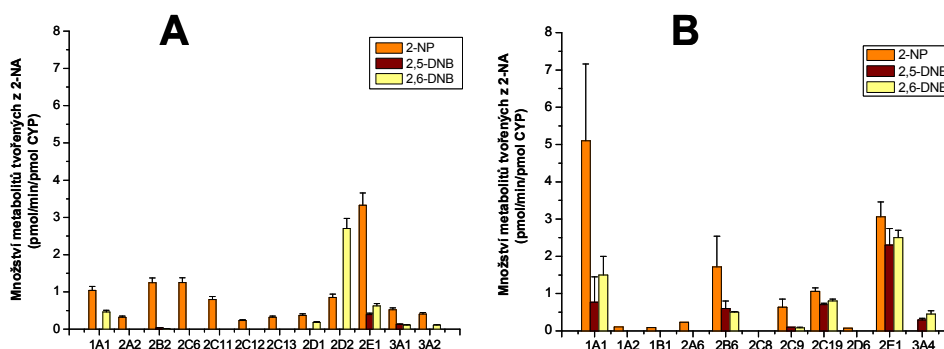


Obrázek 4 Separace metabolitů 2-nitroanisolu tvořených mikrosomy jater králíka premedikovaného fenobarbitalem s přidáním 2,5-DNB pomocí HPLC.

Byly identifikovány cytochromy P450 zodpovědné za tvorbu jednotlivých metabolitů 2-nitroanisolu

Pro studium živočišných cytochromů P450 participujících na oxidaci 2-NA a tvorbě jeho metabolitů byly použity systémy mikrosomální frakce potkanů premedikovaných známými induktory jednotlivých cytochromů P450 a rekombinantní potkaní a lidské cytochromy P450 exprimované v SupersomechTM. Výsledky získané s potkaními enzymy byly

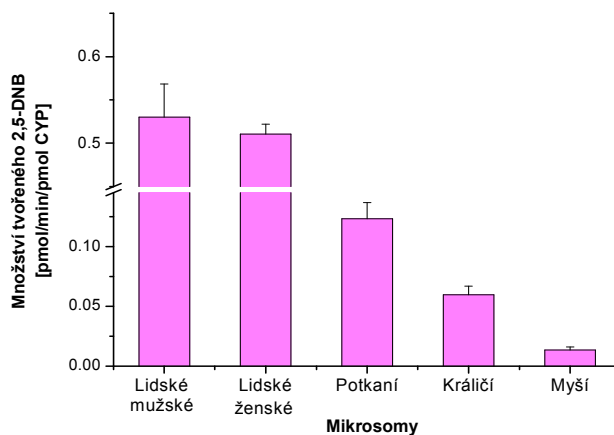
srovnány s výsledky nalezenými pro oxidaci 2-nitroanisolu lidskými cytochromy P450. Zjistili jsme, že v obou biologických druzích jsou tvořeny stejné metabolity (obrázek 5) a že na oxidaci 2-nitroanisolu se v obou případech podílí především CYP2E1, 1A1 a dále v menší míře cytochromy P450 podrodin 2B, 2C a 2D (obrázek 5).



Obrázek 5 Metabolismus 2-nitroanisolu rekombinantními potkaními (A) a lidskými (B) cytochromy P450. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření a znázorněné chyby představují směrodatné odchylky ze tří stanovení.

2,5-Dihydroxynitrobenzen je jediným metabolitem oxidace 2-nitrofenolu

Zjistili jsme, že 2-nitrofenol je oxidován pouze na jeden metabolit, 2,5-dihydroxynitrobenzen. Dále byla srovnávána efektivita cytochromů P450 jednotlivých živočišných druhů (člověka, potkana, králíka a myši) oxidovat 2-NP (obrázek 6). Z testovaných živočišných systémů byly v oxidaci 2-nitrofenolu nejúčinnější enzymy lidské, následované enzymy potkaními.

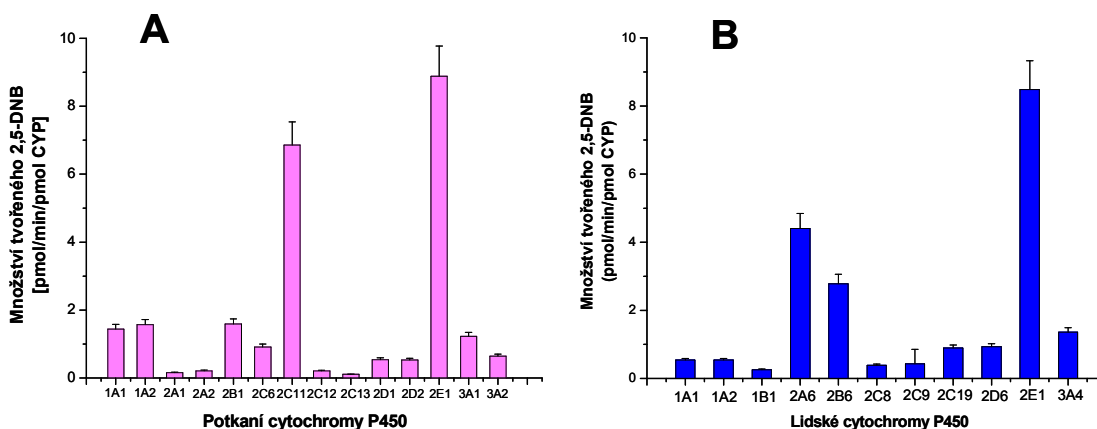


Obrázek 6 Množství tvořeného 2,5-DNB z 2-NP (1 mM) lidskými, potkaními, králíčími a myšími jaterními mikrosomy. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření a znázorněné chyby

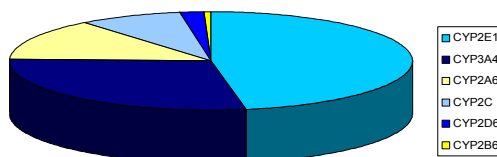
představují směrodatné odchylky ze tří stanovení.

Identifikace jednotlivých cytochromů P450 participujících na oxidaci 2-nitrofenolu

Pro studium jednotlivých cytochromů P450 zodpovědných za oxidaci 2-NP byly použity izolované mikrosomální frakce potkanů premedikovaných známými induktory jednotlivých cytochromů P450. Pro další přiblížení byly využity rekombinantní potkaní a lidské cytochromy P450 v heterologních expresních systémech (SupersomyTM) a v neposlední řadě byl zkoumán také vliv specifických inhibitorů jednotlivých cytochromů P450. Výsledky získané ve studii s potkaními cytochromy P450 byly opět srovnávány s výsledky získanými s enzymy lidskými. Také v těchto studiích bylo zjištěno, že v obou biologických druzích vzniká tentýž metabolit. Na oxidaci 2-NP se v obou případech podílejí nejvíce cytochrom P450 2E1 a cytochromy P450 podrodiny 3A, 2A, 2C a 2D (obrázek 7 a obrázek 8, str. 8).



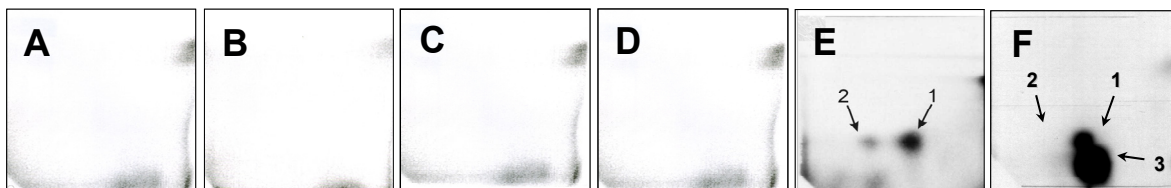
Obrázek 7 Metabolismus 2-nitrofenolu rekombinantními potkaními (A) a lidskými (B) cytochromy P450. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření a znázorněné chyby představují směrodatné odchylky ze tří stanovení.



Obrázek 8 Příspěvky jednotlivých lidských cytochromů P450 na oxidaci 2-NP v lidských jaterních mikrosomech

2-Nitrofenol je detoxifikačním metabolitem karcinogenního 2-nitroanisolu

Mikrosomální subcelulární frakce jater člověka, potkana, králíka a myši nekatalyzuje nitroredukci 2-nitrofenolu na *N*-(2-hydroxyphenyl)hydroxylamin nebo *o*-aminofenol jak za aerobních, tak i anaerobních podmínek. Nebyly detekovány žádné adukty tvořené přeměnou 2-NP lidskými jaterními mikrosomy a cytosoly s DNA (obrázek 9).



Obrázek 9 Autoradiografie aduktů 2-NP tvořených *in vitro* s DNA po aktivaci 2-NP lidskými jaterními mikrosomy za anaerobních podmínek (A, B), lidským jaterním cytosolem za anaerobních podmínek (C, D), *in vivo* v DNA močového měchýře potkanů premedikovaných 2-NA (E), v dGp po reakci s *N*-(2-methoxyphenyl)hydroxylaminem (F). Vzorky E a F byly použity jako pozitivní kontroly. Metoda značení ^{32}P s použitím nukleasy P1 byla použita při analýzách (A, C a E), standardní metoda značení ^{32}P za snížené koncentrace ATP u analýz (B, D a F).

Kinetika oxidace 2-nitrofenolu potkaním a lidským cytochromem P450 je obdobná

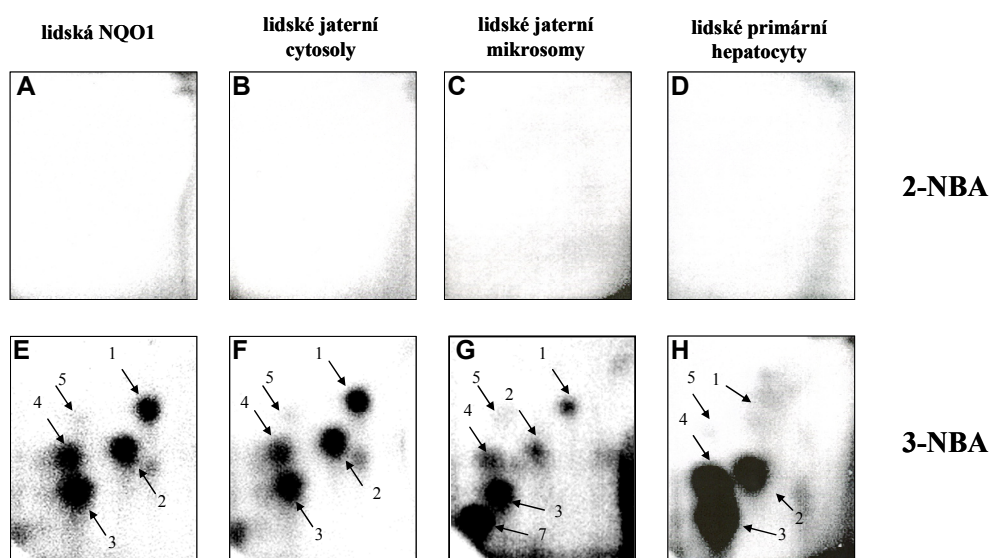
Oxidace 2-nitrofenolu vykazovala v obou biologických druzích kinetiku Michaelise a Mentenové. Byly nalezeny také podobné hodnoty Michaelisovy konstanty K_m a maximální rychlosti reakce V_{\max} (tabulka 1, str. 9).

Tabulka 1 Hodnoty V_{\max} a K_m oxidace 2-NP potkaním a lidským CYP2E1

	V_{\max} [pmol/min/pmol CYP]	K_m [mM]
potkaní CYP2E1	16,2	0,35
lidský CYP2E1	29,5	0,21

3-Nitrobenzanthron je studovanými enzymovými systémy aktivován za tvorby aduktů s DNA

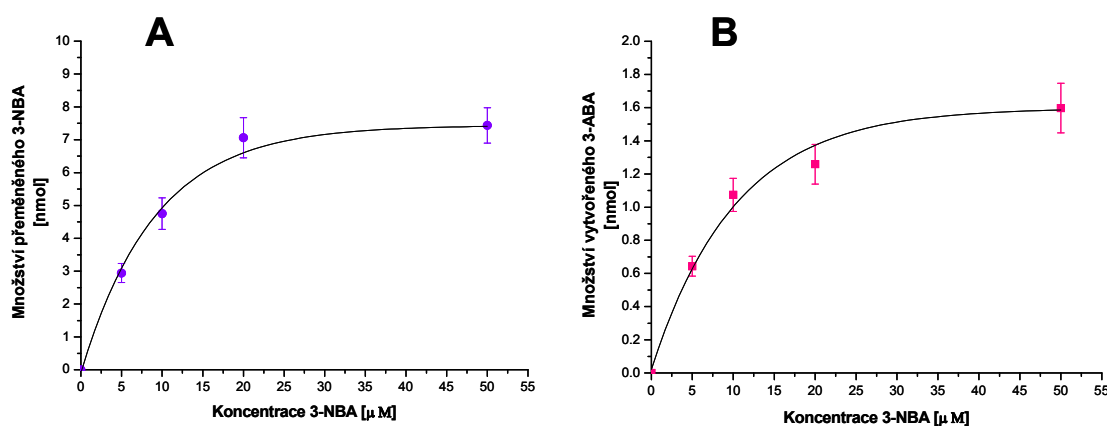
Pomocí metody „ ^{32}P -postlabeling“ byla detekována tvorba aduktů 3-NBA aktivovaného lidskými jaterními cytosoly, lidskými jaterními mikrosomy, lidskou NQO1, xanthinoxidasou a lidskou NADPH:CYP reduktasou s DNA (obrázek 10). 2-NBA nebyl na rozdíl od 3-NBA stejnými enzymovými systémy a za stejných experimentálních podmínek aktivován, nebyly nalezeny žádné jeho adukty s DNA (obrázek 10).



Obrázek 10 Autoradiografický profil aduktů s DNA tvořených 100 μM 2-NBA (A-C) a 100 μM 3-NBA (E-G) po aktivaci rekombinatní lidskou NQO1 (A a E), lidskými jaterními cytosoly (B a F), lidskými jaterními mikrosomy (C a G) a v primární kultuře lidských hepatocytů za přítomnosti 1 μM 2-NBA (D) nebo 3-NBA (H). Autoradiografy byly získány metodou ^{32}P -postlabeling. Skvrna aduktu 1 = dA- N^6 -3-ABA, skvrna aduktu 3 = dG- N^2 -3-ABA, skvrna aduktů 4/5 = dG-C8-N-3-ABA.

3-Nitrobenzanthron je lidskou NQO1 redukován na 3-aminobenzanthron

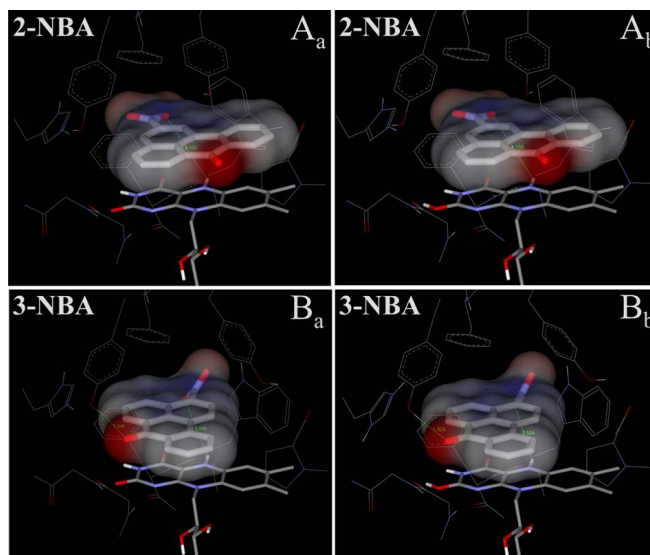
3-NBA je lidskou NQO1 přeměňován za tvorby jednoho metabolitu, 3-ABA. Redukce 3-NBA lidskou NQO1 je závislá na koncentraci tohoto enzymu, na době inkubace a také na koncentraci 3-NBA jako substrátu lidské NQO1. Redukce probíhá klasickou hyperbolickou kinetikou odpovídající kinetice Michaelise a Mentenové (obrázek 11). 2-NBA není ve srovnání s 3-NBA lidskou NQO1 redukován, není tedy pravděpodobně substrátem NQO1.



Obrázek 11 Závislost množství přeměněného 3-NBA (A) a vytvořeného 3-ABA (B) rekombinantní lidskou NQO1 na koncentraci 3-NBA. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření a znázorněné chyby představují směrodatné odchylky ze tří stanovení.

Rozdílná orientace 2-nitrobenzanthronu a 3-nitrobenzanthronu v aktivním centru NQO1 diktuje efektivitu jejich redukce

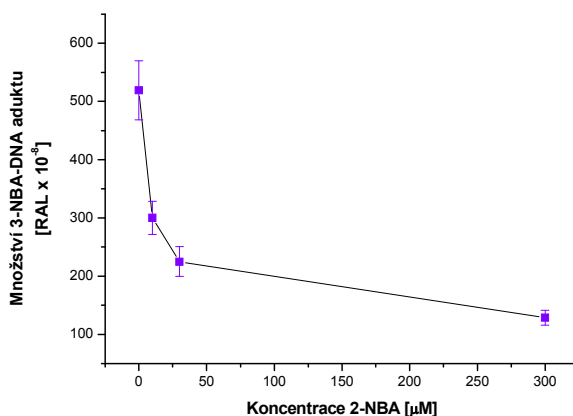
Oba izomery nitrobenzanthronu se vážou do aktivního místa NQO1 s podobnou vazebnou afinitou. Orientace obou izomerů NBA v aktivním místě NQO1 je však rozdílná (obrázek 12, str. 11), což má za následek větší vzdálenost nitro-skupiny 2-NBA k vodíku vázanému na N5 isoalloxazinového kruhu FAD než je tomu u 3-NBA. Takové prostorové uspořádání je méně příhodné pro přenos vodíku na nitro-skupinu, a tedy i pro redukci 2-NBA.



Obrázek 12 Vazebné orientace molekuly 2-NBA a 3-NBA v aktivním centru NQO1 vycházející z výpočtů molekulárního modelování. Orientace umožňují přenos vodíku z N5 isoalloxazinového kruhu FAD na nitro-skupinu 3-NBA (B_a a B_b) a 2-NBA (A_a a A_b). Dvě možné formy redukovaného isoalloxazinového kruhu (ionizovaný enolát a protonovaný enol) vázané do aktivního místa NQO1 jsou označeny indexem a a b. Oba NBA ligandy jsou orientovány paralelně k flavinové prostetické skupině. 2-NBA nebo 3-NBA jsou na obrázku znázorněny tučnými čarami, FAD kofaktor středně tučnými čarami a aminokyselinové zbytky vzdálené do 5,5 Å od ligandu tenkými linkami.

2-Nitrobenzanthron inhibuje tvorbu aduktů 3-nitrobenzanthronu s DNA

2-NBA způsobil pokles metabolické aktivace 3-NBA vedoucí k tvorbě aduktů 3-NBA aktivovaného lidskou NQO1 s DNA (*obrázek 13*). Získané výsledky naznačují, že oba izomery se vážou do aktivního místa lidské NQO1 s podobnou afinitou a soutěží o totéž vazné místo v enzymu.



Obrázek 13 Vliv 2-NBA (10, 30, 300 μM) na tvorbu aduktů 3-NBA (30 μM) aktivovaného lidskou NQO1 s DNA. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření a znázorněné chyby představují směrodatné odchylky ze tří stanovení.

Předkládaná disertační práce přináší originální vědecké výsledky. Část těchto výsledků byla již také publikována formou časopiseckých publikací v renomovaných vědeckých periodikách. Takto bylo publikováno 7 prací, které jsou součástí disertační práce jako přílohy 1-7.

Práce byla podporována grantovou agenturou České republiky (grant 303/09/0472) a grantovou agenturou Ministerstva školství a tělovýchovy České republiky (granty MSM 0021620808 a 1M0505).