

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
STUDIJNÍ PROGRAM: BIOCHEMIE
STUDIJNÍ OBOR: BIOCHEMIE



Terezie Rohlenová

Aromatické nitrosloučeniny ve složkách životního prostředí
a jejich vliv na organismy

Aromatic nitrocompounds in the environment and their effect on organisms

Bakalářská práce

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 31. 5. 2011

Terezie Rohlenová

Poděkování:

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

Práce byla vypracována jako součást řešení grantových vědeckých projektů podporovaných GAČR (P301/10/0356 a 301/09/0472) a MŠMT ČR (MSM 0021620808 a 1M0505).

Obsah:

| | |
|--|----|
| Seznam zkratk | 5 |
| Abstrakt | 8 |
| Abstract | 9 |
| 1. Úvod | 10 |
| 2. Cíl práce | 11 |
| 3. Aromatické nitrosloučeniny | 12 |
| 3.1 Proces karcinogeneze | 13 |
| 3.2 Biotransformace karcinogenů | 14 |
| 3.3 Enzymy účastnící se metabolismu nitroaromátů | 14 |
| 3.4 Významné nitroaromatické sloučeniny | 19 |
| 4 Metabolismus nitroaromátů | 28 |
| 4.1 Metabolismus 2-nitroanisolu..... | 28 |
| 4.2 Metabolismus 4-nitroanisolu..... | 34 |
| 4.3. Metabolismus nitrobenzanthronů..... | 36 |
| 4.3.1 Metabolismus 3-nitrobenzanthronu | 36 |
| 4.3.2 Metabolismus 2-nitrobenzathronu | 42 |
| 4.4 Metabolismus nitrotoluenů, dinitrotoluenů a trinitrotoluenů..... | 48 |
| 5 Závěr | 55 |
| 6 Seznam použité literatury | 58 |

Seznam použitých zkratek:

| | |
|------------|--|
| 24DNBA | kyselina 2,4-dinitrobenzoová |
| 24DNBA1c | 2,4-dinitrobenzylalkohol |
| 2,4-DNT | 2,5-dinitrotoluen |
| 24TDA | 2,4-toluendiamin |
| 2,5-DNB | 2,5-dihydroxynitrobenzen |
| 26DNBA | kyselina 2,6-dinitrobenzoová |
| 26DNBA1c | 2,6-dinitrobenzylalkohol |
| 2,6-DNB | 2,6-dihydroxynitrobenzen |
| 2,6-DNT | 2,6-dinitrotoluen |
| 26TDA | 2,6-toluendiamin |
| 2A4NBA | kyselina 2-amino-4-nitrobenzoová |
| 2A6NT | 2-amino-6-nitrotoluen |
| 2AA6AT | 2-acetylamino-6-aminotoluen |
| 2-ABA | 2-aminobenzanthron |
| 2ADNT | 2-amino-4,6-dinitrotoluen |
| 2MA | 2-methylanilin |
| 2-NA | 2-nitroanisol |
| 2-NBA | 2-nitrobenzanthron |
| 2-NP | 2-nitrofenol |
| 2-NT | 2-nitrotoluen (<i>o</i> -nitrotoluen) |
| 3-ABA | 3-aminobenzanthron |
| 3-NBA | 3-nitrobenzanthron |
| 4A2NBA | kyselina 4-amino-2-nitrobenzoová |
| 4A2NT | 4-amino-2-nitrotoluen |
| 4AA2AT | 4-acetylamino-2-aminotoluen |
| 4ADNT | 4-amino-2,6-dinitrotoluen |
| 4MA | 4-methylanilin |
| 4-NA | 4-nitroanisol |
| 4-NP | 4-nitrofenol |
| 4-NT | 4-nitrotoluen |
| Acetyl-CoA | acetylkoenzym A |

| | |
|--------------------------|---|
| CYP1A1, 2E1.. | cytochrom P450 1A1, 2E1.. |
| dA | deoxyadenosin |
| dA-C8-N-3-ABA | <i>N</i> -(2'-deoxyadenosin-8-yl)-3-aminobenzanthron |
| dA-N ⁶ -3-ABA | 2-(2'-deoxyguanosin-N ⁶ -yl)-3-aminobenzanthron |
| dAp | deoxyadenosin-3'-monofosfát |
| dG | deoxyguanosin |
| dG-C8-2MA | <i>N</i> -2'-(deoxyguanosin-8-yl)-2-methylanilin |
| dG-C8-N-3-ABA | <i>N</i> -(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthron |
| dG-N ² -3-ABA | <i>N</i> -(2'-deoxyguanosin-N ² -yl)-3-aminobenzanthron |
| dGp | deoxyguanosin-3'-monofosfát |
| DMNB | 1,2-dihydroxy-4-nitrobenzen |
| F344 | Fischer 344 |
| FAD | flavinadenindinukleotid |
| FMN | flavinmononukleotid |
| Hb | hemoglobin |
| HPLC | vysokotlaká kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography) |
| HRP | křenová peroxidasa (horseradish peroxidase) |
| LPO | laktoperoxidasa |
| MPO | myeloperoxidasa |
| MFO | systém monooxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases) |
| NAT | <i>N</i> -acetyltransferasa |
| nitro-PAH | nitroderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků |
| N-OH-2-ABA | <i>N</i> -hydroxy-2-aminobenzanthron |
| N-OH-3-ABA | <i>N</i> -hydroxy-3-aminobenzanthron |
| NQO1 | NAD(P)H:chinon-oxidoreduktasa (D,T-diaforasa) |
| PHS | prostaglandin H synthasa |
| PAPS | 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát |
| POR | NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa |
| PAH | polycyklický aromatický uhlovodík |
| SULT | sulfotransferasa |

| | |
|------|--|
| TLC | chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography) |
| TNT | 2,4,6-trinitrotoluen |
| tBHP | terc-butyl hydroperoxid |
| XO | xanthinoxidasa |

Abstrakt:

Aromatické nitrosloučeniny jsou významnými kontaminanty vyskytujícími se ve všech složkách životního prostředí. Vznikají z oxidů dusíku, který je produkován při vysokoteplotních spalovacích procesech, a z polycyklických aromatických uhlovodíků. Aromatické nitrosloučeniny jsou významnou součástí výfukových plynů automobilové dopravy, cigaretového kouře a sazí vznikajících při spalování dřeva. Většina z nich vykazuje mutagenní aktivitu v bakteriálních a savčích systémech. Mnohé z nich se podílejí na nádorových procesech. Cílovými orgány jejich karcinogenního působení jsou zejména plíce, játra a prsní žlázy.

Bakalářská práce popisuje metabolismus a karcinogenní působení některých aromatických nitrosloučenin: 2-nitroanisolu, 4-nitroanisolu, 3-nitrobenzanthronu, 2-nitrobenzanthronu, 2-nitrotoluenu, 2,4-dinitrotoluenu a 2,6-dinitrotoluenu, 2,4,6-trinitrotoluenu.

2-Nitroanisol se používá jako prekurzor k výrobě o-anisidinu, který je užíván k výrobě azobarviv a pigmentů k barvení textilu a papíru. Obě tyto sloučeniny vykazují silnou karcinogenní aktivitu na hlodavcích. 4-Nitroanisol je produktem metabolické methylace 4-nitrofenolu (*p*-nitrofenolu). 4-Nitrofenol se používá k výrobě barviv a fungicidů. A protože se akumuluje v přírodních složkách, je označen jako polutant životního prostředí. 3-Nitrobenzathron je silným karcinogenem pro hlodavce, dále způsobuje plicní nádory. Byl nalezen ve výfukových plynech automobilů a v sazích vznikajících při spalování dřeva. Jeho izomer 2-nitrobenzanthron vykazuje slabší mutagenní aktivitu než 3-nitrobenzathron. 2-Nitrotoluen je užíván k výrobě zemědělských chemikálií a azobarviv. Je prokazatelným karcinogenem pro hlodavce. Dinitrotolueny (2,4-dinitrotoluen, 2,6-dinitrotoluen) a 2,4,6-trinitrotoluen jsou používány k výrobě herbicidů a trhavin. Jsou též karcinogenní pro hlodavce.

Aktivační reakce vedoucí k tvorbě prekarcinogenních lézí v DNA je redukce nitroskupiny těchto látek. Oxidační reakce vedou většinou k jejich detoxikaci.

Klíčová slova: Aromatické nitrosloučeniny, karcinogeny, kontaminanty, metabolismus nitroaromátů, 2-nitroanisol, o-anisidin, 4-nitroanisol, 4-nitrofenol, nitrobenzanthrony, 3-nitrobenzanthron, 2-nitrobenzanthron, nitrotolueny, dinitrotolueny, trinitrotolueny, adukty s DNA, ³²P-postlabeling, nádorová onemocnění.

Abstract:

Aromatic nitro-compounds are contaminants present in environment. They are produced from gas-phase reaction of their parent compound with oxides of nitrogen. Aromatic nitro-compounds are found in an extract of exhausts from diesel and gasoline engines, in a cigarette smoke and in the soot from burning wood. The most of aromatic nitro-compounds are mutagens in bacterial and mammalian systems and the most of them are carcinogens that are connected with induction of cancer. Primarily lung followed by liver and mammary glands are target organs of their carcinogenic activity. This bachelor thesis describes a metabolisms and carcinogenic activity of several aromatic nitro-compounds: 2-nitroanisole, 4-nitroanisole, 3-nitrobenzathrone, 2-nitrobenzanthrone, 2-nitrotoluene, dinitrotoluenes, 2,4,6-trinitrotoluene.

2-Nitroanisole is used primarily as precursor in the synthesis of *o*-anisidine, an intermediate in the manufacture of many azo dyes and pigments. Both chemicals show strong carcinogenic activity to rats and mice. 4-Nitroanisole is produced by metabolic methylation of 4-nitrophenole that is used for synthesis of dyes and fungicides. 4-Nitrophenole is accumulated in environment. Therefore, it is considered to be an environmental pollutant. 3-Nitrobenzathrone is a strong carcinogen of rodents and causes lung cancer. This carcinogen is found in the exhausts from diesel engines. Mutagenic and genotoxic activity of 3-nitrobenzanthrone is much stronger than its isomer 2-nitrobenzanthrone. 2-Nitrotoluene is used for production of agriculture chemicals and azo dyes. This compound is evaluated to be a rodent carcinogen. Dinitrotoluenes and trinitrotoluenes are members of groups of herbicides and explosives. They are proved to be rodent carcinogens, too.

The reduction of nitro group of these nitro-compounds leads to activation metabolism, leading to formation of precarcinogenic lesions in DNA. Oxidative metabolism of aromatic nitro-compounds is suggested to be, in most cases, their detoxication metabolism.

Key words: Aromatic nitro-compounds, carcinogens, contaminants, metabolisms of aromatic nitro-compounds, 2-nitroanisole, *o*-anisidine, 4-nitroanisole, 4-nitrophenole, nitrobenzanthrones, 3-nitrobenzanthrone, 2-nitrobenzanthrone, nitrotoluenes, dinitrotoluenes, trinitrotoluenes, DNA adducts, ³²P-postlabelling, cancer.

1. Úvod:

Aromatické nitrosloučeniny jsou kontaminanty životního prostředí. Většina z nich byla prokázána jako karcinogeny, tedy látky spojené se vznikem nádorových onemocnění. Právě nádorová onemocnění jsou jedny z nejobtížněji léčitelných nemocí v dnešní době. Jsou příčinou úmrtí každého pátého občana ČR. Zvýšený výskyt této civilizační choroby je dán odlišným životním stylem, stravovacími návyky a vyšší kontaminací složek životního prostředí karcinogeny oproti minulosti. Karcinogeny přítomné ve složkách životního prostředí v kombinaci s momentálním stresem mohou způsobit, že imunitní systém není schopen na tuto situaci dostatečně efektivně reagovat. (<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>)

Poznání karcinogenů, které způsobují nádorová onemocnění, a metabolismu těchto karcinogenů by mohlo pomoci k úspěšnému snížení rizika vzniku nádorových onemocnění.

2. Cíl práce:

Cílem předkládané bakalářské práce bylo informovat o významných aromatických nitrosloučeninách, známých jako kontaminanty životního prostředí. Zahrnut je především jejich metabolismus a vliv na organismy.

3. Aromatické nitrosloučeniny

Od 70. let 20. stol jsou aromatické nitrosloučeniny označovány za významnou skupinu kontaminantů životního prostředí, vyskytují se totiž ve všech jeho složkách. Vznikají z oxidů dusíku, který je produkován při vysokoteplotních spalovacích procesech (spalování fosilních paliv, zpracování kovů), a z dalších vzdušných polutantů, zejména polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH). (Stiborová 2002 a)

Jsou přítomny ve výfukových plynech produkovaných automobilovou dopravou, byly také nalezeny na povrchu vzdušných prachových částic a dále v cigaretovém kouři. (Stiborová 2002 a, 2002 b, Arlt 2005, Stiborová *et al* 2004 a, 2005, 2009, 2010, Svobodová *et al* 2008, Takamura-Enya *et al* 2006) Jsou rovněž obsaženy v sazích při spalování dřeva, do organismu se tedy dostávají i grilováním a uzením potravin. (Arlt 2005)

Většina z nich vykazuje mutagenní aktivitu v bakteriálních a savčích systémech, záleží však na jejich biotransformaci a enzymech, které na ní participují. (Stiborová 2002 a, 2002 b, Takamura-Enya *et al* 2006, Stiborová *et al* 2010).

Některí zástupci nitroaromátů jsou prokazatelnými karcinogeny pro laboratorní zvířata, mezi cílové orgány jejich karcinogenního působení patří zejména játra, plíce a prsní žlázy. (Stiborová 2002 a, 2002 b) Po zvýšené expozici populace výfukovými plyny automobilové dopravy byl pozorován častý výskyt rakoviny močového měchýře, zejména u řidičů nákladních automobilů. (Anderson *et al* 1997). Velký zájem vědců vzbudil i výskyt nádorů plicní tkáně u nekuřáků, po expozici vzduchem znečištěným nitroaromáty, zejména nitroderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků (nitro-PAH). (Stiborová *et al* 2005, 2010, Arlt 2005, Arlt *et al* 2006)

Za podezřelé karcinogeny pro lidský organismus se považují 2-nitroanisol, 1-nitropyren, 4-nitropyren, 1,6-dinitropyren, 1,6-dinitropyren, 1,8-dinitropyren, 6-nitrochrysen a nitrofen. (*Eight report on carcinogens*. National Toxicology Program. U. S. Department of Health and Human Services (1998) in Stiborová, 2002 a). Dále se také uvádí 2-nitrofluoren (IARC (1989) in Stiborová 2002 a).

Dalšími potenciálními karcinogeny nebo toxickými látkami pro člověka, které jsou zmíněné v této bakalářské práci, jsou nitrotolueny, aristolochové kyseliny, 4-nitroanisol, nitrofurany a nitroimidazoly. Ze skupiny nitro-PAH jsou to nitropyreny a nitrobenzanthrony.

3.1 Proces karcinogeneze

Karcinogeneze je několikafázový proces maligní transformace nenádorové buňky v buňku nádorovou z důvodu narušení buněčné regulace buněčného růstu. Poté následuje nekontrolované dělení buňky a vznik celého klonu nádorových buněk.

Maligní transformace je vždy započata změnou v DNA (mutace DNA) příslušné buňky, vlivem vnějších nebo vnitřních faktorů. Vnější faktory jsou rozdělovány na chemické (vliv chemikálií-karcinogenů, mezi které patří také nitroaromáty), fyzikální (vliv ionizujícího záření) a virové (onkoviry). Mezi vnitřní faktory patří dědičné mutace a endogenní karcinogeny. (Stiborová 2002 a)

V bezchybně fungující buňce se nachází systém regulace exprese genů, tedy regulace transkripce a translace. Geny kódující regulační proteiny (růstové faktory, receptory, proteinkinasy, transkripční faktory), se nazývají protoonkogeny. (Klener 1996 in <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 10.3.2011). Další skupinou genů jsou tumor-supresorové geny. Jejich expresí vznikají proteiny, které v buněčné proliferaci a diferenciaci hrají významnou úlohu: udržují buňku ve fázi klidu, tedy potlačují růst. Pokud dojde k mutaci těchto genů, porucha způsobí nekontrolovaný růst buňky, a tím pádem i nádorové bujení. (Stiborová 2002 a, 2002 b).

Karcinogeny lze rozdělit podle mechanismu působení do 2 skupin - genotoxické a epigenetické. Epigenetické karcinogeny modifikují molekulu DNA nekovalentními vazbami. Jsou schopny se např. vmezeřit do struktury DNA (tvořit interkaláty) nebo způsobovat jedno- a dvou-řetězcové zlomy vlákna DNA (single- and double-strand break). Zvláštním případem je schopnost měnit strukturu DNA spojováním molekul v DNA (cross-linking), nebo vlákna DNA s proteinem.

Genotoxické karcinogeny jsou z hlediska nádorového bujení závažnější. Elektrofilní metabolit karcinogenu tvoří kovalentní vazbu s nukleofilním centrem DNA, tvoří tak adukt s DNA. (Poitier *et al* 2000, Stiborová 2002 a, 2002 b). Většinu aduktů s DNA opravný systém eliminuje, ale v některých případech, persistentní adukty způsobí trvalé mutace v důležitých genech regulujících buněčný růst. (Stiborová 2002 a, Stiborová 2002 b). V dnešní době lze genotoxické účinky karcinogenu ověřit několika metodami, které detekují vzniklé adukty s DNA. Jednou z nejčastěji používaných metod je „³²P-Postlabeling“, nebo také chromatografické metody: vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) nebo chromatografie na tenké vrstvě (TLC).

3.2 Biotransformace karcinogenů

Karcinogeny, tak jako každé xenobiotikum (řec. xenos=cizí), po vstupu do organismu prochází biotransformací. Pojmem biotransformace jsou označovány procesy a chemické reakce, které by měly vést k usnadněnému vyloučení xenobiotika z organismu, (Stiborová *et al* 2004 b), tj. vést ke vzniku polárnějších produktů (první fáze biotransformace). Většina xenobiotik je totiž hydrofobní povahy, a tak by mohly procházet membránami do buněk, kde by mohlo dojít k jejich akumulaci. První fáze biotransformace je realizována různými oxidacemi nebo redukcemi substrátu, ve druhé fázi dochází ke konjugaci s endogenní hydrofilní sloučeninou (aktivním acetátem, aktivním sulfátem, kyselinou glukoronovou či glutathionem), a tak dojde ke zvýšení polaritě xenobiotika, což usnadňuje jeho vyloučení z organismu přirozenou cestou (močí, žlučí). Tato cesta se nazývá detoxikační.

V určitých případech však může biotransformací dojít k „aktivaci“ xenobiotika, které se tak stane toxickým, mutagenním nebo karcinogenním pro organismus. (Stiborová *et al* 1999).

3.3 Enzymy účastnící se metabolismu nitroaromátů

Nitroaromáty jsou v první fázi biotransformace metabolizovány enzymy, které jsou nejčastěji lokalizovány v membráně endoplasmatického retikula, nebo jsou přítomny v cytoplazmě buněk. Frakce vznikající z endoplasmatického retikula po homogenizaci buňky se nazývá se mikrosomy (mikrosomální frakce). V této frakci jsou přítomny cytochromy P 450, které jsou součástí systému monooxygenas se smíšenou funkcí (z angl. „mixed function oxidases“ = MFO). Dalšími enzymy schopnými oxidovat nitroaromatické sloučeniny jsou peroxidasy.

Z enzymů nacházejících se v cytoplasmě hrají v metabolismu nitroaromatických sloučenin důležitou úlohu především cytoplasmatické reduktasy. Patří mezi ně xanthinoxidasa (XO), NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (NQO1) a aldehydoxidasa.

Konjugaci nitroaromátů (přesněji jejich metabolitů z první fáze biotransformace) s endogenními sloučeninami (aktivním sulfátem nebo acetátem) katalyzují zejména sulfotransferasy (SULT) a N-acetyltransferasy (NAT). (Stiborová *et al* 2004 b)

3.3.1. Systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO)

MFO je klíčovým enzymovým systémem první fáze biotransformace nitroaromatických sloučenin. Katalyzuje rozmanité oxidační, popř. redukční reakce. MFO je lokalizován u eukaryotických buněk na vnější straně hladkého i hrubého endoplasmatického retikula, nebo v membráně mitochondrií. Skládá se alespoň z 3 složek: hemoproteinu cytochromu P450, jeho reduktasy - NADPH:cytochrom P450 reduktasy (nebo také NADH:cytochrom b₅ reduktasy) a membrány endoplasmatického retikula. MFO systém se vyskytuje v lidském organismu především v jaterních buňkách, v menším množství také v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku a nadledvinkách. (Stiborová *et al* 1999, Stiborová *et al* 2004 b)

3.3.1.1 NADPH:cytochrom P450 reduktasa

NADPH:cytochrom P450 reduktasa je membránově vázaný enzym, který v MFO systému katalyzuje přenos elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromu P450 (NADH:cytochrom b₅ reduktasa katalyzuje přenos elektronů z NADH na cytochrom b₅). NADPH:CYP reduktasa má dvě funkční domény: hydrofobní N-terminální, kterou je zakotvena k membráně a hydrofilní C-terminální, která obsahuje flavinové kofaktory FMN a FAD. FAD-vazebná doména je zodpovědná za vazbu NADPH. FMN-vazebná doména je zodpovědná za přenos elektronů na cytochrom P450. Interakce mezi NADPH:cytochrom P450 reduktasou a cytochromem P450 jsou především elektrostatické povahy (kladně nabitě aminokyseliny cytochromu P450 interagují se záporně nabitými aminokyselinami NADPH:cytochrom P450 reduktasy) a hydrofobní povahy (interakce nepolárních aminokyselin). Akceptorem elektronů (resp. atomů vodíku) od NADPH je FAD, následně FAD předá elektrony FMN a nakonec je akceptorem elektronů cytochrom P450. (Stiborová *et al* 2004 b)

3.3.1.2 Cytochrom P450

Cytochrom P450 je hemoprotein, jehož porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je vázán v proteinové části enzymu hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím SH (sulfhydrylové) skupiny cysteinu (pátého ligandu železa). Atom železa je centrálním atomem porfyrinového skeletu, jehož šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody nebo inertní ligand (např. aminokyselina). (Stiborová *et al* 2004 b)

Cytochrom P450 se vyskytuje v různých formách (izoformách), které jsou řazeny do rodin a podrodin dle homologie primární struktury proteinové části enzymu. Nyní je známo 500 izoform cytochromů P450. V metabolismu aromatických nitrosloúčenin nejčastěji participují cytochromy P450 1A1, 1A2, 3A4, 2E1 a další.

Cytochrom P450 mění svoji konformaci v závislosti na spinovém stavu atomu železa v porfyrinovém skeletu. Železo existuje ve dvou spinových stavech: v nízkospinovém stavu se nachází z důvodu jeho hexakoordinace, atom železa leží v rovině protoporfyrinu IX. Druhý stav železa je vysokospinový (má více nespárovaných elektronů), nachází se v pentakoordinačním stavu, a protože je sulfhydrylovou skupinou cysteinu přitahován, nachází se pod rovinou protoporfyrinového skeletu. (Stiborová *et al* 2004 b)

3.3.1.3 Obecný mechanismus monooxygenasové reakce katalyzované MFO

Obecný mechanismus monooxygenasové reakce katalyzované MFO shrnuje rovnice (RH symbolizuje substrát a ROH produkt reakce):



a probíhá v několika krocích (obr 1):

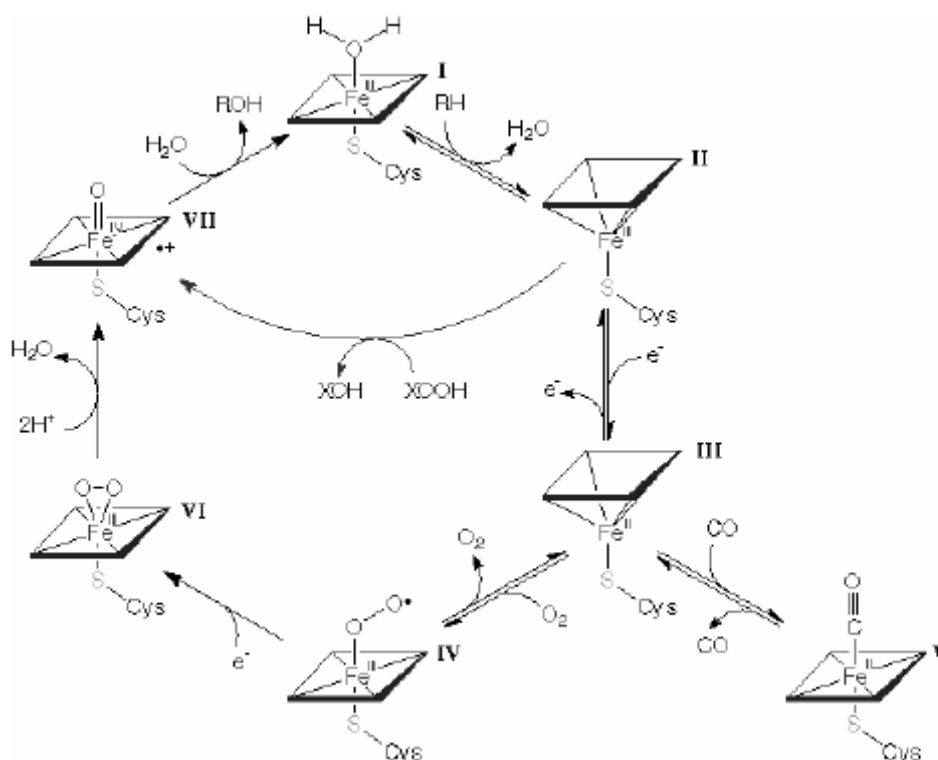
V klidovém stavu je atom železa hexakoordinován a je ve ferri formě, šestým ligandem je atom kyslíku vody. Po vstupu substrátu (RH) do aktivního místa enzymu je šestý ligand vytlačen, a tak dochází ke změně konformace enzymu, zároveň atom železa přechází do pentakoordinovaného stavu. Tato konformační změna se projeví i změnou spektrálních vlastností cytochromu P450.

Vazba substrátu na enzym umožní redukci atomu železa z ferri na ferro formu, přičemž železo zůstává pentakoordinováno. Redukce je zprostředkována NADPH: cytochrom P450 reduktasou. K centrálnímu atomu železa (v Fe^{2+} formě) se může navázat oxid uhelnatý, který znemožní vazbu s kyslíkem. (obr 1 V.)

Navázáním molekulárního kyslíku jako šestého ligandu vzniká ferri-superoxidový anion, přičemž ion železa mění svůj stav z vysokospinového na nízkospinový. Tento komplex z důvodu nestálosti je dále redukován NADPH: cytochrom P450 reduktasou za vzniku ferri-peroxidového aniontu. Pokud tato redukce neproběhne dostatečně rychle (z důvodu nedostatečné rychlosti doručení elektronu z NADPH systémem FAD a FMN NADPH: cytochrom P450 reduktasy akceptoru cytochromu P450), komplex se rozpadá a uvolňuje se peroxid vodíku.

Pokud redukce proběhne s dostatečnou rychlostí, dojde ke štěpení O-O peroxidového aniontu, přitom je jeden atom kyslíku redukován a za přijmutí dvou vodíků tvoří vodu. Druhý atom kyslíku zůstane připoután k iontu železa a tvoří ferrioxenový komplex. Tento reaktivní kyslík je schopen atakovat vodík substrátu za vzniku hydroxylového radikálu, přičemž ze substrátu také vznikl radikál. Tyto dva radikály koordinují za vzniku hydroxyderivátu substrátu.

V přítomnosti oxidačních činidel (např. organické peroxidy) může z komplexu II (obr 1) vzniknout stav VII. Vazba peroxidu není závislá na přítomnosti substrátu. Tato schopnost cytochromu P450 využívat organických peroxidů je označována jako peroxidasová aktivita. (Stiborová *et al* 2004 b)



obr 1: Schéma reakčního cyklu cytochromu P450. (převzato z práce Stiborové *et al* 2004 b)

3.3.2 Peroxidasy

Peroxidasy jsou enzymy schopné redukovat peroxid vodíku, nebo organický peroxid, za současné oxidace jiné sloučeniny (endogenní látky nebo xenobiotika). Mohou také katalyzovat halogenaci, dehalogenaci, degradaci ligninu, oxidační štěpení azoskupiny nebo dehydrogenaci vedoucí k vzniku radikálu.

Peroxidasy se dělí do několika skupin, z nichž nejznámější jsou hemové peroxidasy. Hemové peroxidasy jsou hemoglykoproteiny se skeletem protoporphyrinu IX. Roli centrálního atomu hraje většinou železo s oxidačním číslem III, které se nachází v pentakoordinovaném stavu, přičemž pátým ligandem je dusík histidylového zbytku.

Některé druhy peroxidas mají pozměněný porfyrinový skelet, nebo tento skelet dokonce úplně chybí. Dále na místě centrálního atomu mohou být ionty V^{5+} nebo Mn^{2+} . (Stiborová *et al* 2004 b)

Nejznámějšími peroxidasami, které jsou schopné katalyzovat metabolismus xenobiotik jsou křenová peroxidasa (HRP), laktoperoxidasa (LPO), myeloperoxidasa (MPO) a prostaglandin H synthasa (PHS).

MPO a PHS jsou u člověka přítomny zejména v plicích, kde MPO je exprimována v neutrofilních granulocytech, které jsou aktivovány při primární obranné reakci organismu. PHS je přítomna i v močových cestách a LPO je exprimována v mléčných žlázách. (Stiborová *et al* 2005)

3.3.3 Xanthinoxidasa

Xanthinoxidasa je flavoprotein, obsahující ionty molybdenu a železa. V organismech se účastní odbourávání purinových bází, katalyzuje oxidaci hypoxanthinu na xanthin, dále katalyzuje oxidační přeměnu aldehydů na kyseliny. Xanthinoxidasa se také podílí na katalýze redukčních reakcí nitroaromátů, zejména 2-nitroanisolu, 3-nitrobenzanthronu, nitrofenolů a nitrotoluenů. Xanthinoxidasa je přítomna v cytoplazmě zejména jaterních buněk. (Stiborová *et al* 2004 b).

3.3.4. NAD(P)H:chinon-oxidoreduktasa (D,T-diaforasa)

NAD(P)H:chinon-oxidoreduktasa (NQO1) je flavoprotein, který nejčastěji katalyzuje dvouelektronové redukce chinonů a chinoidních sloučenin na hydrochinony. Donorem elektronů pro redukci využívá NADPH i NADH. NQO1 také participuje na redukčních reakcích nitroaromátů a azobarviv. Je přítomna v cytoplazmě jaterních buněk, byla nalezena i v plicích, tlustém střevě a dalších orgánech. (Stiborová *et al* 2004 b)

3.3.5. Enzymy konjugační fáze biotransformace xenobiotik

Jak již bylo řečeno, v druhé-konjugační fázi biotransformace xenobiotik jsou jejich metabolity konjugovány s hydrofilní endogenní sloučeninou. Endogenní sloučeninou, na kterou se váží metabolity nitroaromátů, bývá aktivní acetát nebo sulfát.

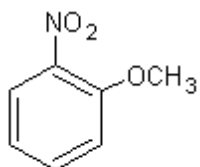
Konjugáty vznikají nejčastěji reakcí aktivního sulfátu s N-hydroxylovanými deriváty aromatických nitrosloúčenin účinkem cytoplazmatického enzymu **sulfotransferasy** (SULT). Sulfát musí být aktivován na 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS).

N-acetyltransferasy (NAT) katalyzují přenos acetátu na nitrosloúčeninu, donorem acetátu a zároveň kofaktorem enzymu bývá Acetyl-CoA. (<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 10.3. 2011)

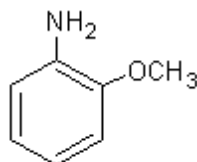
3.4 Významné nitroaromatické sloučeniny

3.4.1 2-Nitroanisol (*o*-nitroanisol, 2-methoxynitrobenzen)

2-Nitroanisol (obr. 2) je využíván jako prekurzor pro přípravu a výrobu *o*-anisidinu (2-methoxyanilin, 2-anisidin) (obr. 2), který je užíván k výrobě azobarviv a pigmentů k barvení textilu a papíru. (Svobodová *et al* 2008, 2010, Stiborová 2002 a, 2002 b, Stiborová *et al* 2004 a, 2009, Mikšanová 2004, Naiman *et al* 2008, Rýdlová *et al* 2005). *o*-Anisidin je také obsažen v cigaretovém kouři. (Naiman *et al* 2008, Stiborová *et al* 2009). *o*-Anisidin i 2-nitroanisol vykazují silnou karcinogenní aktivitu pro hlodavce, a proto jsou i potencionálními karcinogeny pro člověka. (Rýdlová *et al* 2005)



2-nitroanisol

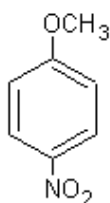


2-ainisidin

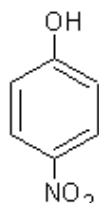
obr 2: Strukturní vzorec 2-nitroanisolu a 2-anisidinu.

3.4.2 4-Nitroanisol (*p*-nitroanisol)

4-Nitroanisol (obr. 3) je produktem metabolické methylace 4-nitrofenolu (*p*-nitrofenolu). 4-Nitrofenol (obr. 3) se používá k výrobě barviv a v kožedělném průmyslu k ochraně kůže vzhledem ke svým fungicidním účinkům. Dále se využívá ve farmaceutickém, ocelářském a textilním průmyslu. (U. S. Department of Health and Human Services (1992) in Williamson *et al* 1995). 4-Nitrofenol je produktem degradace organických insekticidů a akaricidů, zejména parathionu a methylparathionu, které jsou užívány k ochraně obilovin a dalších zemědělských plodin. (Teramoto *et al* 2004, Williamson *et al* 1995) Jeho přítomnost byla detekována v říční a mořské vodě a také v půdě. Vzhledem k jeho akumulaci ve složkách životního prostředí je označován jako polutant životního prostředí. (Williamson *et al* 1995).



4-nitroanisol



4-nitrofenol

obr 3: Strukturní vzorec 4-nitroanisolu a 4-nitrofenolu

3.4.3 Nitroderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků (nitro-PAH)

Nitro-PAH jsou důležitou skupinou nitroaromátů. Tvoří značný podíl vzdušných polutantů, byly detekovány: ve výfukových plynech vznikajících automobilovou dopravou, při spalování fosilních paliv, vznikají však také reakcí oxidů dusíku s polycyklickými aromatickými uhlovodíky. (Arlt *et al* 2006, 2007, Arlt 2005, Stiborová *et al* 2005, 2010,

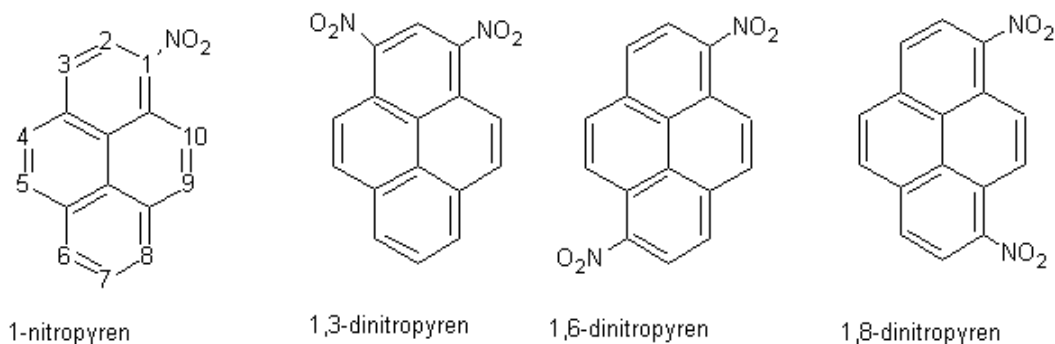
Reynisson *et al* 2008, Umbuzeiro *et al* 2008) Vznikají i při grilování potravin a byly detekovány v říčních sedimentech. (Arlt 2005)

Některé skupiny nitro-PAH jsou prokazatelné mutageny v savčích a bakteriálních systémech. Ve většině případů jsou nitroskupiny nitro-PAH redukovány na aromatické aminy, které jsou spojovány s výskytem karcinomů močového měchýře u člověka a nádory plic u experimentálních zvířat. (Smith *et al* 1995)

Koncentrace nitro-PAH v ovzduší byla zjištěna, že je nižší, oproti koncentraci nesubstituovaných PAH. Nitro-PAH však vykazují silnější mutagenní účinek na bakteriální a savčí buňky oproti nesubstituovaným PAH. (Arlt *et al* 2007, Reynisson *et al* 2008, Umbuzeiro *et al* 2008) Uváděné průměrné množství nitro-PAH ve vzduchu je 1 ng/m^3 . Koncentrace těchto látek v ovzduší však záleží na ročním období, způsobu vytápění ve sledované oblasti a na druhu a počtu vozidel v dopravě kontaminujících svými zplodinami ovzduší. (Arlt 2005)

3.4.3.1 Nitropyreny, dinitropyreny

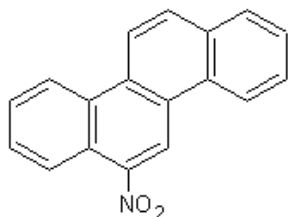
Nitropyreny jsou obsaženy ve výfukových plynech dieselových a benzínových motorů. Jsou také adsorbovány na vzdušných částicích. (Yamazaki *et al* 2000, Murata *et al* 2004). Ze skupiny nitropyrenů, má 1-nitropyren (obr. 4) největší mutagenní aktivitu, která byla prokázána v bakteriálních systémech, ale i v lidském organismu. V savčím systému je spojován se vznikem nádoru plic. (Stiborová 2002 a, Murata *et al* 2004). V automobilovém průmyslu se vyskytují také dinitropyreny, substituované v polohách 1,3, 1,6 a 1,8. 1,6-Dinitropyren (obr. 4) a 1,8-dinitropyren (obr. 4) jsou podezřelými karcinogeny pro experimentální zvířata a tvoří adukty s DNA hlodavců. Participují také na vývoji nádorů plic. Dinitropyreny jsou u hlodavců také spojovány s výskytem leukémie. 1,3-Dinitropyren (obr. 4) za karcinogen není považován. (Murata *et al* 2004)



obr 4: Strukturální vzorce nitropyrenu a dinitropyrenů.

3.4.3.2 6-Nitrochrysen

6-Nitrochrysen (obr. 5) je vzdušný polutant, který byl detekován ve výfukových plynech automobilů. (Yamazaki *et al* 2000). V řadě prací je uvedeno, že 6-nitrochrysen je spojován se vznikem nádorů prsních žláz potkanů, plic a kůže myší. Dále je prokázáno, že tvoří genotoxické metabolity v lidských buňkách jater a plic. (El-Bayoumy *et al* 2002). Další studie také prokazují, že 6-nitrochrysen tvoří po aktivaci adukty s lidským hemoglobinem. (Zwirner-Baier and Neumann 1999 in El-Bayoumy *et al* 2002).



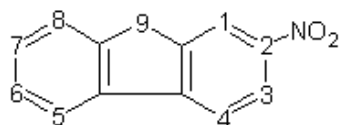
6-nitrochrysen

obr 5: Strukturní vzorec 6-nitrochrysenu

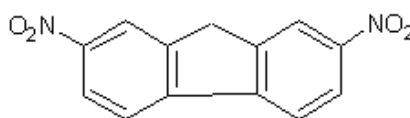
3.4.3.3 2-Nitrofluoren, 2,7- dinitrofluoren, 9-oxoderiváty nitrofluorenů

2-nitrofluoren (obr. 6) je hojně zastoupenou složkou výfukových plynů automobilové dopravy. Jeho koncentrace v ovzduší, zvláště v městských oblastech, je okolo 310-5220 pg/m³. Vysoké hodnoty jeho koncentrace bývají zjištěny obvykle v zimním ročním období. (Malejka-Giganti *et al* 2008).

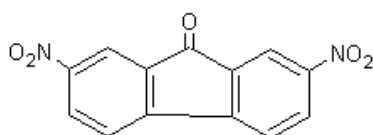
2,7-dinitrofluoren a 9-oxo-2,7-dinitrofluoren (obr. 6) se také vyskytují ve výfukových plynech automobilů. Jejich metabolity vytváří adukty s DNA buněk prsních žláz samic potkanů. (Ritter *et al* 2002, Malejka-Giganti *et al* 2008)



2-nitrofluoren



2,7-dinitrofluoren

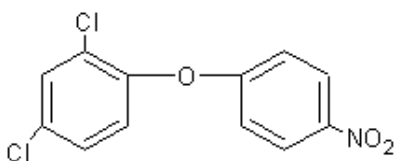


9-oxo-2,7-dinitrofluoren

Obr 6: Strukturní vzorce 2-nitrofluorenu, 2,7-dinitrofluorenu a 9-oxo-2,7-dinitrofluorenu

3.4.3.4 Nitrofen [(2,4-dichlorfenyl)(4-nitrofenyl)ether]

Nitrofen (obr. 7) se dříve využíval jako herbicid k ochraně kulturních plodin (rýže, kvěťák, cibule, česnek atd). Později pak byly zjištěny mutagenní účinky vůči laboratorním zvířatům a dále jeho teratogenní účinky. Další toxické efekty byly prokázány na myších, u nichž byl detekován vývoj karcinomů štítné žlázy, jater a cév. (Stiborová 2002 a, Glatt *et al* 2004)

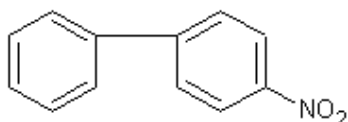


(2,4-dichlorfenyl)(4-nitrofenyl)ether
(nitrofen)

obr 7: Strukturální vzorec nitrofenu

3.4.3.5 4-Nitrobifenyl

4-Nitrobifenyl (obr. 8) a jeho redukční metabolit 4-aminobifenyl jsou průmyslově využívané chemikálie. 4-Nitrobifenyl byl první nitroaromatickou sloučeninou, která byla označena jako prokazatelný karcinogen močového měchýře v lidském organismu. (S. Ning *et al* 1997)



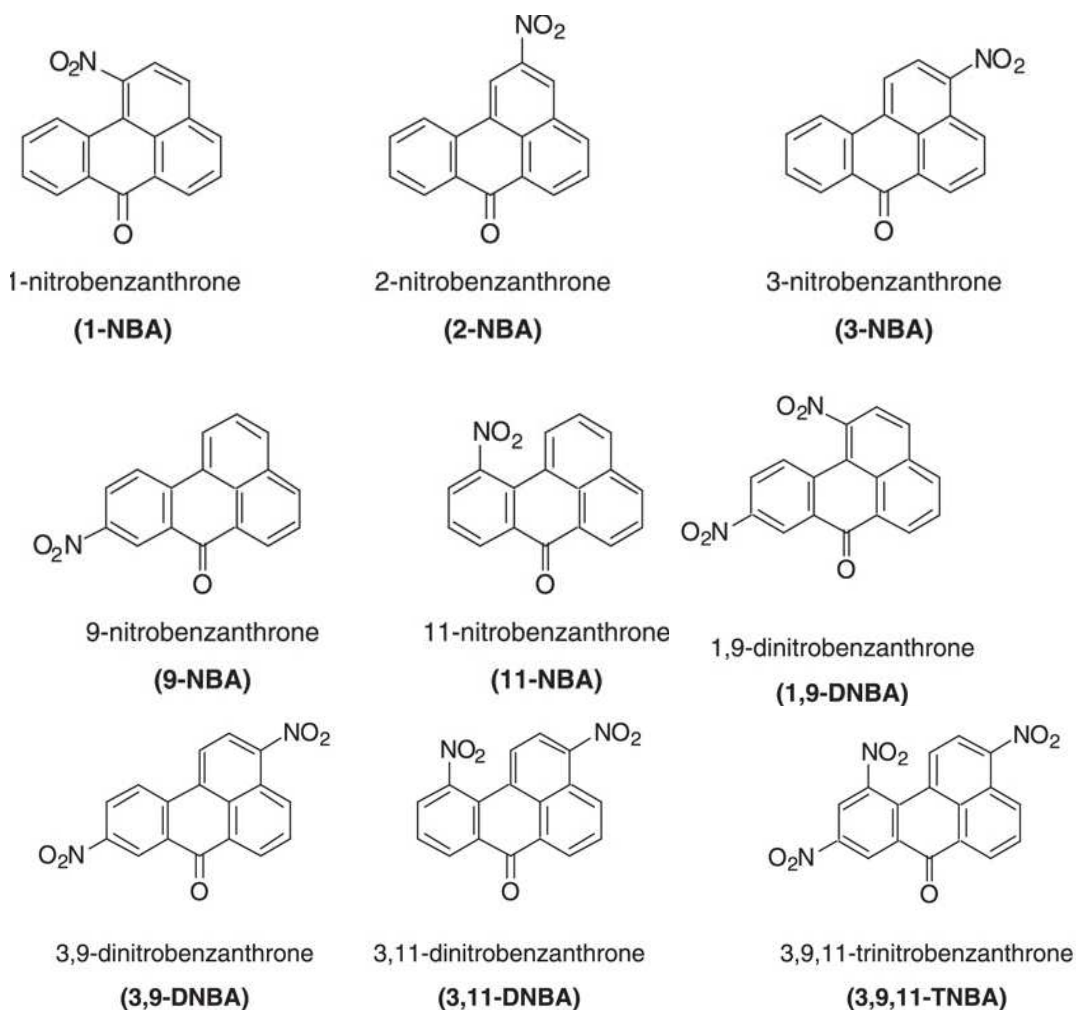
4-nitrobifenyl

obr 8: Strukturální vzorec 4-nitrobifenyly

3.4.3.6 Nitrobenzanthrony

Nitrobenzanthrony (obr. 9) byly objeveny ve výfukových plynech automobilů a na povrchu prachových částic ve vzduchu. Vznikají také v atmosféře reakcí PAH s oxidy dusíku. (Stiborová 2002 a, 2002 b, Arlt 2005, Arlt *et al* 2006, 2007, Takamura-Enya *et al* 2006, Mizerovská *et al* 2008, Stiborová *et al* 2005, 2010, Svobodová *et al* 2007, Reynisson *et al* 2008, Umbuzeiro *et al* 2008). V Amesově testu byla testována jejich mutagenní aktivita. Některé nitrobenzanthrony nevykazovaly téměř žádnou mutagenní aktivitu (11-NBA), a některé naopak vykazovaly velmi silnou (3-NBA, 9-NBA). (Takamura-Enya *et al*

2006) Z hlediska metabolismu, jsou dosud prozkoumány metabolické přeměny 3-nitrobenzanthronu (3-NBA) a jeho izomeru 2-nitrobenzanthronu (2-NBA).



obr 9: Strukturní vzorce nitrobenzanthronů, dinitrobenzanthronů a trinitrobenzanthronů.
(Převzato z Takamura-Enya *et al* 2006)

3-Nitrobenzanthron (3-NBA), (3-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-one)

3-Nitrobenzanthron (obr. 9) vzniká v atmosféře reakcí benzanthronu s oxidy dusíku v přítomnosti ozonu. Byl nalezen ve výfukových plynech automobilů, v sazích a kouři vznikajícím při spalování dřeva. Do organismu se také dostává konzumací uzenin a grilovaných potravin. 3-NBA je silným karcinogenem pro hlodavce, způsobuje vývoj nádorů plic. Je potencionálním karcinogenem i pro člověka. (Arlt 2005) Aduky s DNA vzniklé jeho aktivací *in vivo* byly nalezeny zejména v plicích, ledvinách, slinivce břišní, tlustém střevě a játrech potkana. (Arlt *et al* 2007) Jeho koncentrace v ovzduší se pohybuje od 0,6 do 6,6 ppm, tedy denně člověk vdechne 90 pg 3-NBA. (Nagy *et al* 2005, Nagy *et al* 2007) Majoritním produktem redukčního aktivačního metabolismu 3-NBA je 3-

aminobenzanthron (3-ABA). 3-ABA není pouze metabolitem 3-NBA, ale využívá se i v průmyslu jako barvivo mikroporózních polyethylenových filmů a textilie. (Arlt 2005). Tato sloučenina byla objevena v moči dělníků solných dolů, kteří byli vystaveni působení výfukových plynů. Proto lze tuto látku využívat jako marker pro detekci expozice organismu 3-NBA. (Arlt 2005, Arlt *et al* 2006)

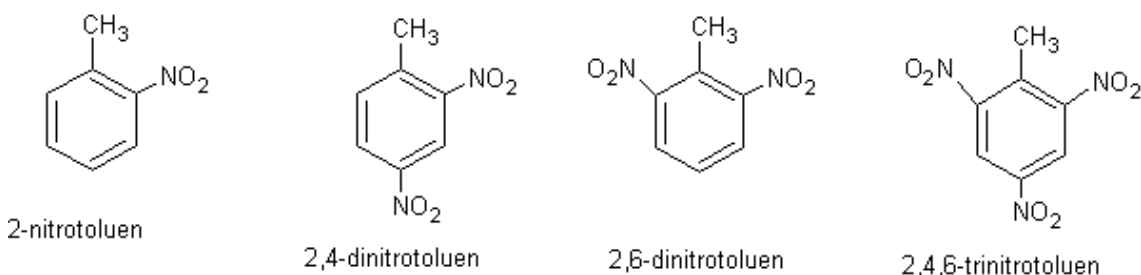
Jeho izomer 2-nitrobenzanthron (2-NBA) (obr. 9) vzniká zejména v atmosféře, byl také nalezen ve výfukových plynech automobilové dopravy. V několika studiích bylo prokázáno, že koncentrace 2-NBA v atmosféře je až 70x vyšší než koncentrace 3-NBA, zatímco jeho genotoxicita je jen třetinová oproti 3-NBA. (Arlt *et al* 2007, Nagy *et al* 2007). 2-NBA je slabým mutagenem a jeho metabolity tvoří malá množství aduktů s DNA zejména v plicích a játrech potkana. (Arlt *et al* 2007)

3.4.4 Nitrotolueny

Nitrotolueny a dinitrotolueny jsou důležitými meziproducty chemického průmyslu. Dinitrotolueny jsou používány k výrobě polyuretanových pěn, herbicidů a trhavin, 2,4,6-trinitrotoluen je produkován pro vojenský průmysl jako výbušnina. (Sabbioni *et al* 2006)

2-Nitrotoluen (obr. 10) je užíván k výrobě zemědělských chemikálií a azobarviv, je užíván i v gumárenském průmyslu. Byl detekován v říční a pitné vodě. (Jones *et al* 2003).

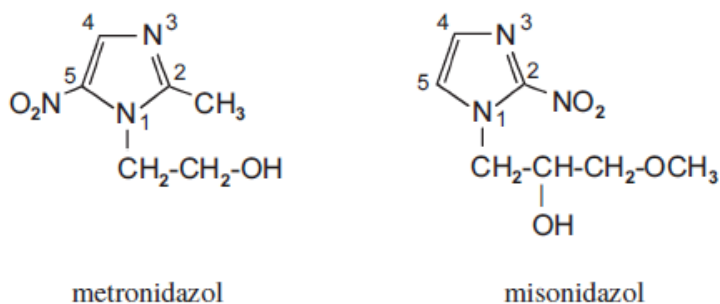
U 2-nitrotolueny (*o*-nitrotolueny), 2,6-dinitrotolueny, 2,4-dinitrotolueny a 2,4,6-trinitrotolueny (obr. 10) byly prokázány karcinogenní účinky na laboratorní zvířata a jsou potenciálními karcinogeny i pro lidský organismus. (Sabbioni *et al* 2006) Chronická expozice 2,4-dinitrotoluenem způsobuje adenomy, fibromy a karcinomy ledvin, jater a prsních žláz potkana. (Ishaque *et al* 2005, Harth *et al* 2005)



obr 10: Strukturální vzorce 2-nitrotolueny, 2,4-dinitrotolueny, 2,6-dinitrotolueny, 2,4,6-trinitrotolueny.

3.4.5 Nitrofurany a nitroimidazoly

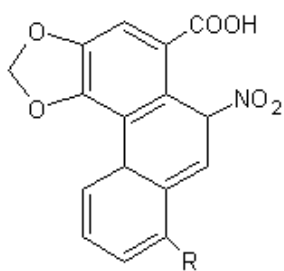
Nitrofurany a nitroimidazoly jsou v medicíně využívány vzhledem ke svým antibakteriálním účinkům. 5-Nitroimidazoly (např. metronidazol (obr. 11)) jsou účinné proti *Trichomonas vaginalis*. Misonidazol (2-nitroimidazol) (obr. 11) se využívá ke zvýšení účinků radiační chemoterapie. Nitroimidazoly vykazují v bakteriálních testech mutagenní aktivitu, avšak v savčích systémech tato aktivita nebyla příliš výrazná (Stiborová 2002 a).



Obr 11: Strukturální vzorce nitroimidazolů. (převzato z práce Stiborové 2002 a)

3.4.6 Aristolochové kyseliny

Aristolochové kyseliny (obr. 12) jsou přírodní látky vyskytující se v rostlinách rodu *Aristolochia*. Aristolochové kyseliny byly užívány ve farmaceutickém průmyslu pro jejich protizánětlivé účinky. Byly nalezeny i jako součást směsi čínských bylin, které užívaly ženy usilující o redukci tělesné hmotnosti. Byla však zjištěna jejich nefrotoxicita, a dále i karcinogenní účinky. U žen užívajících čínské byliny se objevil zvláštní typ nefropatie označována jako „Chinese herb nephropaty“. Mezi další projevy toxicity aristolochových kyselin patří vývoj nádorů močových cest a poškození srdce. Později bylo zjištěno, že aristolochové kyseliny tvoří kovalentní adukty s DNA, které jsou za iniciaci nádorových procesů zodpovědné. (Stiborová 2000). Aristolochové kyseliny jsou spojovány také s vývojem dalšího typu nefropatie, tzv. Balkánské endemické nefropatie. (Stiborová *et al* 2008)



Aristolochová kyselina I: R= OCH₃

Aristolochová kyselina II: R=H

Obr 12: Strukturní vzorce aristolochových kyselin

4 Metabolismus nitroaromátů

V další části práce jsme se zabývaly informacemi o metabolismu některých nitroaromátů. Poznatky o enzymové katalýze jednotlivých drah metabolismu a o identifikaci produktů metabolismu nitroaromátů byly získány jak z experimentů *in vitro* (Svobodová *et al* 2010, Svobodová *et al* 2008, Stiborová *et al* 2004 a, Stiborová *et al* 2002), tak i *in vivo* (Arlt *et al* 2007, Nagy *et al* 2005, Nagy *et al* 2007). Pro výzkum metabolismu nitroaromátů za podmínek *in vivo* se nejčastěji používají jako experimentální modely potkani (kmeny Wistar (Arlt *et al* 2007), F344 (Nagy *et al* 2005, Dunnick *et al* 2003) a další), ale také králíci a myši (Dunnick *et al* 2003).

4.1 Metabolismus 2-nitroanisolu

Jak je již zmíněno v předchozí kapitole, 2-nitroanisol (2-NA) se využívá jako prekurzor pro výrobu průmyslově využívané látky 2-anisidinu. 2-anisidin je produktem redukce 2-NA. Zájem vědců o tyto sloučeniny vzbudila havárie v německé chemické firmě Hoechst v roce 1993, spojená s rozsáhlým únikem 2-NA. Ten způsobil atopické dermatitidy u dětí žijících poblíž místa havárie. U požárníků zasahujících v místě havárie došlo k poškození DNA, došlo ke vzniku jednořetězcových a dvouřetězcových zlomů v DNA. Toto zjištění nasvědčovalo tomu, že 2-NA je karcinogenem epigenetickým. Po 3 měsících od havárie se stav DNA požárníků vrátil do normálního stavu, díky opravám poškozené DNA. (Stiborová 2002 a, Stiborová *et al* 2004 a, Svobodová *et al* 2010, Mikšanová *et al* 2004).

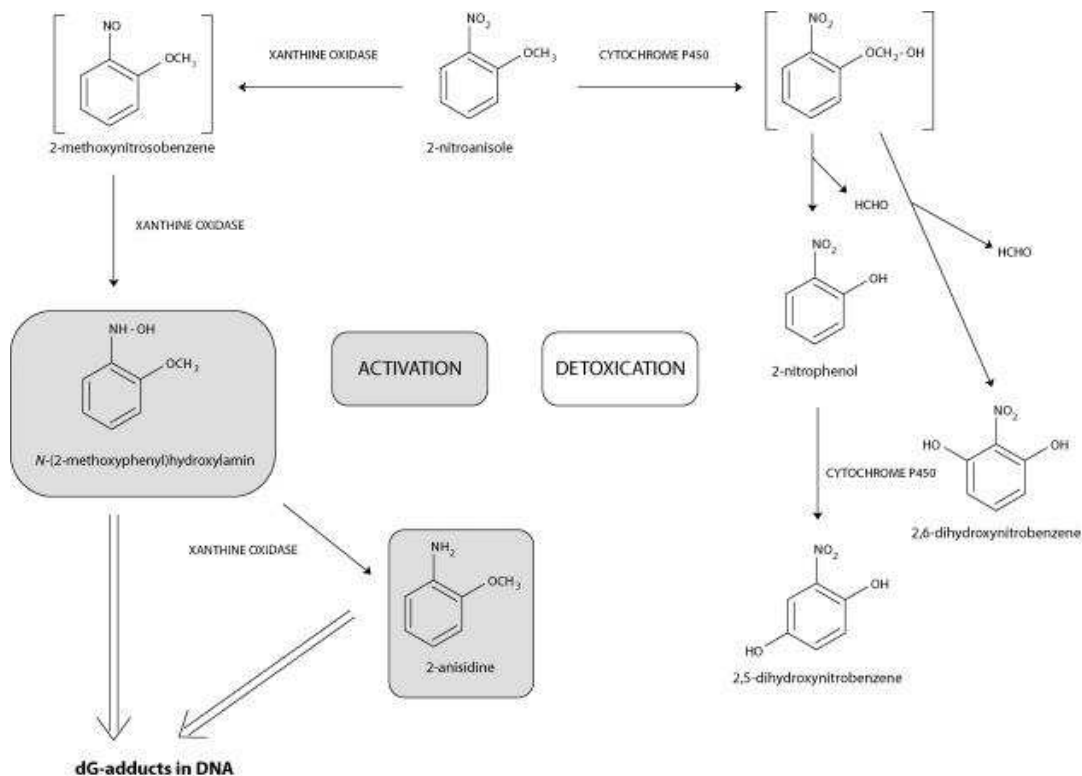
Později však bylo zjištěno, že 2-NA biotransformací v organismu vytváří i metabolity, které vytváří adukty s DNA. Nalezeny byly i adukty 2-NA s hemoglobinem. Prokázán tedy byl i genotoxický charakter 2-NA. (Stiborová 2002 a, Stiborová *et al* 2004 a, Naiman *et al* 2008)

V experimentech využívajících experimentální zvířecí modely bylo zjištěno, že 2-nitroanisol a 2-anisidin způsobují neoplastickou transformaci v močovém měchýři, v menší míře slezině, játrech a ledvinách potkana. Dále je 2-NA spojován se vznikem anémie, která je charakterizována zvýšením koncentrace methemoglobinu v krvi a destrukcí erytrocytů. (Stiborová *et al* 2004 a, 2009, Svobodová 2010, Mikšanová *et al* 2004, Naiman *et al* 2008).

V Amesově testu je 2-NA slabým mutagenem pro kmen *Salmonella typhimurium* T100 (Mikšanová *et al* 2004), avšak u dalších kmenů TA 97, TA 98, TA 1535, TA 1537

mutagení aktivitu neprojevil. (Stiborová 2002 a) 2-Anisidin je prokazatelným karcinogenem pro potkana (kmen F344) a myš (kmen B6C3F1). (Stiborová et al 2002, Naiman *et al* 2008)

Schéma metabolismu 2-NA jak aktivační, tak detoxikační, zobrazuje obr 13.



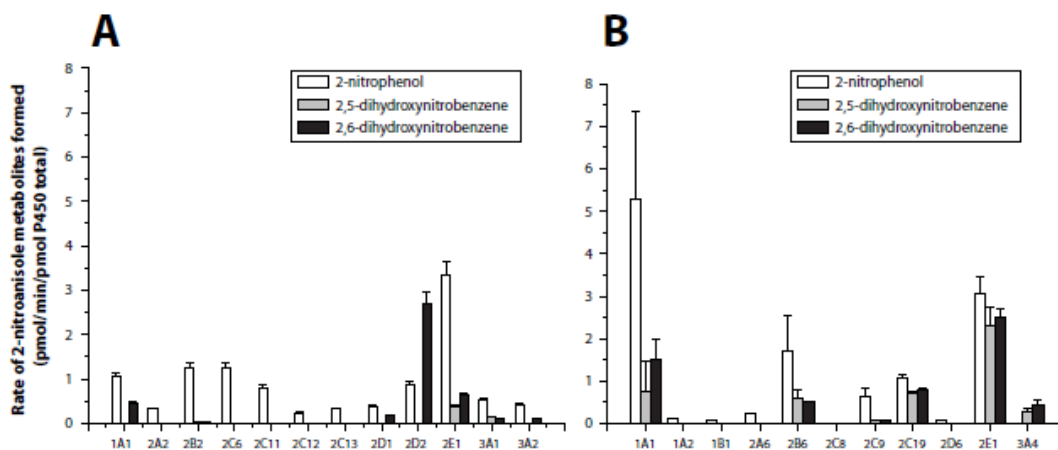
obr 13: Metabolismus 2-NA. Xanthinoxidasa katalyzuje aktivační redukci 2-nitroanisolu na *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin a dále na 2-anisidin. (levá část obrázku). Cytochrom P450 katalyzuje oxidační přeměny 2-nitroanisolu na 2-nitrofenol a dihydroxynitrobenzeny. (pravá část) (převzato z práce Svobodové *et al* 2010)

4.1.1 Oxidační metabolismus 2-nitroanisolu

Jaterní mikrosomy oxidují 2-NA na tři metabolity: na majoritní 2-nitrofenol (2-NP) a minoritní metabolity 2,6-dihydroxynitrobenzen (2,6-DNB) a 2,5-dihydroxynitrobenzen (2,5-DNB) (obr. 13). Bylo zjištěno, že 2,5-DNB nevzniká z parentální molekuly 2-NA, vzniká však hydroxylací aromatického kruhu 2-NP. (Svobodová *et al* 2010)

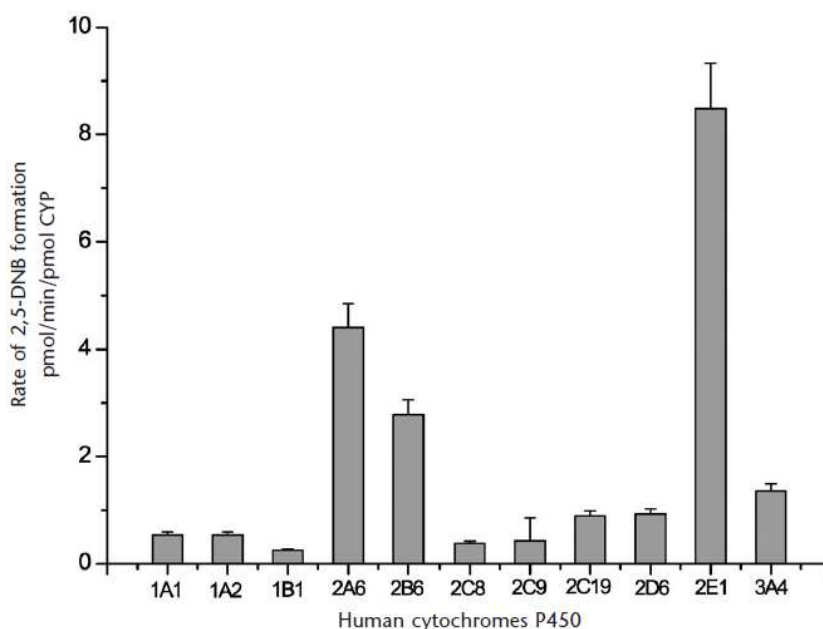
Nejúčinněji na oxidaci 2-NA participuje lidský i potkaní cytochrom P450 2E1 (CYP2E1). Z lidských cytochromů P450 nejefektivněji katalyzuje oxidaci 2-NA i CYP1A1, dále pak CYP 2B6 a 2C19. (obr. 14, str. 30)

K testování efektivity byly použity rekombinantní cytochromy P450 exprimované v SupersomechTM (mikrosomy z hmyzích buněk transfektovaných Bakulovirem, obsahující MFO systém, který je tvořen jedinou rekombinantní izoformou potkaního/ lidského cytochromu P450 a NADPH:CYP reduktasou). (obr 14) (Svobodová *et al* 2008)



obr 14: Oxidace 2-nitroanisolu potkaními (A), lidskými (B) rekombinantními cytochromy P450. (převzato z práce Svobodové *et al* 2008)

V práci Svobodové *et al* (2010) bylo prokázáno, že na oxidaci 2-NP na 2,5-DNB se nejúčinněji podílí lidský CYP2E1, v menší míře CYP2A6 a 2B6. (obr. 15)



obr 15: Oxidace 2-NP rekombinantními lidskými cytochromy P450. (Převzato z práce Svobodové *et al* 2010).

Metodou „³²P-Postlabeling“ bylo zjištěno, že 2-NA, 2-NP a jejich metabolity netvoří adukty s DNA. Metabolická oxidace 2-NA cytochromy P450 je proto, z hlediska metabolismu 2-NA, dráhou detoxikační. (Stiborová *et al* 2004 a, Svobodová *et al* 2010)

4.1.2 Redukční metabolismus 2-nitroanisolu

Redukce 2-nitroanisolu (2-NA) katalyzovaná xanthinoxidasou (XO) vede k tvorbě *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu a 2-anisidinu (dále v kap. 4.1.2.1). 2-NA je redukován přes meziprodukt nitrosoderivát až na *N*-hydroxylovaný produkt (*N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin), který může být za přítomnosti xanthinoxidasy dále redukován až na 2-anisidin. (obr. 13, str. 29) *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin je reaktivní sloučeninou, která se rozpadá na nitréniový (popř. karbeniový) ion tvořící adukty s DNA. (Stiborová *et al* 2004 a, 2009) *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin se také může v druhé fázi metabolismu může dále působením sulfotransferás (SULT) konjugovat s aktivním sulfátem (PAPS) a utvořit reaktivní ester. (Stiborová *et al* 2004 a). Rozpad tohoto konjugátu také vede ke vzniku nitréniového (karbeniového) iontu tvořící adukty s DNA. (obr 16 D, str. 32) (Mikšanová *et al* 2004, Stiborová *et al* 2004 a). Rozpad vazeb v konjugátu podporuje zvláště kyselé pH. To může být jeden z důvodů, proč adukty s DNA, vzniklé metabolismem *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu, byly nalezeny hlavně v buňkách močového měchýře potkana.

K dalšímu možnému vzniku aduktů s DNA v močovém měchýři může docházet aktivací metabolitu 2-NA, *o*-anisidinu, prostřednictvím peroxidasy (zejména prostaglandin H synthasy). (obr. 17, str. 33) Bylo zjištěno, že *o*-anisidin je peroxidasami oxidován na reaktivní radikály a následně z nich vznikají metabolity, které jsou schopny vytvářet adukty s DNA. (Stiborová *et al* 2002) (dále v kap. 4.1.2.2)

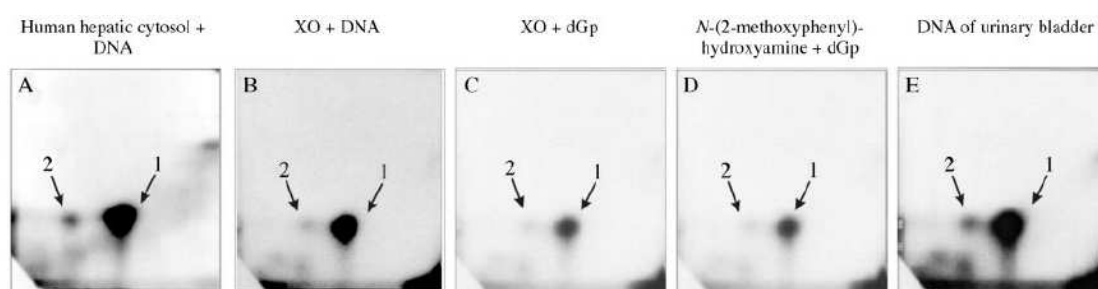
4.1.2.1 Metabolismus 2-NA katalyzovaný xanthinoxidasou

Důkaz, že xanthinoxidasa (XO) je majoritním enzymem, který katalyzuje redukci 2-NA za vzniku *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu a *o*-anisidinu, je vznik totožných aduktů s DNA v reakci *in vitro*, inkubací DNA z telecího brzlíku s 2-NA za přítomnosti cytosolu izolovaného z lidských jater a kofaktoru XO, hypoxanthinu, nebo čisté xanthinoxidasy. (Obr 16 A, B, str. 32). (Stiborová *et al* 2004 a)

Ve studiích Stiborové *et al* (2004 a) bylo zjištěno, že adukty s DNA způsobené redukčním metabolismem 2-NA vznikají převážně na deoxyguanosinu (dG) (Stiborová *et*

al 2004 a). Inkubací 2-NA s XO a dG (*in vitro*) vznikají shodné adukty s DNA jako v reakci celého řetězce DNA s XO a 2-NA. (obr 16 C, str. 32) (Stiborová *et al* 2004 a)

Totožné adukty s DNA, jako v reakcích 2-NA s DNA a XO *in vitro*, byly nalezeny i v DNA močového měchýře potkana, po podání 2-NA. DNA z různých tkání byly izolovány a použity pro analýzu vzniklých aduktů s DNA pomocí metody „³²P-Postlabeling“. (obr 16 E) Nejvyšší množství těchto aduktů s DNA bylo nalezeno v močovém měchýři, v menším množství v játrech, ledvinách a slezině. Tyto dva deoxyguanosinové adukty nebyly nalezeny v plicích, srdci a mozkové tkáni testovaných zvířat. (Stiborová *et al* 2004 a)



obr 16: Adukty vzniklé aktivací 2-nitroanisolu (A) cytosolem izolovaným z lidských jater a DNA. (B) Purifikovanou XO a DNA. (C) XO a dGp.

(D) Adukty dGp vzniklé reakcí s *N*-(2-mathoxyfenyl)-hydroxylaminem.

(E) Adukty v DNA z močového měchýře potkaního samce po 5 expozici 2-NA.

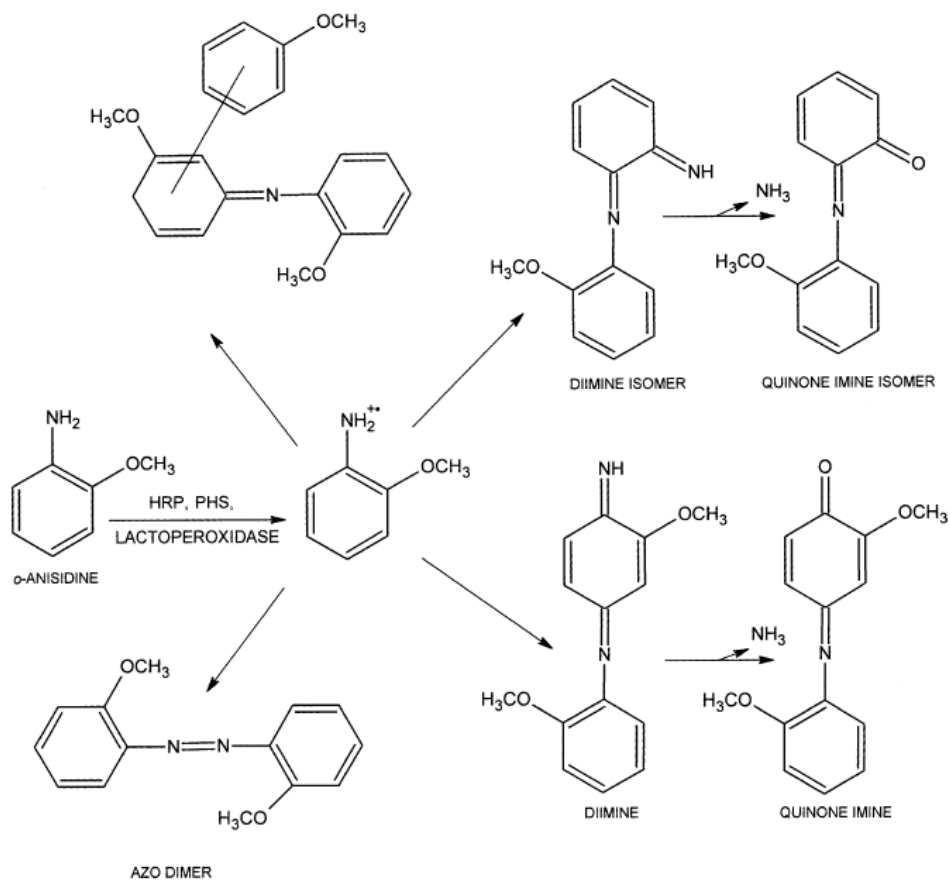
Autoradiografy byly získány metodou „³²P-postlabeling“.

(Převzato z práce Stiborové *et al* 2004 a)

4.1.2.2 Metabolismus o-anisidinu katalyzovaný peroxidasami

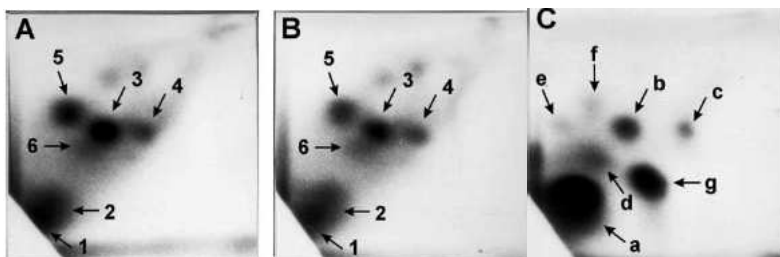
Aktivační metabolismus o-anisidinu katalyzovaný peroxidasami (např. PHS-prostaglandin H synthasu) probíhá zejména v močovém měchýři. Za podmínek *in vitro* bylo zjištěno, že i laktoperoxidasa (LPO) a křenová peroxidasa (HRP) jsou schopny katalyzovat oxidaci o-anisidinu. (obr. 18 A, B, str. 33) Oxidací o-anisidinu peroxidasami vzniká radikál o-anisidinu, který následně tvoří metabolit diimin. Diimin je v neutrálním nebo alkalickém prostředí stabilní, avšak v kyselém pH je diimin hydrolyzován na chinonimin. Z radikálu o-anisidinu vzniká i azo-dimer (2,2'-dimethoxyazobenzen) a zatím neidentifikovaný metabolit, který se skládá ze tří methoxybenzenových kruhů, z nichž 2

kruhy tvoří vazbou dusíku diimin. (Stiborová *et al* 2002) Schéma předpokládané metabolické aktivace o-anisidinu paroxidasy naznačuje obr 17.



obr 17: Schéma metabolismu o-anisidinu katalyzovaný peroxidasy. (Převzato z práce Stiborové *et al* 2002)

Z hlediska genotoxického potenciálu, o-anisidin a jeho radikály netvoří adukty s DNA, ale za vazbu na DNA je zodpovědný diimin. Cílovým nukleotidem vazeb metabolitů o-anisidinu je deoxyguanosin-3' monofosfát (dGp) a v menší míře deoxyadenosin-3'-monofosfát (dAp). (Stiborová *et al* 2002)



obr 18: Adukty dGp s o-anisidinem aktivovaným (A) HRP a (B) LPO.

(C) Adukty dGp vzniklé reakcí diiminu o-anisidinu s dGp.

Vzniklé adukty byly detekovány metodou „³²P-postlabeling“ a separovány pomocí TLC.

(Převzato z práce Stiborové *et al* 2002)

4.2 Metabolismus 4-nitroanisolu

Oxidační metabolismus 4-nitroanisolu (4-NA) a 4-nitrofenolu (4-NP) byl popsán v případě kmene bakterie *Rhodococcus* (Schäfer *et al* 1996), houby *Phanerochaete chrysosporium* (Teramoto *et al* 2004), a i v experimentu s potkaními (Mazur *et al* 1997, Anari *et al* 1995) a lidskými hepatocyty (Jones *et al* 1997).

Redukční metabolismus 4-NA nebyl doposud v literatuře detailně popsán.

4.2.1 Oxidační metabolismus 4-nitroanisolu

4-NA reakcí s mikrosomální frakcí izolovanou z lidských jater, tvoří 4-nitrofenol (4-NP). Inhibiční studie cytochromů P450 potvrzují, že největší roli v O-demethylaci 4-NA hrají lidské CYP2A6 a 2E1. (Jones *et al* 1997)

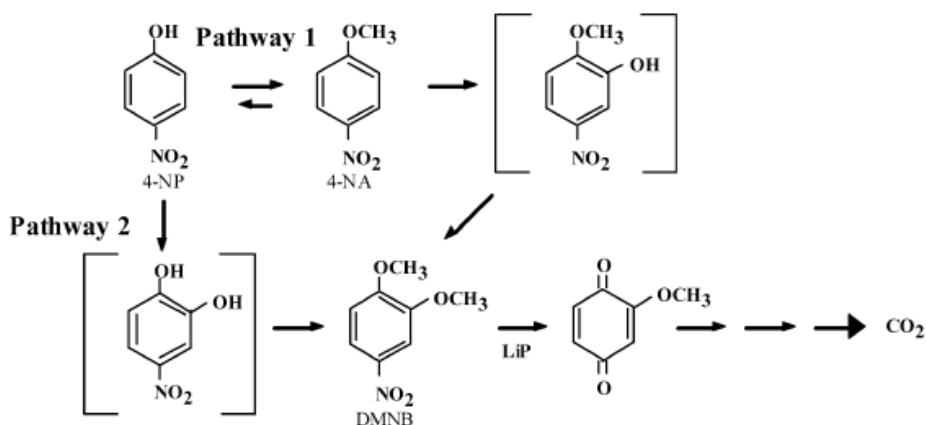
Schäfer *et al* (1996) ve své práci potvrzují O-demethylaci 4-NA za vzniku 4-NP i ve dvou liniích bakterie *Rhodococcus* (*R. opacus* a *R. erythropolis*).

Oxidace 4-NA na 4-NP cytochromy P450 probíhá s vyšší rychlostí, pokud cytochrom P 450 místo NADPH využívá organického hydroperoxidu. Přítomnost terc-butyl hydroperoxidu (tBHP) v potkaních hepatocytech zvýšila rychlost O-demethylace 4-NA až 22x a množství produktu zvýšila 7x oproti O-demethylaci 4-NA bez přítomnosti tBHP. Z toho vyplývá, že organický peroxid několikanásobně zvyšuje metabolismus 4-NA. Bylo zjištěno, že metabolity 4-NA v izolovaných potkaních hepatocytech způsobí pokles schopnosti růstu buněk o 15%. Přítomnost tBHP a 2-NA v témž hepatocytu způsobí 100% ztrátu životaschopnosti těchto buněk. (Anari *et al* 1995)

4-NA ani 4-NP nejsou oxidovány ligninperoxidasou, manganperoxidasou ani lakkasou, které produkuje stopkovýtrusná houba *Phanerochaete chrysosporium*. Avšak za podmínek nízké koncentrace dusíkatých zdrojů v živném médiu je *P. chrysosporium* schopna 4-NP metabolizovat na 4-NA a 1,2-dimethoxy-4-nitrobenzen (DMNB). (obr. 19, str. 35) Konverze 4-NP na DMNB probíhá hydroxylací aromatického kruhu přes meziprodukt 4-nitrokatechol, který je přeměněn na DMNB methylací hydroxylových skupin. Na těchto reakcích s největší pravděpodobností participují cytochromy P450. (Teramoto *et al* 2004). Na methylaci OH skupin však musí participovat i další enzymy, které doposud nejsou známy.

P. chrysosporium pravděpodobně využívá cytochromy P450 i k oxidaci 4-NA na DMNB. Reakce je uskutečněna přes meziprodukt 4-NP. (Teramoto *et al* 2004).

DMNB může být dále působením ligninperoxidasy transformován na 2-methoxy-1,4-benzochinon, který je enzymově oxidován až na CO₂ a H₂O. (Valli *et al* 1992 in Teramoto *et al* 2004). Metabolismus 4-NA a 4-NP katalyzovaný enzymy houby *P. chrysosporium* navrženým Teramotem *et al* (2004) je znázorněn na obr. 19.



obr 19: Předpokládaný metabolismus 4-NA a 4-NP katalyzovaný enzymy stopkovýtrusné houby *Phanerochaete chrysosporium*. Metabolická dráha (1) 4-NA a 4-NP je uváděna jako majoritní. (převzato z práce Teramota *et al* 2004)

4.2.2 Redukční metabolismus 4-nitroanisolu

Teramoto *et al* (2004) zjistil, že pokud je v živném médiu stopkovýtrusné houby *Phanerochaete chrysosporium* přítomen 2,4-dinitrotoluen, je metabolizován na 2-amino-4-nitrotoluen. Prokázáno tedy bylo, že *Phanerochaete chrysosporium* obsahuje ve svých

buňkách též nitroreduktasy. Ovšem v případě 4-NP k redukci na 4-aminofenol nedochází, nitroreduktasy rovněž nemetabolizovaly 4-NA na jeho redukční produkty.

Landrum *et al* (1981) zkoumali redukční metabolismus 4-NA a 4-NP *in vivo*. Jako experimentální model byl vybrán mořský ježek (třída Ježovky). Zjistili, že primární metabolismus těchto nitroaromátů probíhá redukcí nitroskupiny na aminoskupinu a dále následuje acetylace aminu. Uvedli také, že mořská hvězdice (*Pisaster ochraceus*), sumýši (*Cucumaria miniata*), slávky (*Mytilus californianus*) a další mořští bezobratlí, po injekčním podání 4-NA metabolizovaly 4-NA na oxidační produkty.

4.3. Metabolismus nitrobenzanthronů

Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.4.3.6, mutagenní aktivita jednotlivých nitrobenzanthronů v Amesově testu se výrazně liší. Studie Reynissona *et al* (2006) dospívá k závěru, že mutagenní aktivita nitrobenzanthronů v bakteriálních systémech je závislá na stabilitě nitréniového iontu, který vzniká jejich biotransformací. Jejich fyzikálně-chemické vlastnosti (orientace nitroskupiny v molekule, hydrofobicita, redukční potenciál) hrají méně významnou roli.

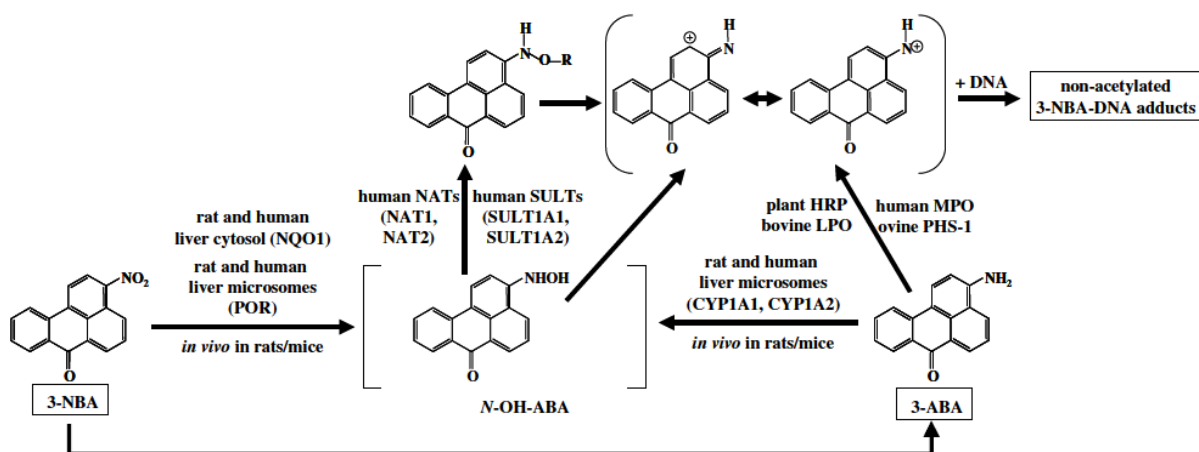
Bylo zjištěno, že nitrobenzanthrony, které vykazují vyšší mutagenní aktivitu (3-NBA), tvoří metabolickou přeměnou nitréniový ion s vyšší stabilitou. (Arlt *et al* 2007) Jedno z možných vysvětlení je, že vyšší stabilita iontu zvyšuje „dobu životnosti“ tohoto iontu v buňce. V případě elektrofilního nitréniového iontu v prokaryotické buňce bakterie, je více stabilní ion schopen difundovat cytoplasmou až k nukleofilním centrům DNA, s kterými tvoří adukty. (Arlt *et al* 2007, Reynisson *et al* 2008)

Mutagenní aktivitu nitrobenzanthronů u savců však ovlivňují i další faktory. Jedním z nich jsou enzymy participující na metabolismu těchto látek. (Arlt *et al* 2007, Reynisson *et al* 2006)

4.3.1 Metabolismus 3-nitrobenzanthronu

3-Nitrobenzanthron (3-NBA) je vzdušným polutantem, který byl detekován ve výfukových plynech automobilů a v kouři vznikajícím při spalování dřeva. 3-NBA vstupuje do organismu nejčastěji inhalační cestou, a proto jsou rizikovým orgánem zejména plíce.

Předpokládaný aktivační metabolismus 3-NBA vedoucí ke vzniku aduktů s DNA nastiňuje obr 20.



obr 20: Aktivační metabolismus 3-NBA a 3-ABA.

R= -COCH₃ nebo -SO₃H, POR= NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktasa, NQO1= NAD(P)H:chinon-oxidoreduktasa, NAT= N-acetyltransferasa, SULT= sulfotransferasa, HRP= křenová peroxidasa, LPO= laktoperoxidasa, MPO= myeloperoxidasa, PHS= prostaglandin H synthasa

(Převzato z práce Stiborové *et al* 2005)

V metabolické aktivaci 3-NBA na *N*-hydroxy-3-aminobenzanthron (*N*-OH-3-ABA) hrají roli cytosolární reduktasy, zejména NAD(P)H:chinon-oxidoreduktasa (NQO1) a xanthinoxidasa (XO), ale také mikrosomální NADPH:CYP oxidoreduktasa (POR). Redukce NO₂ skupiny 3-NBA na *N*-hydroxylovaný metabolit *N*-OH-3-ABA probíhá přes meziprodukt nitrosoderivát. Cytosolární reduktasy (NQO1, XO) hrají v redukci NO₂ skupiny 3-NBA větší roli než POR. (Arlt 2005, Arlt *et al* 2006, Stiborová *et al* 2010) Bylo prokázáno, že i lidská NQO1 katalyzuje redukci NO₂ skupiny s větší efektivitou než lidská POR. (Svobodová *et al* 2007) Redukce může probíhat dále až na produkt 3-ABA.

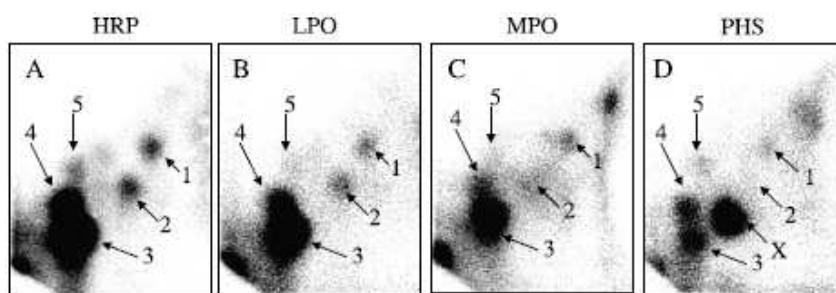
N-OH-3-ABA také vzniká *N*-hydroxylací NH₂ skupiny 3-ABA. Na této reakci participují zejména cytochromy P450: CYP1A1 a 1A2 a probíhá zejména v ledvinách a plicích. (Arlt 2005, Arlt *et al* 2006, Mizerovská *et al* 2008, Nagy *et al* 2005)

N-OH-3-ABA, vzniklý jak redukcí nitroskupiny 3-NBA, tak oxidací 3-ABA, je v druhé fázi biotransformace konjugován s aktivním sulfátem, nebo acetátem. Enzymy katalyzující konjugaci *N*-OH-3-ABA s aktivním acetátem v lidském organismu jsou *N*-acetyltransferasy (NAT), zejména NAT2 a v menší míře NAT1. (Stiborová *et al* 2005) Také sulfotransferasy (SULT) SULT 1A1 a SULT 1A2 katalyzují konjugaci aktivního

sulfátu s *N*-OH-3-ABA. Vzniká konjugát-ester, který se efektivně rozpadá za tvorby nitréniového (ev. karbeniového) iontu. Tyto elektrofilní sloučeniny pak tvoří adukty s DNA.

3-ABA může být aktivován také peroxidasou. Na této reakci participují zejména křenová peroxidasa (HRP), myeloperoxidasa (MPO), laktoperoxidasa (LPO) a prostaglandin H synthasa (PHS). (Stiborová *et al* 2005)

Stiborová *et al* 2005 zjistili, že 3-ABA vytváří *in vitro*, za katalýzy peroxidasou (HRP, LPO, MPO a PHS) v prostředí peroxidu vodíku, 5 aduktů s DNA totožných u 4 typů zkoumaných peroxidas. PHS vytváří šestý, neznámý adukt s DNA. (adukt x, obr 21 D, str. 38)



obr 21: Adukty v DNA vzniklé z aktivovaného 3-ABA (A) rostlinnou HRP, (B) hovězí LPO, (C) lidskou MPO, (D) ovčí PHS.

Autoradiografy byly získány metodou „³²P-postlabeling“.

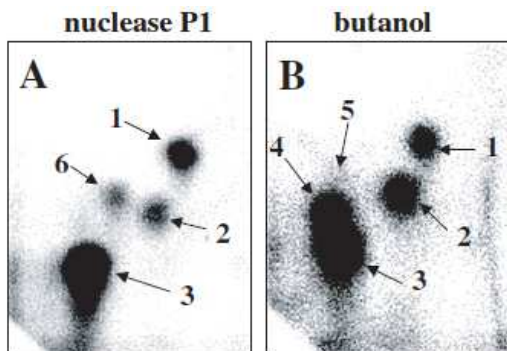
(Převzato z práce Arlta *et al* 2006)

4.3.1.1 Karcinogenní účinky 3-NBA na organismy

Bylo zjištěno, že po intratracheálním podání 3-NBA potkanům z kmene F344 vzniklo největší množství aduktů s DNA v plicích (obr. 22), v ledvinách a v malém množství v játrech. Důvodem, proč adukty s DNA byly nalezeny nejvíce v plicích, je zvýšená přítomnost NQO1 a POR v tomto orgánu, ale i přítomnost CYP 1A1 a 1A2 a nakonec také peroxidas (MPO a PHS), které se podílejí na metabolismu 3-NBA a 3-ABA. CYP 1A1, 1A2 a 1B1 byly nalezeny také v játrech, což je jeden z důvodů, proč se tvoří adukty s DNA i v jaterních buňkách. (Nagy *et al* 2005)

V další studii, která testovala působení 3-NBA *in vivo* na různé orgány samice potkana z kmene Wistar potvrzuje, že adukty s DNA byly detekovány nejen v plicích a jaterních buňkách, ale i v buňkách slinivky břišní, ledvin a tlustého střeva. (Arlt *et al* 2007)

Metodou „ ^{32}P -postlabeling“ byly detekovány struktury některých aduktů s DNA z plicní tkáně, kde je zastoupení aduktů nejpočetnější. Byly použity dva rozdílné druhy metody ^{32}P -postlabeling. (obr. 22)



obr 22: Adukty v DNA plicní tkáně vzniklé působením 3-NBA na samice potkana kmene Wistar. Byly podávány 2 mg 3-NBA/kg tělesné hmotnosti.

A- adukty s DNA vyhodnocené metodou „ ^{32}P -postlabeling“ v přítomnosti nukleasy P1.

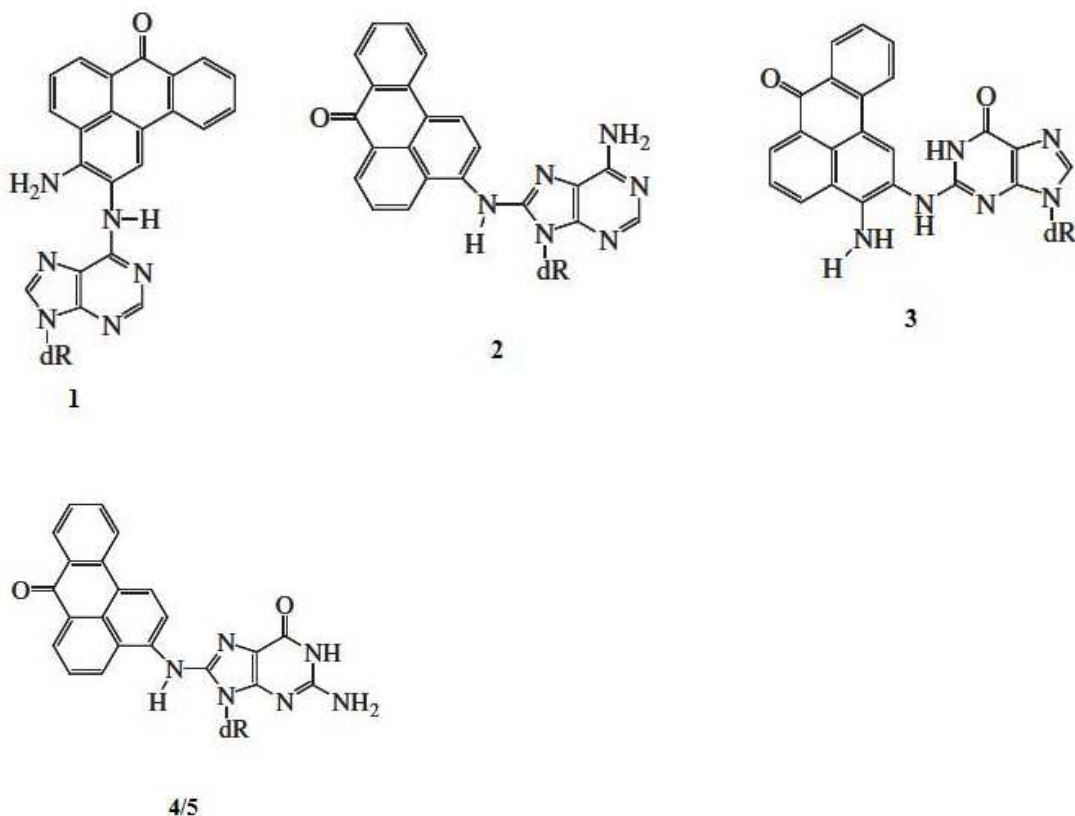
B- adukty s DNA vyhodnocené metodou „ ^{32}P -postlabeling“, adukty byly obohaceny extrakcí do 1-butanolu.

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

(Převzato z práce Arlta 2005)

Struktura aduktů tvořených metabolity 3-NBA a 3-ABA byla doposud určena pouze pro 3 adukty s dGp a s dAp: 2-(2'-deoxyadenosin- N^6 -yl)-3-aminobenzanthron (dA- N^6 -3-ABA) (adukt 1, obr. 22 a 23), *N*-(2'-deoxyguanosin- N^2 -yl)-3-aminobenzanthron (dG- N^2 -3-ABA) (adukt 3, obr. 22 a 23) a *N*-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthron (dG-C8-N-3-ABA), který je nestabilní a tedy se rozpadá na adukty 4 a 5 (obr 22 B, obr. 23(3)). Struktura aduktu č. 2 (adukt 2, obr. 22 a 23) nebyla zcela určena, avšak pravděpodobně patří *N*-(2'-deoxyadenosin-8-yl)-3-aminobenzathronu (dA-C8-N-3-ABA). (Arlt et al 2005, Stiborová *et al* 2010)

Totožné adukty s DNA byly detekovány i po inkubaci lidských buněk MCL-5 s 3-NBA *in vitro*. (Arlt 2005)



obr 23: Strukturní vzorce aduktů s guanosinem a adenosinem vzniklé metabolismem 3-NBA *in vivo*.

dR = deoxyribosa

1- dA- N^6 -3-ABA

2- dA-C8-N-3-ABA

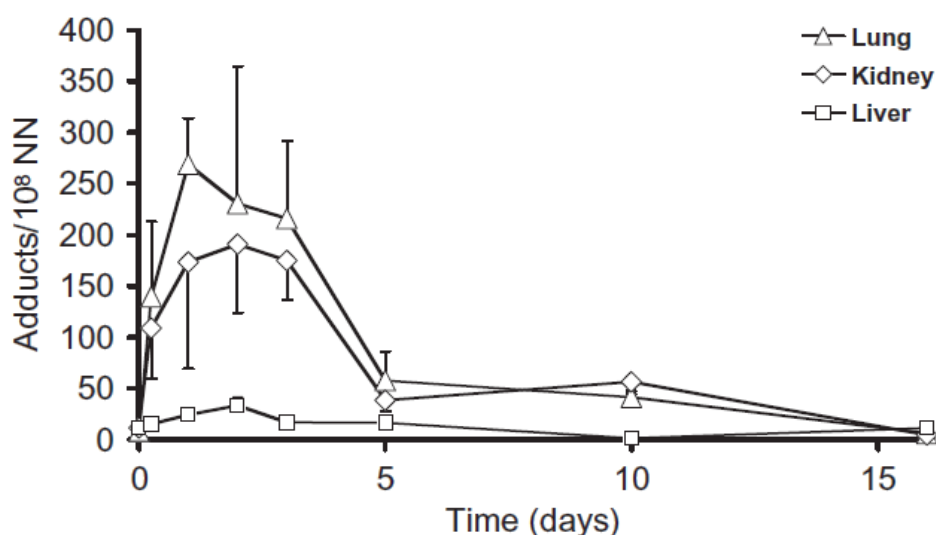
3- dG- N^2 -3-ABA

4/5- dG-C8-N-3-ABA

(Převzato z práce Arlta 2005)

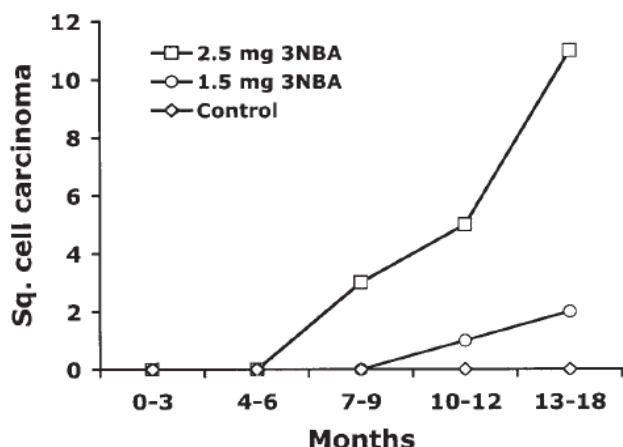
Ve většině případů jsou adukty s DNA vzniklé aktivací karcinogenu odstraněny reparačním systémem DNA. Nicméně, 3-NBA svou metabolickou aktivací vytváří velice persistentní adukty s DNA, které nemusí být opraveny. Ty mohou způsobit mutace na klíčových regulačních genech buněčného růstu (protoonkogenech nebo tumor supresorových genech). Jednou z pozorovaných mutací vzniklé metabolismem 3-NBA je GC→TA transverze. (Nagy *et al* 2005, 2007, Arlt 2005, Arlt *et al* 2007, Reynisson *et al* 2008) Persistentní adukty s DNA hrají nepochybně významnou roli v procesu karcinogeneze. (Arlt 2005)

Účinnost reparačního systému DNA lze pozorovat rychlým poklesem množství aduktů s DNA v jednotlivých orgánech (plíce, ledviny, játra) po jednorázovém intratracheálním podání 3-NBA (10 mg 3-NBA/ kg tělesné hmotnosti) potkanům F344. Aduktů s DNA byly v plicích detekovatelné již po 6 hodinách. Po 1-2 dnech bylo množství aduktů s DNA ve všech třech orgánech maximální. Avšak po tomto maximu množství aduktů klesalo, 16. den nebyly adukty s DNA objeveny v žádném orgánu. (Nagy *et al* 2005) (obr 24) Avšak v další studii je uvedeno, že adukty s DNA, vzniklé aktivací 3-NBA při intratracheálním podání 0,2 mg 3-NBA/kg tělesné hmotnosti, byly detekovány v plicní tkáni potkana z kmene Sprague-Dawley dokonce po 36 týdnech od podání. (Bieler a Schmeiser in Arlt 2005)



obr 24: Množství aduktů v DNA tvořených metabolity 3-NBA v plicích, ledvinách a játrech potkanů. Tato časová závislost ukazuje úbytek aduktů vlivem reparačního systému opravujícího DNA. (převzato z práce Nagy *et al* 2005)

Se zvyšující se dávkou 3-NBA, se zvyšují i jeho karcinogenní účinky. Jako experimentální model pro studium karcinogenity 3-NBA byly vybrány samice potkana kmene F344, kterým bylo podáváno různé množství 3-NBA. Z výsledků jednoznačně vyplývá, že při vyšší dávce 3-NBA se zvyšuje množství aduktů s DNA, a tím se i dříve objevují tumory v plicích. První tumory byly detekovány při dávce 1,5 mg 3-NBA/kg tělesné hmotnosti po 10-12 měsících od prvního podání. Při dávce 2,5 mg 3-NBA/kg tělesné hmotnosti, byly tumory detekovány již po 7-9 měsících. (obr 25) (Nagy *et al* 2005)



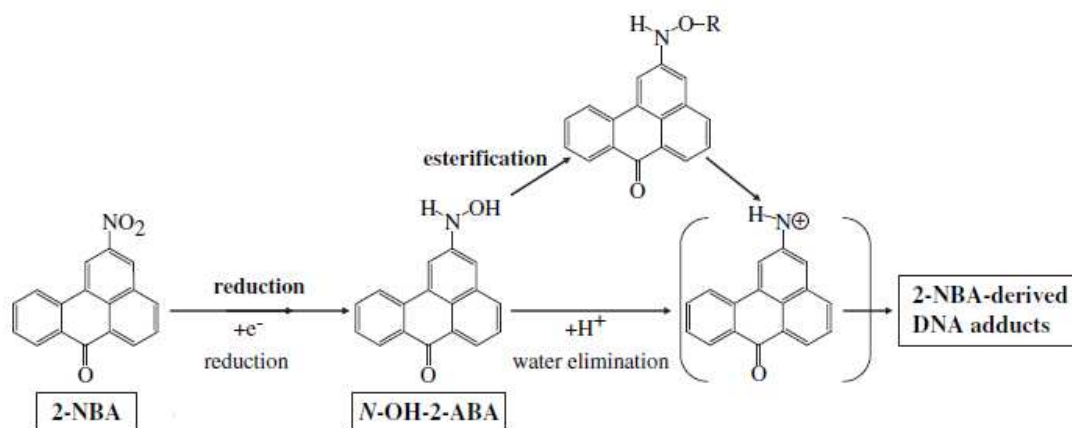
obr 25: Časová závislost tvorby nádorových buněk v plicích samic potkanů F344 při dvou různých dávkách 3-NBA (1,5 a 2,5 mg 3-NBA/kg tělesné hmotnosti). (převzato z práce Nagy *et al* 2005)

4.3.2 Metabolismus 2-nitrobenzathronu

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.4, koncentrace 2-NBA v atmosféře je až 70x vyšší než 3-NBA, zatímco jeho genotoxicita je jen třetinová oproti 3-NBA. Přesto je nutné ho brát především jako vysoké zdravotní riziko pro lidský organismus. (Arlt 2005)

V práci Arlta *et al* (2007) bylo zjištěno, že 2-NBA způsobuje řetězcové zlomy v nukleových kyselinách a tvoří adukty s DNA v lidských plicních buňkách A549. Dále byly tyto jevy částečně pozorovány i u potkana *in vivo*.

Metabolické přeměny 2-NBA dle Arlta *et al* (2007) probíhají analogicky jako 3-NBA. Redukcí NO₂ skupiny vzniká *N*-hydroxy-2-aminobenzanthron (*N*-OH-2-ABA), jež je konjugačními reakcemi esterifikován a tvoří se nitréniové (popř. karbeniové) ionty. (obr 26)

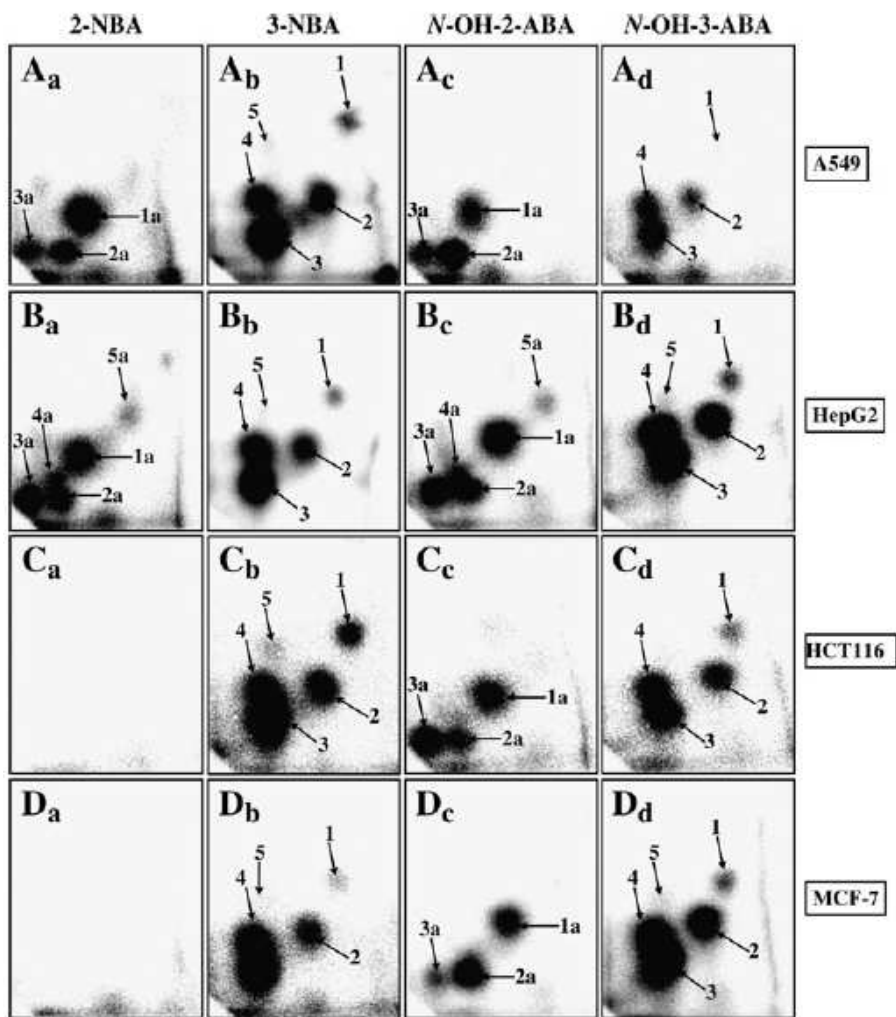


obr 26: Předpokládaný metabolismus 2-NBA.

R= -COCH₃ nebo -SO₃H.

(Převzato z práce Arlta *et al* 2007)

Mutagení účinky 2-NBA a jeho derivátu *N*-OH-2-ABA byly testovány na lidských nádorových buněčných liniích (buňky plicního karcinomu A549, jaterního karcinomu HepG2, buňky karcinomu tlustého střeva HCT116 a buňky z adenokarcinomu prsu MCF-7) (Arlt *et al* 2007). Zároveň byly tyto účinky porovnávány s mutagenními účinky 3-NBA a jeho derivátu *N*-OH-3-ABA. Analýza aduktů s DNA v jednotlivých buněčných liniích byla realizována metodou „³²P-postlabeling“. (obr 27)



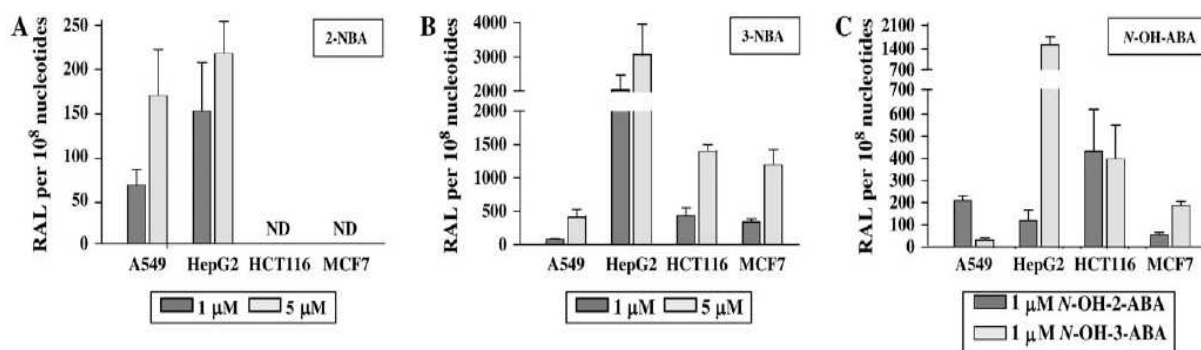
obr 27: Aduktý v DNA vzniklé z aktivovaného 2-NBA (A_a-D_a), 3-NBA (A_b-D_b), N-OH-2-ABA (A_c-D_c) a N-OH-3-ABA (A_d-D_d) enzymy lidských buněčných linií: A549 (A_a-A_d), HepG2 (B_a-B_d), HCT116 (C_a-C_d), MCF-7 (D_a-D_d) za podmínek *in vitro*.
(převzato z práce Arlta *et al* 2007)

Aduktý s DNA vzniklé metabolickou aktivací 2-NBA byly detekovány pouze v buňkách A549 a HepG2 (Obr 27 A_a, B_a). Bylo detekováno 5 aduktů s DNA (adukty 1a-5a obr 27. A_a, B_a), z nichž 1a, 2a, 3a byly označeny jako majoritní adukty.

Aduktý vzniklé působením N-OH-2-ABA byly detekovány ve všech buněčných liniích, na rozdíl od aduktů vzniklé aktivací 2-NBA. Avšak adukty s DNA vzniklé metabolismem 2-NBA i N-OH-2-ABA v buňkách A549 a HepG2 byly totožné. Množství aduktů s DNA v buněčné linii HepG2, vzniklých po působení 2-NBA a N-OH-2-ABA bylo srovnatelné.

3-NBA a *N*-OH-3-ABA vytvořily svou aktivací ve všech buněčných liniích adukty s DNA.

Bylo zjištěno, že působením 3-NBA na buněčnou linii HepG2 vzniká až čtrnáctinásobné množství aduktů s DNA oproti aduktům, vzniklým působením 2-NBA na tutéž linii. (Arlt *et al* 2007) (obr 28)

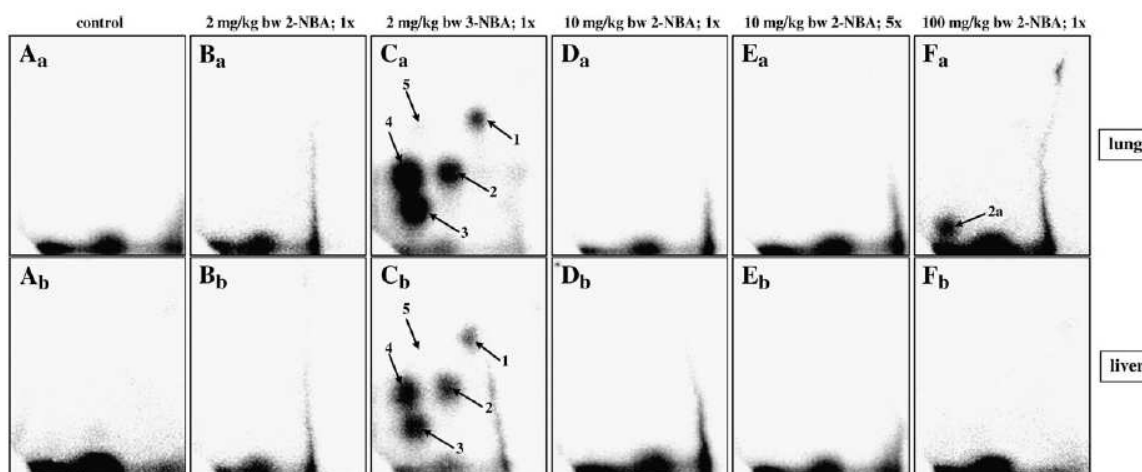


obr 28: Množství aduktů v DNA vzniklých z aktivovaného 2-NBA (A), 3-NBA (B) a hydroxylovaných derivátů 2-NBA a 3-NBA (C) enzymy lidských buněčných linií A549, HepG2, HCT116 a MCF7. (převzato z práce Arlta *et al* 2007)

Tvorbu aduktů DNA s metabolity 2-NBA, 3-NBA a jejich hydroxylovaných derivátů testovali Arlt *et al* (2007) i za podmínek *in vivo*. Jako experimentální model byly vybrány samice potkana z kmene Wistar, kterým bylo intraperitoneálně podány dávky nitroaromátu a vzniklé adukty s DNA z buněk různých orgánů byly analyzovány metodou „³²P-postlabeling“ s detekcí pomocí TLC.

Již při dávce 2 mg 3-NBA/kg tělesné hmotnosti byly adukty s DNA detekovány v největších koncentracích v ledvinách, plicích, tlustém střevě, slinivce břišní a v menší míře v játrech. (obr 29 C_a, C_b)

Naopak při dávce 2 mg 2-NBA/kg tělesné hmotnosti nebyly nalezeny žádné adukty s DNA. (obr 29 B_a, B_b) Stejně výsledky vykazovaly zvýšené dávky 2-NBA (10 mg/kg), i opakované podávání zvýšených dávek (1x denně po dobu 5 dnů). (obr 29 D-E) Až při dávce 100 mg 2-NBA/kg tělesné hmotnosti byl nalezen v plicích buňkách jeden typ aduktu s DNA v malém množství (5 aduktů/10⁸ nukleotidů). (obr 29 F_a) V ostatních testovaných orgánech adukty s DNA nalezeny nebyly. (Arlt *et al* 2007)



obr 29: Aduky v DNA detekované po intraperitoneálním podání 2-NBA a 3-NBA v plicích (řada a) a játrech (řada b) samic potkana Wistar. Autoradiografy byly získány metodou „³²P-postlabeling“.

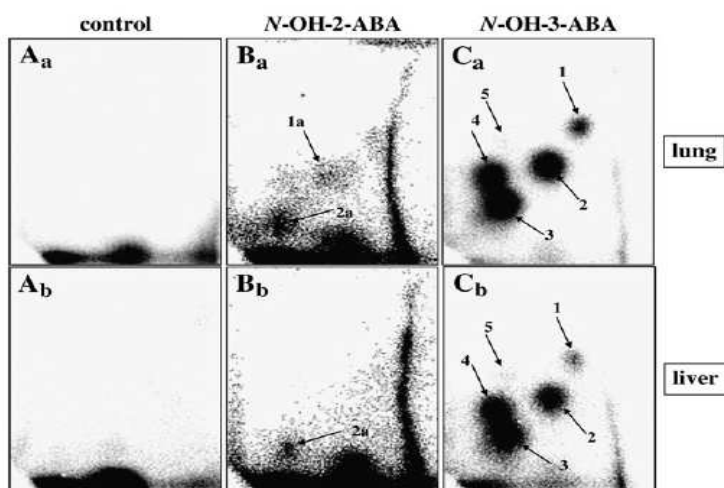
A-kontrola, B- 1x dávka 2mg 2-NBA/kg tělesné hmotnosti, C- 1x dávka 3-NBA/kg tělesné hmotnosti, D- 1x dávka 10 mg 2-NBA/kg tělesné hmotnosti, E- 5x dávka 10 mg 2-NBA/kg tělesné hmotnosti, F- 1x dávka 100 mg 2-NBA/kg tělesné hmotnosti.

(Převzato z práce Arlta *et al* 2007)

Výsledky Arlta *et al* (2007) jsou ovšem v rozporu se studií Nagy *et al* (2007), která dokazuje, že adukty s DNA, které vznikají metabolismem 2-NBA (*in vivo*), jsou detekovatelné již při dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti. Jako experimentální model byli použiti potkani z kmene F344. 2-NBA jim bylo podáno intratracheálně a adukty s DNA byly analyzovány metodou „³²P-postlabeling“ s detekcí pomocí HPLC.

Rozdílné výsledky mohou být zapříčiněny výběrem kmenu potkana (Wistar x F344) nebo způsobem podání (intraperitoneálně x intratracheálně) a způsobem analýzy (TLC x HPLC ³²P-postlabeling).

Aduky s DNA vzniklé působením *N*-OH-3-ABA a *N*-OH-2-ABA byly detekovány ve všech testovaných orgánech potkana exponovaného těmito látkami při dávce 1x 10 mg/kg tělesné hmotnosti. Největší množství aduktů vzniklých z metabolitů *N*-OH-3-ABA bylo nalezeno ve slinivce břišní (430 aduktů/10⁸ nukleotidů), poté v plicích, ledvinách a tlustém střevě. Avšak aduktů vzniklých metabolickými přeměnami *N*-OH-2-ABA bylo nalezeno několikanásobně méně (v ledvinách 2,3 aduktů/10⁸ nukleotidů). (obr 30) (Arlt *et al* 2007)

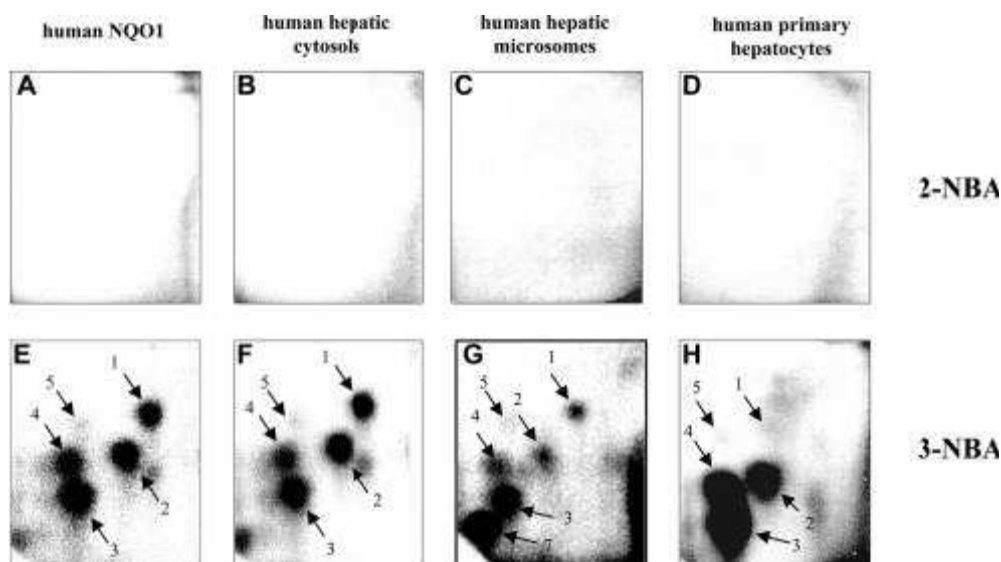


obr 30: Adukty s DNA detekované po intraperitoneálním podání *N*-OH-2-ABA a *N*-OH-3-ABA v plicích (řada a) a játrech (řada b) samice potkana Wistar. Autoradiografy byly získány metodou „³²P-postlabeling“.

A-kontrola, B- dávka 10 mg *N*-OH-2-ABA/kg tělesné hmotnosti, C-dávka 10 mg *N*-OH-3-ABA/kg tělesné hmotnosti. (převzato z práce Arlta *et al* 2007)

Tato studie potvrzuje, že 2-NBA (i jeho hydroxylovaný derivát *N*-OH-2-ABA) má mnohokrát menší mutagenní účinky na hlodavce oproti jeho izomeru 3-NBA. K osvětlení příčin rozdílné mutagenity těchto izomerů může přispět teorie stability nitréniového iontu (kapitola 6). Dalším důvodem může být afinita enzymů aktivačního metabolismu k 2-NBA a *N*-OH-2-ABA. Jedna z možných vysvětlení je, že *N*-OH-2-ABA je špatným substrátem pro NAT a SULT, a proto je snadněji metabolizován na 2-ABA, který je snadno vyloučen z organismu. (Arlt *et al* 2007)

Studie Stiborové *et al* 2010 dokazují, že 2-NBA není aktivován žádným enzymem, který se podílí na aktivaci 3-NBA (NQO1, XO, NADPH:CYP reduktasa). (obr 31) Bylo zjištěno, že oba izomery 3-NBA a 2-NBA se vážou do aktivního místa NQO1 se stejnou afinitou. Orientace vazby 2-NBA s aktivním místem enzymu však není příznivá pro redukci nitroskupiny. (Stiborová *et al* 2010)



obr 31: Adukty v DNA vzniklé z aktivovaného 2-NBA (A-C) a 3-NBA (E-G) lidskou rekombinantní NQO1 (A, E), cytosolem izolovaným z lidských jater (B, F), mikrosomy izolovanými z lidských jater. Adukty v DNA vzniklé působením 2-NBA (D) a 3-NBA (H) na primární lidské jaterní buňky.

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

(Převzato z práce Stiborové *et al* 2010)

4.4 Metabolismus nitrotoluenů, dinitrotoluenů a trinitrotoluenů

Metabolismus nitrotoluenů (dinitrotoluenů, trinitrotoluenů) se zkoumá již od minulého století, kdy bylo prokázáno, že dinitrotolueny [2,4-dinitrotoluen (2,4-DNT) a 2,6-dinitrotoluen (2,6-DNT)] jsou mutagenní pro kmen *Salmonella typhimurium* TA98. Karcinogenní účinky dinitrotoluenů, ale i 2-nitrotoluen (2-NT) a 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) byly prokázány na hlodavcích. (Harth *et al* 2005)

Předpokládá se, že prvním krokem metabolismu 2-NT, 4-NT, 2,4-DNT a 2,6-DNT je redukce nitroskupiny nebo oxidace methylové skupiny. Pokud dochází k redukci jedné nitroskupiny, vznikají z nitrotoluenů aminotolueny a z dinitrotoluenů aminonitrotolueny. Při redukci dvou nitroskupin vznikají z dinitrotoluenů toluendiaminy. Oxidací methylové skupiny vznikají nitrobenzylalkoholy a kyseliny nitrobenzoové. Může však docházet ke kombinaci obou reakcí, poté vznikají kyseliny aminobenzoové, aminobenzylalkoholy, methylaniliny atd. (Sabbioni *et al* 2006, Jones *et al* 2005)

Aminotolueny, aminonitrotolueny a toluendiaminy mohou být *N*-oxidovány cytochromy P450 na *N*-hydroxyarylaminy. Na těchto reakcích participují zejména lidské

CYP1A2 a CYP3A4. Dále se *N*-hydroxyarylaminy a nitrobenzylalkoholy mohou konjugovat s aktivním sulfátem nebo acetátem, aktivní kyselinou glukuronovou, nebo glutathionem. Konjugace s aktivním sulfátem je katalyzována zejména lidskými sulfotrasferasami SULT1A1 a SULT1A2 a s aktivním acetátem *N*-acetyltrasferasami NAT1 a NAT2. (Sabbioni *et al* 2006, Jones *et al* 2005)

Ve studiích Jonese *et al* (2003, 2005) a Sabbionih *et al* (2006) bylo zjištěno, že právě *N*-hydroxylační produkty a metabolity vzniklé oxidací methylové skupiny jsou zodpovědné za vznik aduktů s nukleofilními centry makromolekul. Cílovými molekulami jsou nukleové kyseliny a hemoglobin v erytrocytech. Adukt s hemoglobinem mohou tedy sloužit jako „markery“ ilustrující intenzitu působení daného karcinogenu. Adukt s hemoglobinem vznikají z *N*-hydroxyarylaminů, které jsou v erytrocytech oxidovány na nitrosoareny. Nitrosoareny se mohou konjugovat s cysteinovým zbytkem hemoglobinu a tvořit tak sulfinamidové adukty. (Jones *et al* 2003, Jones *et al* 2005, Sabbioni *et al* 2006)

4.4.1 Karcinogenní účinky nitrotoluenů na organismy

V případě metabolismu nitrotoluenů existují značné rozdíly v reakcích izomerů *o*-nitrotoluen (2-NT) a *p*-nitrotoluen (4-NT). Z metabolitů 4-NT identifikovaných v moči potkana jsou deriváty kyseliny benzoové zastoupeny v 68% množství, zatímco v metabolitech 2-NT jsou deriváty kyseliny benzoové zastoupeny jen z 29%. (Dunnick *et al* 2003)

Bylo zjištěno, že oxidační meziprodukt 2-NT, *o*-nitrobenzylalkohol, je výhodnějším substrátem pro glukuronosyltransferasu, která katalyzuje konjugační reakci s aktivní kyselinou glukuronovou v druhé fázi biotransformace za tvorby *o*-nitrobenzylglukuronidu, který je detekovatelný v moči a žluči potkana. Močí je *o*-nitrobenzylglukuronid vyloučen, ale přítomný *o*-nitrobenzylglukuronid ve žluči přechází do střeva, kde nastává kritický krok metabolismu. Působením střevní mikroflóry dochází k hydrolýze glukuronidu a k redukci nitroskupiny *o*-nitrobenzylalkoholu. Vzniklý *o*-aminobenzylalkohol je reabsorbován ze střeva a dále konjugační reakcí s aktivním sulfátem vzniká sloučenina, která je pravděpodobně zodpovědná za vznik aduktů s DNA. Dále byly v moči potkana po jednorázovém podání *o*-nitrotoluen nalezeny kromě kyseliny 2-nitrobenzoové a 2-nitrobenzylglukuronidu, i 2-aminobenzylalkohol, S-(2-nitrobenzyl)-*N*-acetylcystein, 2-nitrobenzylalkohol a 2-nitromethylanilin. (Jones *et al* 2003) Metabolismus 4-NT probíhá

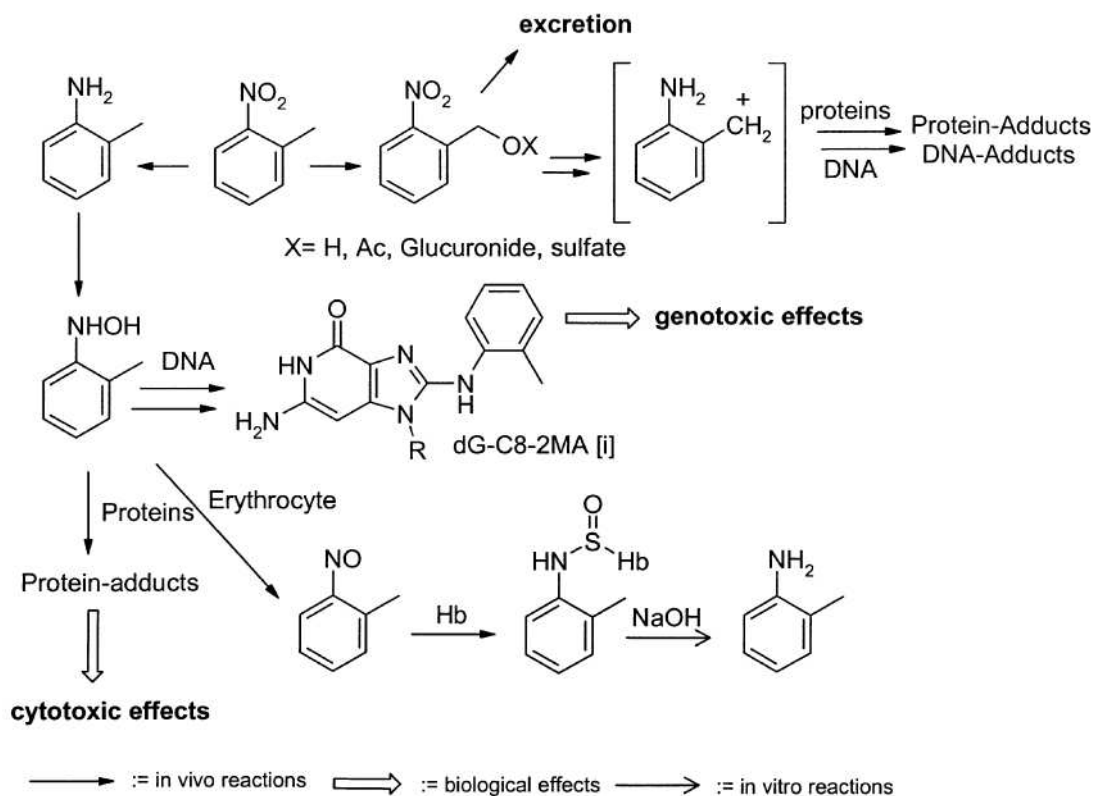
také oxidací na *p*-nitrobenzylalkohol, jehož hydroxylová skupina je alkoholdehydrogenasou přeměněna na aldehyd. Následně vzniká kyselina *p*-nitrobenzoová. Tato metabolická dráha probíhá i z menší části u *o*-nitrotoluenu. (Dunnick *et al* 2003)

V lidské moči byla po dlouhodobé expozici *o*-nitrotoluenem nalezena kyselina 2-nitrobenzoová a 2-nitrobenzylalkohol a po expozici *p*-nitrotoluenem byla nalezena kyselina 4-nitrobenzoová a 4-nitrobenzylalkohol. (Sabbioni *et al* 2006)

Bylo zjištěno, že některé nitrotolueny, zejména *o*-nitrotoluen tvoří aktivací adukty s DNA. Jak již bylo popsáno výše, pravděpodobně po odštěpení sulfátu od *o*-aminobenzylalkoholu vzniká kationt, který se váže k nukleofilním centrům DNA. (obr 32 horní metabolická dráha) (Dunnick *et al* 2003)

Adukty s DNA mohou také vzniknout z *o*-nitrotoluenu, redukcí nitroskupiny a následnou N-hydroxylací na *N*-hydroxy-2-methylanilin. Ten tvoří *in vivo* majoritní adukt s guanosem: *N*-2'-(deoxyguanosin-8-yl)-2-methylanilin (dG-C8-2MA), který byl nalezen u potkana. (Jones *et al* 2003) (obr 32)

Dále některé metabolity *o*-nitrotoluenu tvoří adukty s hemoglobinem. Po expozici *o*-nitrotoluenem a *p*-nitrotoluenem byly nalezeny v lidské krvi Hb-adukty s 2-methylanilinem (2MA) a 4-methylanilinem (4MA). Tyto dva metabolity byly získány hydrolýzou vazby hemoglobinu a metabolitu. (Sabbioni *et al* 2006) Totožné Hb-adukty byly nalezeny v krvi potkana. (Jones *et al* 2003)



obr 32: Aduky s DNA a s proteiny vzniklé aktivací *o*-nitrotoluenu *in vivo*. Jako experimentální model byl použit laboratorní potkan. (převzato z práce Jonese *et al* 2003)

V experimentu na potkanech F344/N a myších B6C3F1 bylo zjištěno, že 2-NT i 4-NT po dlouhodobém orálním podávání způsobují tvorbu maligních nádorů, ovšem karcinogenní účinky 2-NT jsou mnohokrát silnější. 2-NT způsobil tvorbu maligních nádorů mesotheliálních tkání, fibroadenomů prsních žláz a benigních nádorů kůže laboratorního potkana. Metabolity 2-NT u myši způsobily tvorbu hemangiosarkomů a adenomů jater. 4-NT iniciuje u obou hlodavců tvorbu maligních nádorů plic a karcinomů klitorisu. (Dunnick *et al* 2003)

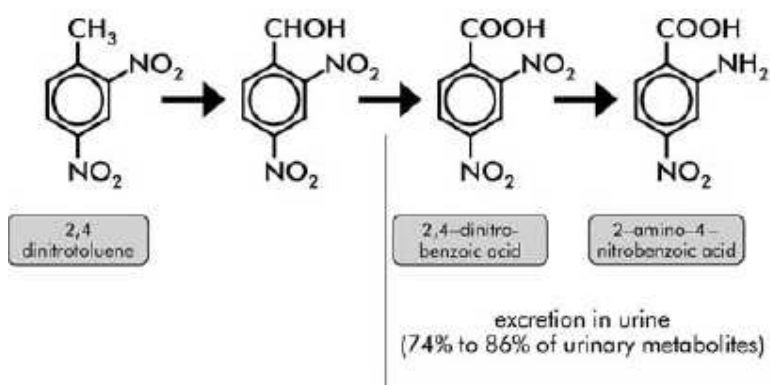
Nyní je prokázané, že obě izomerní formy nitrotoluenu mají při dlouhodobé expozici karcinogenní účinky na hlodavce. Jsou také potencionálními karcinogeny pro člověka.

4.4.2 Karcinogenní účinky dinitrotoluenů na organismy

Dinitrotolueny se hojně využívaly ve zbrojním a důlním průmyslu jako výbušnina. Objevilo se ovšem několik desítek případů výskytu karcinomu ledvin, močového měchýře

a urotheliální tkáně u horníků dlouhodobě pracujících s výbušninou, která obsahuje technický dinitrotoluen. Konkrétně se tyto případy vyskytly ve firmě těžící měď v bývalé Německé demokratické republice (NDR). (Harth *et al* 2005) Dále se objevily i případy výskytu nádorového onemocnění žlučových cest u pracovníků ve zbrojním průmyslu. (Sabbioni *et al* 2006, Jones *et al* 2005)

V případě horníků v bývalé NDR, kteří byli chronicky vystaveni působení směsi technického dinitrotoluenu, se v jejich moči detekovala zejména kyselina 2-amino-4-nitrobenzoová (2A4NBA), která je identifikována jako majoritní metabolit 2,4-DNT vyskytující se v lidské moči. Předpokládaný metabolismus 2,4-DNT na 2A4NBA v lidském těle znázorňuje obr. 33. Dochází k redukci jedné nitroskupiny na aminoskupinu a zároveň k oxidaci methylové skupiny na karboxylovou skupinu. (Harth *et al* 2005)



obr 33: Metabolismus 2,4-DNT na kyselinu 2-amino-4-nitrobenzoovou katalyzovaný lidskými enzymy.

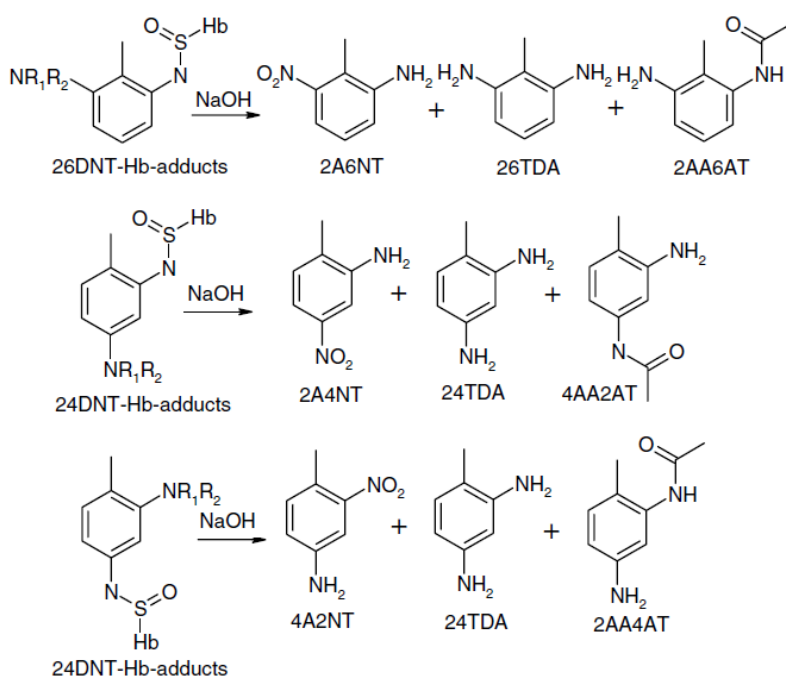
(Převzato z práce Hartha *et al* 2005)

Jiné studie uvádí, že dalšími metabolity nalezenými v moči po expozici 2,4-DNT jsou kromě již zmíněného 2A4NBA, také kyselina 4-amino-2-nitrobenzoová (4A2NBA), 2,4-dinitrobenzylalkohol (24DNBA_{lc}) a kyselina 2,4-dinitrobenzoová (24DNBA). Po expozici 2,6-DNT lze v lidské moči detekovat 2,6-dinitrobenzylalkohol (26DNBA_{lc}) a kyselinu 2,6-dinitrobenzoovou (26DNBA). (Sabbioni *et al* 2006)

Aduky s DNA vzniklé aktivací dinitrotoluenů pravděpodobně tvoří, jak již bylo řečeno v kapitole 4.4, produkty *N*-hydroxylace a oxidace methylové skupiny (analogicky jako nitrotolueny, obr. 32). Většina studií se však zabývá především tvorbou aduktů s hemoglobinem (Hb-adukty), které vznikají působením 2,4-DNT i 2,6-DNT na člověka i

potkana. Množství vzniklých aduktů s hemoglobinem totiž koreluje s genotoxickým účinkem daného karcinogenu na organismy. Experimentálním modelem byli pracovníci jedné čínské továrny (situované v provincii Liaoning) na výrobu TNT (byli vystaveni působení vysokých dávek dinitrotoluenů - meziproducty výroby). V dalším experimentu byli jako model užití laboratorní potkani, kteří byly vystaveni dinitrotoluenům ve stejné koncentraci. U obou modelů byly nalezeny stejné adukty s hemoglobinem. Po hydrolyze vazby metabolitu s hemoglobinem byl identifikován 4-amino-2-nitrotoluen (4A2NT), 2,4-toluendiamin (24TDA) (Jones *et al* 2005, Sabbioni *et al* 2006) a 4-acetylamino-2-aminotoluen (4AA2AT) jako metabolity 2,4-DNT (Jones *et al* 2005). Adukty 4A2NT s hemoglobinem byly analyzovány jako majoritní, protože jejich množství je u člověka 24 krát vyšší (u potkana 4 krát vyšší) než množství Hb-aduktů s 24TDA.

Po působení 2,6-DNT vznikly Hb-adukty, které byly hydrolyzou rozloženy na 2-amino-6-nitrotoluen (2A6NT), 2,6-toluendiamin (26TDA) (Jones *et al* 2005, Sabbioni *et al* 2006) a 2-acetylamino-6-aminotoluen (2AA6AT) (Jones *et al* 2005). Množství Hb-aduktů s 2A6NT u člověka je 20 krát vyšší (u potkana 2,1 krát vyšší) než množství Hb-aduktů 26TDA. (Jones *et al* 2005, Sabbioni *et al* 2006) (obr 34)



obr 34: Hydrolyza Hb-aduktů vzniklých působením 2,6-DNT a 2,4-DNT na člověka a potkana.

Hb-adukty s 2A4NT a s 2AA4AT nebyly detekovány.

(Převzato z práce Jonese *et al* 2005)

4.4.3 Karcinogenní účinky trinitrotoluenů na organismy

V jedné z dalších studií byly zjišťovány toxické účinky 2,4,6-trinitrotoluenu (TNT) na pracovníky čínské továrny na výrobu TNT. Bylo zjištěno, že u některých pracovníků se vyskytla anémie, hepatomegalie, splenomegalie, šedý zákal a nádory jater. Za příčinu vývoje těchto chorob jsou považovány detekované adukty s hemoglobinem, které vznikají metabolismem TNT. Pravděpodobně tyto toxické projevy expozice TNT způsobuje především adukt hemoglobinu s 4-amino-2,6-dinitrotoluenem (4ADNT), kterého vzniká desetkrát více než druhého aduktu hemoglobinu s 2-amino-4,6-dinitrotoluenem (2ADNT). (Sabbioni *et al* 2006, Sabbioni *et al* 2007) Metabolity 2,4,6-trinitrotoluenu, 4ADNT a 2ADNT, byly detekovány také v moči pracovníků. (Sabbioni *et al* 2007)

Sabbioni *et al* (2006) také porovnali množství aduktů s hemoglobinem vzniklých působením TNT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 2-NT a 4-NT na zaměstnance již zmíněné čínské továrny a modelově i na potkany. Bylo zjištěno, že největší množství Hb-aduktů detekovaných u zaměstnanců i experimentálních potkanů vzniklo působením 2,4-DNT. Aduktů hemoglobinu s metabolity TNT vzniklo čtyřikrát méně než Hb-aduktů s metabolity 2,4-DNT. Dále třetí v pořadí bylo množství Hb-aduktů s metabolity 2NT, dále pak 2,6-DNT a nejméně aduktů hemoglobinu vzniklo s metabolity 4NT. (Sabbioni *et al* 2006)

Tyto výsledky jsou ovšem v rozporu s jednou studií (Zwirner-Baier *et al* 1994 in Sabbioni *et al* 2006), která prokazuje, že působením TNT na laboratorního potkana vzniká desetkrát více Hb-aduktů s metabolity TNT oproti aduktům hemoglobinu s metabolity 2,4-DNT vzniklé působením 2,4-DNT. Bylo zjištěno porovnáním odlišností ve výsledcích obou studií, že na pracovníky čínské továrny působil při experimentu Sabbioniho *et al* (2006) až čtyřicetinasobné množství 2,4-DNT oproti TNT.

5. Závěr:

Aromatické nitrosloučeniny jsou významnými polutanty životního prostředí. Vznikají z oxidů dusíku, který je produkován při vysokoteplotních spalovacích procesech (spalování fosilních paliv, zpracování kovů), a z dalších vzdušných polutantů, zejména polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH). Jsou přítomny ve výfukových plynech produkovaných automobilovou dopravou, byly také nalezeny na povrchu vzdušných prachových částic a dále v cigaretovém kouři a v sazích vznikajících při procesu spalování dřeva. Do organismu se dostávají nejčastěji inhalací. Většina z nich vykazuje mutagenní aktivitu v bakteriálních a savčích systémech, záleží však na jejich biotransformaci a enzymech, které na ní participují. Někteří ze zástupců nitroaromátů jsou prokazatelnými karcinogeny.

2-nitroanisol a jeho redukční partner 2-anisidin jsou prokazatelnými karcinogeny hlodavců. Výzkumy působení 2-nitroanisolu na hlodavce prokazují vznik neoplastických transformací v močovém měchýři, slezině a játrech. Jeho genotoxický charakter byl prokázán nálezem aduktů s DNA zejména v močovém měchýři hlodavců. Redukční metabolismus 2-nitroanisolu vede ke vzniku aduktů s DNA. Redukcí 2-nitroanisolu za katalýzy xanthinoxidasy vznikají *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin a *o*-anisidin. *In vitro* i *in vivo* byly nalezeny 2 adukty s deoxyguanosinem, které vznikají z *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu. *o*-Anisidin je aktivován *N*-hydroxylací na stejný intermediát, *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin. *o*-Anisidin však může působením peroxidasy vytvářet radikály, ze kterých dalšími reakcemi vznikají diiminy, které jsou schopny vytvářet další adukty s DNA. Přítomnost peroxidasy v močovém měchýři je jednou z možných příčin nálezů aduktů s DNA v tomto orgánu.

Oxidační metabolismus 2-nitroanisolu byl prokázán jako detoxikační, vznikající produkty 2-nitrofenol a dihydroxynitrobenzeny netvoří adukty s DNA. Na těchto reakcích participují cytochromy P450. Nejúčinněji katalyzuje oxidaci 2-nitroanisolu izoforma lidského cytochromu P450 1A1.

4-nitroanisol je produktem metabolické methylace 4-nitrofenolu. Hojně využití 4-nitrofenolu v průmyslu a také jeho vznik při degradaci průmyslových insekticidů způsobuje jeho akumulaci v přírodních složkách. Je tedy označován jako polutant životního prostředí. Metabolismus 4-nitroanisolu a 4-nitrofenolu nebyl ještě detailně prostudován, bylo však zjištěno, že na *O*-demethylaci 4-nitroanisolu na 4-nitrofenol

participují lidské cytochromy P450 2A6 a 2E1. Přítomnost organického hydroperoxidu v buňce způsobuje zvýšení rychlosti O-demethylace.

Nitrobenzanthrony byly detekovány ve výfukových plynech automobilů a na povrchu prachových částic ve vzduchu. V Amesově testu byla prokázána jejich mutagenní aktivita, avšak lišila se u každého izomeru. Bylo zjištěno, že mutagenní aktivita každého izomeru v bakteriálních systémech závisí nejvíce na stabilitě nitréniového iontu, který je tvořen biotransformací.

3-Nitrobenzanthron je silným karcinogenem pro hlodavce, způsobuje tvorbu plicních nádorů. Aduktů s DNA vzniklé redukční aktivací 3-nitrobenzanthronu *in vivo* byly nalezeny zejména v plicích, ledvinách, slinivce břišní, tlustém střevě a játrech potkana. 3-NBA je redukován zejména cytosolárními reduktasami (XO, NQO1) na *N*-hydroxy-3-aminobenzanthron, který je genotoxický. Rozpadem této sloučeniny, nebo jeho konjugátu vzniká totiž nitréniový (popř. karbeniový) ion, který atakuje nukleofilní centra DNA. Redukčním metabolitem 3-nitrobenzanthronu je 3-aminobenzanthron, který byl nalezen v moči. Slouží tedy jako marker výskytu 3-nitrobenzanthronu v organismu.

3-Nitrobenzanthron je v savčích buňkách metabolickými přeměnami aktivován za vzniku aduktů s DNA, a to výhradně s purinovými bázemi, z nichž 70% aduktů s dGp a 30% s dAp. Aduktů tvořené aktivací 3-nitrobenzanthronu jsou persistentní. Izomer 3-nitrobenzanthronu, 2-nitrobenzanthron, se vyskytuje v ovzduší v koncentracích, několikanásobně vyšších oproti 3-nitrobenzanthronu, jeho mutagenní aktivita je však ve srovnání s 3-nitrobenzanthronem slabší. 2-Nitrobenzanthron aktivací tvoří adukty s DNA *in vivo* v plicích a játrech potkana, ale až za vysokých koncentracích 2-nitrobenzanthron.

Nitrotolueny, dinitrotolueny a trinitrotolueny jsou průmyslově využívané látky (zejména ve zbrojním průmyslu). U 2-nitrotolueny (*o*-nitrotolueny), 2,6-dinitrotolueny, 2,4-dinitrotolueny a 2,4,6-trinitrotolueny byly prokázány jejich karcinogenní účinky na zvířatech při dlouhodobém působení. Metabolickými reakcemi dochází k redukci nitroskupiny nebo k oxidaci methylové skupiny. Redukční produkty mohou podléhat *N*-oxidaci za vzniku *N*-hydroxyarylamínů, které jsou spolu s produkty oxidačních reakcí zodpovědné za genotoxický účinek nitrotoluenů (dinitrotoluenů, trinitrotoluenů). 2-Nitrotoluen po aktivaci tvoří adukty s DNA a s hemoglobinem. Jedná se o karcinogen, tvořící benigní i maligní nádory u potkana a myši. Dinitrotolueny vyvolávají působením na člověka tvorbu karcinomů ledvin, močového měchýře a urotheliální tkáně. Dále se byly zjištěny i případy nádorového onemocnění žlučových cest. Trinitrotolueny způsobují

anémii, hepatomegalii, splenomegalii, šedý zákal a nádory jater, z důvodu detekovaných Hb-aduktů.

Získáváním informací o metabolismu nitroaromátů, o jejich karcinogenních a mutagenních účinků na laboratorní zvířata, ale i na lidský organismus může do budoucna přispět ke snížení vývoje nádorových onemocnění způsobených těmito karcinogeny.

6. 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 pancreas, *Carcinogenesis*, **18**, 1085–1092 (1997)

M. R. Anari, S. Khan, Z. C. Liu, P. J. O'Brien; Cytochrome P450 peroxidaseperoxygenase mediated xenobiotic metabolic activation and cytotoxicity in isolated hepatocytes, *Chemical Research in Toxicology*, **8**, 997-1004 (1995)

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, C. J. Henderson, C. R. Wolf, H. H. Schmeiser, D. H. Phillips, M. Stiborova; Bioactivation of 3-aminobenzanthrone, a human metabolite of the environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone: evidence for DNA adduct formation mediated by cytochrome P450 enzymes and peroxidases, *Cancer Letters*, **234**, 220–231 (2006)

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

J. K. Dunnick , L. T. Burka, J. Mahler, R. Sills; Carcinogenic potential of *o*-nitrotoluene and *p*-nitrotoluene, *Toxicology*, **183**, 221-234 (2003)

K. El-Bayoumy, D. Desai, T. Boyiri, J. Rosa, J. Krzeminski, A. K. Sharma, B. Pittman, S. Amin; Comparative tumorigenicity of the environmental pollutant 6-nitrochrysene and its metabolites in the rat mammary gland, *Chemical Research in Toxicology*, **15**, 972-978 (2002)

H. Glatt, W. Mehl; Use of genetically manipulated *Salmonella typhimurium* strains to evaluate the role of sulfotransferases and acetyltransferases in nitrofen mutagenicity, *Carcinogenesis*, **25**, 779-786 (2004)

- V. Harth, M. B. Hermann, T. Brüning; Cancer of the urinary bladder in highly exposed workers in the production of dinitrotoluenes: a case report, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **78**, 677–680 (2005)
- A. B. Ishaque, C. Timmons, F. V. Ballard, C. Hupke, K. Dulal, L. R. Johnson, T. M. Gerald, D. Boucaud, P. B. Tchounwou; Cytotoxicity of dinitrotoluenes (2,4-DNT, 2,6-DNT) to MCF-7 and MRC-5 cells, *International Journal Environmental Research and Public Health*, **2**, 304-307 (2005)
- B. C. Jones, C. A. Tyman, D.A. Smith; Identification of the cytochrome P450 isoforms involved in the O-demethylation of 4-nitroanisole in human liver microsomes, *Xenobiotica*, **27**, 1025-1037 (1997)
- C. R. Jones, A. Beyerbach, W. Seffner, G. Sabbioni; Hemoglobin and DNA adducts in rats exposed to 2-nitrotoluene, *Carcinogenesis*, **24**, 779–787 (2003)
- C. R. Jones, Yu-Ying Liu, O. Sepai, H. Yan, G. Sabbioni; Hemoglobin adducts in workers exposed to nitrotoluenes, *Carcinogenesis*, **26**, 133-143 (2005)
- P. F. Landrum, D. G. Crosby; Comparison of the disposition of several nitrogen-containing compounds in the sea urchin and other marine invertebrates, *Xenobiotica*, **11**, 351-361 (1981)
- D. Malejka-Giganti, D. R. Parkin, R. W. Decker, G. A. Niehans, R. L. Bliss, M. I. Churchwell, F. A. Beland; Tumorigenicity and genotoxicity of an environmental pollutant 2,7-dinitrofluoren after systemic administration at a low dose level to female rats, *International Journal of Cancer*, **122**, 1958–1965 (2008)
- S. P. Mazur, A.Y. Petrenko; Sex differences in biotransformation of the xenobiotic p-nitroanisole in isolated rat hepatocyte under the influence of phenobarbital, *Biochemistry (Moscow)*, **62**, 362-363 (1997)

M. Mikšanová, M. Šulc, H. Rýdlová, H. H. Schmeiser, E. Frei, M. Stiborová; Enzymes involved in the metabolism of the carcinogen 2-nitroanisole: evidence for its oxidative detoxication by human cytochromes P450, *Chemical Research in Toxicology*, **17**, 663-671 (2004)

J. Mizerovská, H. Dračínská, V. M. Arlt, J. Hudeček, P. Hodek, H. H. Schmeiser, E. Frei, M. Stiborová; Rat cytochromes P450 oxidize 3-aminobenzanthrone, a human metabolite of the carcinogenic environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone, *Interdisciplinary Toxicology*, **1**, 150–154 (2008)

M. Murata, S. Ohnishi, K. Seike, K. Fukuhara, N. Miyata, S. Kawanishi; Oxidative DNA damage induced by carcinogenic dinitropyrenes in the presence of P450 reductase, *Chemical Research in Toxicology*, **17**, 1750-1756 (2004)

E. Nagy, M. Zeisig, K. Kawamura, Y. Hisamatsu, 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 vitro* and *in vivo*; *Mutagenesis*, **22**, 135–145 (2007)

K. Naiman, H. Dračínská, M. Dračínský, M. Martínková, V. Martínek, P. Hodek, M. Štícha, E. Frei, M. Stiborová; Cytochrome P450-mediated metabolism of *N*-(2-methoxyphenyl)-hydroxylamine, a human metabolite of the environmental pollutants and carcinogens *o*-anisidine and *o*-nitroanisole, *Interdisciplinary Toxicology*, **1**, 218–224 (2008)

S. Ning, Xu Xiaobai; Reductive metabolism of 4-nitrobiphenyl by rat liver fraction, *Carcinogenesis*, **18**, 1233–1240 (1997)

M. C. Poitier, R. M. Santella, A. Weston; Carcinogen macromolecular adducts and their measurement, *Carcinogenesis*, **21**, 353-359 (2000)

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

C. L. Ritter, S. J. Culp, J. P. Freeman, M. M. Marques, F. A. Beland, D. Malejka-Giganti; DNA adducts from nitroreduction of 2,7-dinitrofluorene, a mammary gland carcinogen, catalyzed by rat liver or mammary gland cytosol, *Chemical Research in Toxicology*, **15**, 536-544 (2002)

H. Rýdlová, M. Mikšanová, H. Ryšlavá, M. Stiborová; Carcinogenic pollutants *o*-nitroanisole and *o*-anisidine are substrates and inducers of cytochromes P450, *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacký University, Olomouc, Czech Republic*, **149**, 441-447 (2005)

G. Sabbioni, C. R. Jones, O. Sepai, A. Hirvonen, H. Norppa, H. Järventaus, H. Glatt, D. Pomplun, H. Yan, L. R. Brooks, S. H. Warren, D. M. De Marini, Y. Y. Liu; Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility in workers exposed to nitrotoluenes, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **15**, 559-566 (2006)

G. Sabbioni, O. Sepai, H. Norppa, H. Yan, A. Hirvonen, Y. Zheng, H. Järventaus, H. Bäck, L. R. Brooks, S. H. Warren, D. M. de Marini, Y.Y. Liu; Comparison of biomarkers in workers exposed to 2,4,6-trinitrotoluene, *Biomarkers*, **12**, 21-37 (2007)

A. Schäfer, H. Harms, A. J. Zehnder; Biodegradation of 4-nitroanisole by two *Rhodococcus* spp; *Biodegradation*, **7**, 249-255 (1996)

B. A. Smith, N. F. Fullerton, R. H. Heflich, F. A. Belaud; DNA adduct formation and T-lymphocyte mutation induction in F344 rats implanted with tumorigenic doses of 1,6-dinitropyrene, *Cancer Research*, **55**, 2316-2324 (1995)

M. Stiborová, J. Hudeček, P. Hodek, E. Frei; Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví, *Chemické Listy*, **93**, 229-237 (1999)

- M. Stiborová; Onemocnění ledvin z čínských bylin, *Vesmír*, **79**, 493-495 (2000)
- M. Stiborová, M. Mikšanová, V. Havlíček, H. H. Schmeiser, E. Frei; Mechanism of peroxidase-mediated oxidation of carcinogenic *o*-anisidine and its binding to DNA, *Mutation Research*, **500**, 49-66 (2002)
- M. Stiborová; Aromatické nitrosloučeniny: kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka, *Chemické Listy*, **96**, 784-791 (2002 a)
- M. Stiborová; Škodlivé aromatické nitrosloučeniny, *Vesmír*, **81**, 683-685 (2002 b)
- M. Stiborová, M. Mikšanová, S. Smrček, C. A. Bieler, A. Breuer, K. A. Klokow, H. H. Schmeiser, E. Frei; Identification of a genotoxic mechanism for 2-nitroanisole carcinogenicity and of its carcinogenic potential for humans, *Carcinogenesis*, **25**, 833-840 (2004 a)
- M. Stiborová, J. Hudeček, J. Páca Jr., V. Martínek, J. Páca; Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí, *Chemické Listy*, **98**, 876 – 890 (2004 b)
- 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, *Biomedical papers of the Medical Faculty of Palacký University, Olomouc, Czech Republic*, **149**, 191–197 (2005)
- M. Stiborová, E. Frei, V. M. Arlt, H. H. Schmeiser; Metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid, a risk factor for Balkan endemic nephropathy, *Mutation Research*, **658**, 55-67 (2008)
- M. Stiborová, K. Naiman, M. Martínková, V. Martínek, M. Svobodová, H. H. Schmeiser, E. Frei; Genotoxic mechanisms for the carcinogenicity of the environmental pollutants and carcinogens *o*-anisidine and 2-nitroanisole follow from adducts generated by their

metabolite *N*-(2-methoxyphenyl)-hydroxylamine with deoxyguanosine in DNA, *Interdisciplinary Toxicology*, **2**, 24–27 (2009)

M. Stiborová, V. Martínek, M. Svobodová, J. Šístková, Z. Dvořák, J. Ulrichová, V. Šimánek, E. Frei, H. H. Schmeiser, D. H. Phillips, V. M. Arlt; Mechanisms of the different dna adduct forming potentials of the urban air pollutants 2-nitrobenzanthrone and carcinogenic 3-nitrobenzanthrone, *Chemical Research in Toxicology*, **23**, 1192–1201 (2010)

M. Svobodová, J. Šístková, H. Dračínská, J. Hudeček, P. Hodek, H. H. Schmeiser, V. M. Arlt, E. Frei, M. Stiborová; Reductive activation of environmental pollutants 3-nitrobenzanthrone and 2-nitrobenzanthrone, *Chemické Listy* **101**, 73–310 (2007)

M. Svobodová, H. Dračínská, M. Martínková, J. Hudeček, P. Hodek, E. Frei, M. Stiborová; Oxidation of carcinogenic 2-nitroanisole by rat cytochromes P450 – similarity between human and rat enzymes, *Interdisciplinary Toxicology*, **1**, 182-185 (2008)

M. Svobodová, M. Martínková, E. Frei, M. Stiborová; Identification of human enzymes oxidizing a human metabolite of carcinogenic 2-nitroanisole, 2-nitrophenol. Evidence for its oxidative detoxification by human cytochromes P450, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **75**, 703–719 (2010)

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

H. Teramoto, H. Tanaka, H. Wariishi; Degradation of 4-nitrophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **66**, 312–317, (2004)

G. A. Umbuzeiro, A. Franco, M. H. Martins, F. Kummrow, L. Carvalho, H. H. Schmeiser, J. Leykauf, M. Stiborova, L. D. Claxton; Mutagenicity and DNA adduct formation of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from Sao Paulo, Brazil, *Mutation Research*, **652**, 72–80 (2008)

K. C. Williamson, S. L. Shofer, R. S. Tjeerdema; Toxicokinetics and biotransformation of p-nitrophenol in the black turban snail (*Tegula funebris*), *Aquatic Toxicology*, **33**, 113-123 (1995)

H. Yamazaki, N. Hatanaka, R. Kizu, K. Hayakawa, N. Shimada, F. P. Guengerich, M. Nakajima, T. Yokoi; Bioactivation of diesel exhaust particle extracts and their major nitrated polycyclic aromatic hydrocarbon components, 1-nitropyrene and dinitropyrenes, by human cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1, *Mutation Research*, **472**, 129–138, (2000)

<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, (10.3. 2011)

