

# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Biochemie



**Dorota Zawadová**

## **Aktivace karcinogenů v trávicím traktu**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2011

## Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá studiem aktivace heterocyklických aminů (HAA). Tyto látky vykazují četné karcinogenní účinky na zkoumaných zvířatech i lidských buňkách. Tyto karcinogeny jsou tvořeny během tepelného zpracování masa nebo během kouření cigaret. Pro vyvolání jejich karcinogenních účinků je potřebná jejich předešlá aktivace. Většina HAA je nejdříve aktivována cytochromem P450 (CYP), zvláště podrodinou 1A1 a 1A2. Po aktivaci těmito enzymy vzniknou N-hydroxylaminy, které reagují s DNA pouze slabě. Pro snadnější tvorbu DNA aduktů je požadována další aktivace těchto metabolitů na reaktivnější acetátové a sulfátové estery. Tyto estery jsou tvořeny sulfotransferasou (SULT) a N-acetotransferasou (NAT). Ovlivněním těchto enzymů můžeme pozitivně regulovat vznik karcinomů. Za silný inhibitor jedné z podrodiny SULT (fenolové sulfotransferasy P-PST) je považována kyselina kávová. Za dobré inhibitory NAT je považován quercetin.

**Klíčová slova:** Heterocyklické aminy, biotransformace, cytochrom P450, sulfotransferasa, N-acetyltransferasa

## Abstract

HAA are compounds which are showing numerous carcinogenic impacts on studied animals even human cells. These carcinogenes arise during the heat processing of meat or during (cigarette) smoking. Activation of these compounds is required to their carcinogenic effect. Most of all HAA are first activated by cytochrome P450 (CYP) especially subfamily 1A1 and 1A2. As a consequence of activation with these enzymes are created N-hydroxylamines, which weakly reacting with DNA. For better formation of DNA adducts one more activation is essential. More reactive acetate and sulphate esters arise by second activation from N-hydroxylamines. The esters are produced by sulphotransferase (SULT) even N-acetotransferase (NAT).

When we affect these enzymes we could positive control the formation of carcinoma.

Caffeic acid is considered as a strong inhibitor of one SULT subfamily (phenolic sulfotransferase P - PST). On the other side as a good inhibitor of NAT is considered (known) quercetin. (in czech)

**Key words:** Heterocyclic amine, biotransformation, cytochrome P450, sulfotransferase, N-acetyltransferase

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze 2.9. 2011

.....  
podpis

## Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za vedení a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za výchovu a bezmeznou podporu při studiu. Za cenné rady, jazykovou úpravu textu a motivaci bych chtěla poděkovat Mgr. Zbigniewu Zawadovi a RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi Ph.D. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým přátelům za psychickou podporu při psaní této práce.

## Seznam zkratek

<i>A<math>\alpha</math>C</i>	2-amino-9H-dipyrido[2,3-b]indol
AIA	aminoimidazo-azaaren
APS	adenosin 5'-phosphosulfát
ATP	adenosintrifosfát
CoA	koenzym A
CYP	cytochrom P450
DDT	dichlordifenyltrichlormethylmethan
EST	estrogen sulfotransferase
Glu-P-2	2-amino-dipyrido[1,2-a:3',9'-d]imidazol
GST	glutathion S-transferasa
HAA	heterocyklické aromatické aminy
HCA	heterocyklické aminy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HST	heparan sulfat O-sulfotransferase
<b>IQ</b>	2-amino-3-methyl-imidazo
IQx	2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline
MeA $\alpha$ C	2-amino-3-methyl-9H-dipyrido[2,3-b]indol
MeIQ	2-amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline
MFO	mikrosomální monooxygenasy se smíšenou funkcí
M-PST	monoamin sulfotransferase
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NAT	N-acetyltransferasa
n.d.	not detectable
OATP	organické anionty přenášející polypeptidy
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PAS	kyselina p-aminosalicylová
Phe-P-1	2-amino-5-phenylpyridin
PhIP	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine
P-PST	phenol sulfotransferase
SMZ	sulfamethazin
SULT	sulfotransferasa

TD <sub>50</sub>	střední toxická dávka
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[3,4-b]indol
Trp-P-2	3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol
4-MeIQx	2-amino-3,4-dimethylimidazo-[4,5-f]quinoline
4,8-DiMeIQx	2-amino-3,4,8 trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline
8-MeIQx	2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline

# Obsah

1. Cíl práce
  2. Úvod
  3. Karcinogeny
    - 3.1. Potravní karcinogeny
      - 3.1.1. Heterocyklické aminy
        - 3.1.1.1. Syntéza heterocyklických aromatických aminů
        - 3.1.1.2. Mutagenní, karcinogenní a genotoxické účinky HAA
  4. Biotransformace
    - 4.1. I. fáze
      - 4.1.1. Cytochrom P 450
        - 4.1.1.1. Nomenklatura
        - 4.1.1.2. Funkce
    - 4.2. II. fáze
      - 4.2.1. Sulfotransferasa
        - 4.2.1.1. Biologická funkce sulfatace
        - 4.2.1.2. Indukce
        - 4.2.1.3. Inhibice
        - 4.2.1.4. Aktivace
      - 4.2.2. N-acetyltransferasa
        - 4.2.2.1. Funkce
        - 4.2.2.2. Inhibice
  5. Závěr
- Použitá literatura



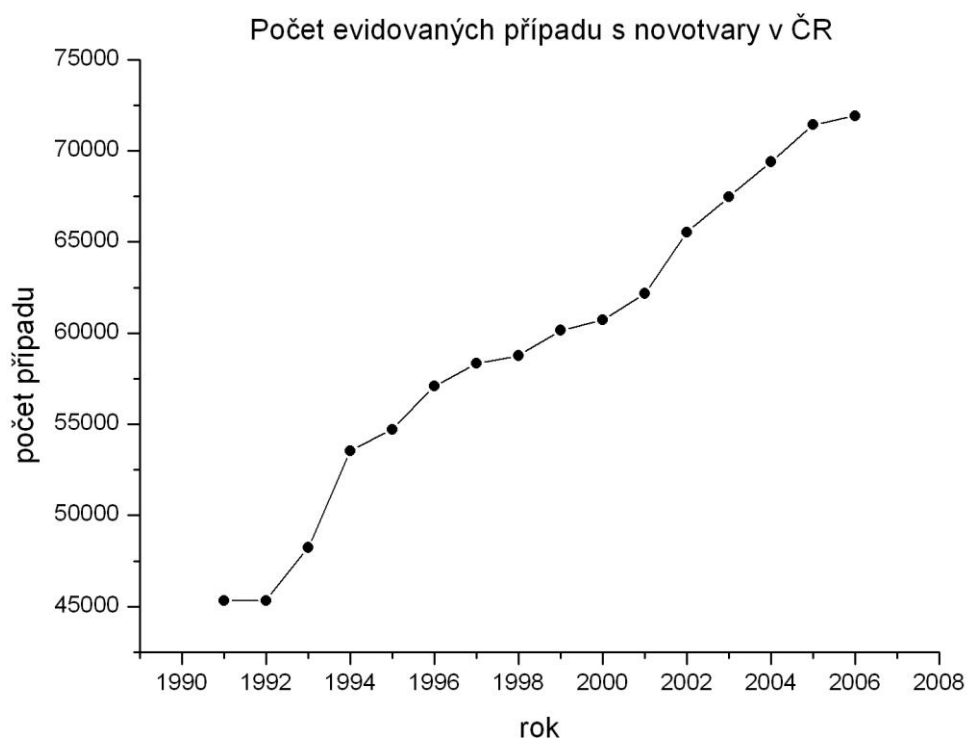
# 1. Cíl práce

Cílem této přehledové práce je krátké obeznámení s problematikou častého vzniku nádorových onemocnění a jejich vysoké mortality. Z řady karcinogenních látek se zaměřujeme zejména na heterocyklické aminy, které jsou častým původcem vzniku karcinomů trávicího ústrojí (gastrointestinálního traktu). Nosným prvkem této práce je seznámení s pochody biotransformace xenobiotik se zvláštním zaměřením na aktivaci heterocyklických aminů v trávicím traktu. Práce se zaměřuje hlavně na dva enzymy druhé fáze biotransformace, sulfotransferasu a N-acetyltransferasu.

## 2. Úvod

V dnešní době jsou nádorová onemocnění jednou z nejčastějších nemocí, navíc s velmi vysokou mortalitou. Mezi evropské státy, které jsou nejvíce postižené tímto onemocněním, bezpochyby patří: Česká republika, Polsko, Maďarsko nebo Dánsko [Levi a kol., 2004].

V roce 2009 tvořila nádorová onemocnění více než 26,1 % úmrtí v České republice, z čehož 5,8 % byly karcinomy zažívacího traktu [<http://www.euro.who.int>]. Bližší informace o značném nárůstu evidovaných pacientů s tímto onemocněním ukazuje obr. 1 [<http://www.czso.cz>].



**Obr. 1:** *Nárůst počtu evidovaných případů s nádorovým onemocněním v ČR od roku 1991 do roku 2006 Zpracované výsledky na základě statistik českého statistického úřadu.*

Mezi hlavní příčiny vzniku karcinomu patří kouření, konzumace alkoholu, vystavení UV záření, genetické predispozice a expozice karcinogenům. Za další možné faktory zvyšující riziko rakoviny se považují obezita a nedostatek pohybu. Pro vznik

karcinomů žaludku a střev je pak zvláště závažná nevhodná životospráva a zejména špatné stravovací návyky.

Účinnou chemoprevenci můžeme výrazně snížit riziko aktivace karcinogenů. Podle směrnic společností The American Cancer Society, můžeme zvýšením fyzické aktivity, snížením konzumace alkoholických nápojů a úpravou našeho jídelníčku tak, aby byl tvořen převážně potravinami z rostlinných zdrojů a obsahoval minimum tučných výrobků, sami omezit vznik nádorových onemocnění [Dresbach, Rossi, 1998]. Mezi další potraviny, jejichž spotřebu bychom měli zvýšit, bezpochyby patří: ovoce (hlavně citrusové) a zelenina, zde zejména česnek a cibule nebo fazole. Snížením rizika aktivace karcinogenů docílíme i pitím čajů a užíváním rostlinných výtažků, které obsahují inhibitory karcinogeneze [Dresbach, Rossi 1998; Wattenberg, 1996].

Chemopreventivní látky můžeme definovat jako sloučeniny, které svým působením zasahují do počátečních stádií tumorogeneze. Tyto látky mohou působit buď jako blokující nebo tlumící agens [Dresbach, Rossi 1998]. V prvním případě jde o látky, které svým působením zabrání vstupu karcinogenních látek do cílové tkáně nebo zabrání jejich interakci s cílovou tkání. Mechanismus jejich působení je založený na předcházení aktivace karcinogenu, indukci zvýšené aktivity detoxikačních enzymů nebo zachycení karcinogenů ještě než začne působit na cílovou tkáň. Do druhé skupiny patří tlumící agens, jejichž účinek začíná až po poškození tkáně karcinogenními látkami. Je známo několik mechanismů jejich působení. Některé podporují diferenciaci buněk, jiné zmírňují genotoxické účinky, zejména zabraňují aktivaci onkogenu, další pak selektivně inhibují proliferaci potenciálně maligních buněk [Wattenberg, 1996].

Bylo zkoumáno mnoho látek, u kterých se předpokládalo chemopreventivní použití, ale u většiny z nich byla prokázána vysoká toxicita např. pro gastrointestinální trakt, kostní dřeň, srdce, plíce, mozek nebo ledviny. Kromě minimální krátkodobé toxicity je nutné, aby látka nebyla dlouhodobě toxická, byla vysoce účinná, snadno aplikovatelná a pokud možno cenově dostupná [Dresbach, Rossi 1998]. Mezi látky používané v chemoprevenci patří: retinoidy (deriváty vitamínu A), deltanoidy (deriváty vitamínu D<sub>3</sub>), antiestrogeny a nesteroidní antirevmatika. Časté použití má také oltipraz nebo finasterid [Klener, 2002].

Chemopreventivní terapeutika jsou určena pro dvě skupiny lidí. Do první patří lidi s vysokým rizikem vzniku nádoru, ať už z důvodu genetické predispozice, profesní expozici karcinogenům nebo zvýšením ostatních rizik [Wattenberg, 1996]. Ve druhé

skupině jsou pacienti, kteří v minulosti prodělali nádorové onemocnění a u kterých lze očekávat recidivu.

Jako jedna z dalších možností prevence nádorových onemocnění jsou preventivní prohlídky u lékaře, zvláště u osob se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu. Tato vyšetření jsou zvláště vhodná u karcinomů, při jejichž vzniku může včasný nález výrazně zvýšit šanci na uzdravení nebo u karcinomů, kterými je potenciálně ohrožena podstatná část populace. Do těchto skupin patří zejména nádor prsů, kolorektální karcinom, nádor děložního čípku, karcinom prostaty a maligní melanom [Klener].

## 3. Karcinogeny

Karcinogeny jsou látky organického nebo neorganického původu, které svým působením na organismus (přímým nebo po metabolické přeměně) vyvolávají vznik novotvarů. Přičemž ke vzniku maligního onemocnění může dojít až po mnohaleté expozici. Dosud bylo identifikováno přes 3000 karcinogenů. Většina z nich pochází z průmyslu, odkud se dostává do životního prostředí. Karcinogeny mohou být přijaty organismem různým způsobem, např. konzumací potravy, pitné vody, vdechovaným vzduchem nebo penetrací přes kůži [Stratil a Kubáň, 2004 ].

Oficiální databázi karcinogenů vede Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC – International Agency for Research on Cancer)

1. Prokázaný karcinogen pro člověka (např. azbest nebo látky v tabákovém kouři)
- 2.a Pravděpodobný karcinogen pro člověka (např. ethylenoxid)
- 2.b Látky podezřelé z karcinogenního účinku na člověka (např. DDT)
3. Látky, které nemůžeme hodnotit pro nedostatek informací
4. Látky, u kterých se předpokládá, že nemají karcinogenní účinek na člověka

### 3.1. Potravní karcinogeny

V potravě se většinou vyskytuje jen malé množství těchto látek. Jejich výskyt může být přirozený, nebo vzniknou kontaminací potravy nebo jejím tepelným zpracováním. U této skupiny látek je jejich karcinogenní schopnost často spojena s určitou chemickou strukturou nebo funkční skupinou. Významné organické karcinogeny většinou patří do těchto skupin látek [Rademacher, 1975.]:

- Kondenzované aromatické uhlovodíky a jejich heterocyklické N-, O-, a S- analogy
- N-nitrosloučeniny
- Aromatické aminy, nitrosloučeniny a azosloučeniny
- Alifatické hydraziny, azosloučeniny a azoxysloučeniny

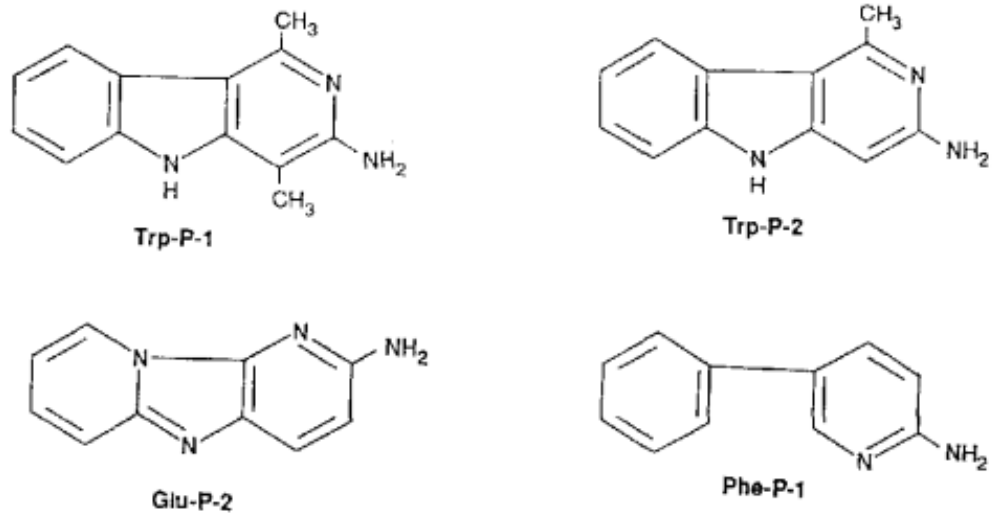
- Některé alkylující a další sloučeniny jako např.  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2=\text{CHCl}$ ,  $\text{CH}_2=\text{CCl}_2$ ,  $\text{CH}_2=\text{CH-CHO}$  a jiné

### 3.1.1. Heterocyklické aminy

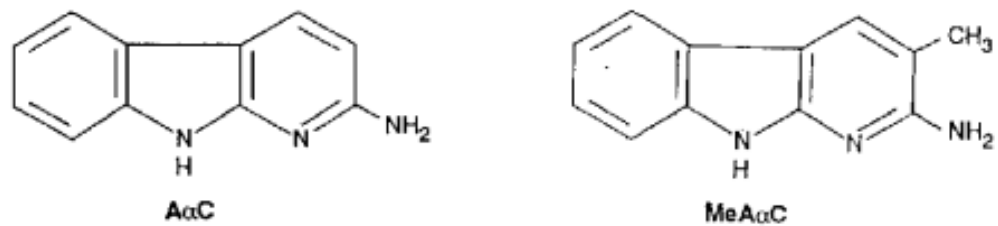
Jak již bylo uvedeno v úvodu, potrava je jeden z faktorů, který může ovlivnit vznik karcinomu. Jednou z významných skupin látek, které mohou mít podíl na vzniku tohoto onemocnění, jsou heterocyklické aromatické aminy (HAA). U těchto látek byla prokázána schopnost tvořit četné karcinomy v krysích modelech [Ohgaki a kol., 1991]. Vzhledem ke schopnosti těchto látek způsobit mutace somatických buněk a navodit nádorové onemocnění ve zvířecích modelech, jsou tyto látky spojovány s indukcí nádorových onemocnění spojených s potravou.

Za průkopníky v objevu HAA jsou považováni Sugimura a kol. společně s Nagao a kol., kteří v roce 1977 objevili přítomnost těchto látek v grilované rybě, hovězím steaku a kouří vytvářeném během grilování těchto potravin [Sugimura a ko., 1977; Nagao a kol., 1977]. Podle jejich tvrzení mohou být tyto mutageny vytvořeny pyrolýzou proteinu a aminokyselin obsažených v mase. [Snyderwine, 1994]. Všechny tyto látky obsahují aminoskupinu připojenou k pyridinovému kruhu (struktura těchto látek viz obr. 2). V roce 1978 Commoner a kol. zaznamenali tvorbu dodatečných mutagenů v tepelně zpracovaném hamburgeru a hovězím extraktu [Commoner a kol., 1978]. Od jejich objevu bylo klasifikováno mnoho mutagenů, které mají aminoskupinu připojenou na imidazolový kruh a tudíž byly klasifikovány jako imidazolové mutageny [Kasai a kol., 1980] (viz obr. 3).

## Aminokyseliny vzniklé pyrolýzou



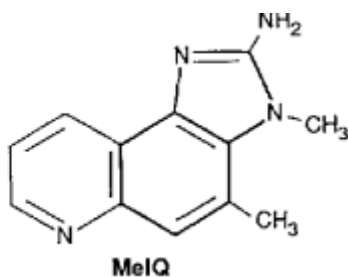
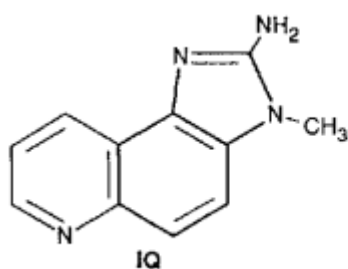
## Proteiny vzniklé pyrolýzou



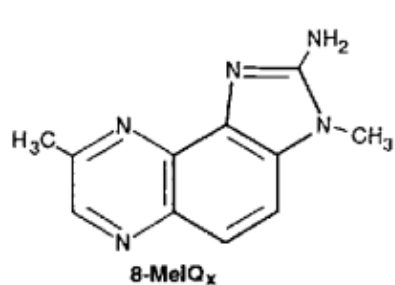
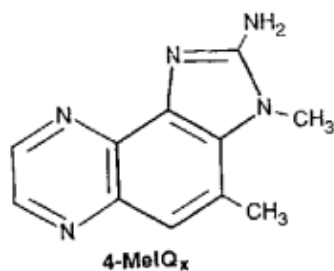
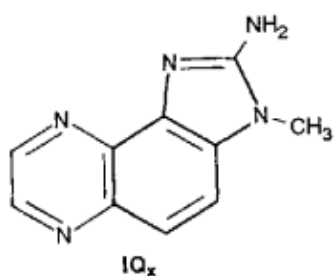
**Obr. 2: Struktura některých pyridinových heterocyklických aminů (přejato a upraveno od Snyderwine, 1994)**

*Trp-P-1: 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[3,4-b]indol; Trp-P-2: 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole; Glu-P-2: 2-amino-dipyrido[1,2-a:3',9'-d]imidazol; Phe-P-1: 2-amino-5-phenylpyridin; AαC: 2-amino-9H-dipyrido[2,3-b]indol; MeAαC: 2-amino-3-methyl-9H-dipyrido[2,3-b]indol*

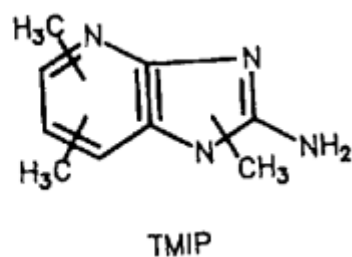
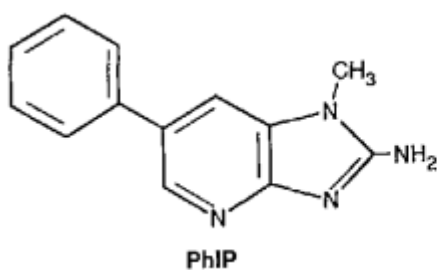
## Quinoliny



## Quinoxaliny



## Pyridiny



Obr.3: Struktura některých imidazolových heterocyklických aminů (přejato a upraveno od Snyderwine, 1994)

*IQ*: 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-*f*]quinoline; *MeIQ*: 2-amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-*f*]quinoline; *IQ<sub>x</sub>*: 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-*f*]quinoxaline; 4-*MeIQ<sub>x</sub>*: 2-amino-3,4-



*dimethylimidazo-[4,5-f]quinoline; 8-MeIQx: 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline 4,8-DiMeIQx: 2-amino-3,4,8 trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline; PhIP: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine*

### 3.1.1.1. Syntéza heterocyklických aromatických aminů

Jak již bylo uvedeno výše, vznikají tyto látky během tepelného zpracování látek bohatých na bílkoviny. První skupina HAA vzniká během pyrolýzy při teplotě > 250 °C jednotlivých aminoskupin, jako např. tryptofanu, glutamové kyseliny nebo fenylalaninu nebo zahřátím proteinů na vysokou teplotu [Sugimura a kol., 2004]. Pyrolytické HAA mohou vznikat i během kouření cigaret (rovněž vysoká teplota, katalyzující jejich vznik). Mezi nejčastější HAA vzniklé při tomto procesu patří: AαC a MeAαC [Yoshida a Matsumoto, 1980]. Hlavním těchto HAA jsou aminokyseliny nebo proteiny. Jejich tvorba není závislá na kreatinu a mohou být produkovány z jídla jak zvířecího tak rostlinného původu [Jagerstad A kol. 1998]. Nejpopulárnější hypotézou vysvětlující tvorbu těchto HAA je teorie založená na reakci volných radikálů, produkujících mnoho reaktivních fragmentů, které mohou dále kondenzovat a utvořit novou strukturu [Skog a kol., 2000].

Druhá skupina HAA je tvořena v tepelně zpracovaném masu při teplotách v rozmezí 150-250 °C (teplota běžně využívána v domácnostech). Prekurzorem pro tyto HAA jsou aminokyseliny, cukry a kreatin. 2-amino-N-methylimidazolová část HAA je tvořena z kreatinu, zbývající části HAA (např. pyridiny nebo pyraziny) jsou tvořené pomocí Streckerové degradace tvořené v Maillardové reakci mezi hexózou a aminokyselinou [Jagerstad a kol. 1991]. Podle obecných předpokladů je za spojení těchto dvou částí zodpovědná aldolová kondenzace, která pomocí aldehydu nebo související Schiffové báze, spojí tyto molekuly do 2-amino-N-methyl-imidazoquinolinové nebo 2-amino-N-methyl-imidazoquinoxalinové struktury.

Mezi kritické faktory mající vliv na tvoření HAA (v tepelně zpracovaném masu) patří teplota, při které je maso zpracováváno, doba zpracování nebo jeho metoda. Mezi metody, během kterých se tvoří nejvíce HAA, patří smažení na pánvi nebo grilování. Důležitou roli hraje i typ masa. Obecně je největší produkce HAA v libovém masu (hovězí, ryby, kuře, vepřové atd.). Mezi nejčastější sloučeniny v tepelně zpracovaném masu patří:

PhIP a A $\alpha$ C, následované 8-MeIQx (další sloučeniny viz tab. 1) [Felton a kol., 1984; Felton a kol., 1986].

**Tab. 1: Množství heterocyklických aminů obsažených ve vybraných jídlech (přejato a upraveno od Snyderwine, 1994)**

Sloučenina	Jídlo	Množství (ng/g)
<b>A<math>\alpha</math>C</b>	Smažený hovězí steak	3,2-8,8
	Smažený losos	n.d.-9,0
	Pečený losos	n.d.
	Grilovaný losos	2,8-109,0
	Grilované hovězí	651
<b>PhIP</b>	Smažené sekané hovězí	15
	Smažený hovězí steak	23,5-48,5
	Smažený losos	1,7-23,0
	Pečený losos	n.d.-18,0
	Grilovaný losos	2,0-73,0
<b>8-MeIQx</b>	Uzená sušená makrela	0,8
	Smažené sekané hovězí	0,1-2,4
	Smažený losos	1,4-5,0
	Smažený hovězí steak	5,1-8,3
<b>4,8-DiMeIQx</b>	Smažené sekané hovězí	0,06-1,2
	Smažený hovězí steak	1,3-2,0
	Uzená sušená makrela	0,08
<b>IQ</b>	Grilované sardinky	4,9-20,0
	Grilovaný losos	0,3-1,8
	Smažené sekané hovězí	0,02-0,6
<b>4-MeIQ</b>	Grilovaný losos	0,6-3,1
	Grilované sardinky	16,6

*n.d.: not detectable*

### 3.1.1.2. Mutagenní, karcinogenní a genotoxické účinky

#### HAA

Pro utvoření DNA-aduktů a mutagenního nebo genotoxického účinku HAA je nutná jejich dřívější metabolická aktivace [Snyderwine, 1994] (tento proces bude podrobně popsán v kapitole biotransformace).

Podle četných testů *in vitro* byly prokázány mutagenní účinky těchto látek. U testů prováděných *in vivo* nebyly výsledky vždy zcela jednotné, za což jsou pravděpodobně zodpovědné faktory jako např. typ a pohlaví zvířat nebo typ cílového orgánu/tkáně vybraného pro vyhodnocení mutačního spektra. Ve studiích s původními HAA (namísto jejich aktivovaných metabolitů) jako domnělých mutagenů, může dojít k ovlivnění výsledků rozdílnou schopností metabolické aktivace aplikovaných HAA u jednotlivých zvířecích modelů. Za kvantitu konečné mutagenní aktivity jsou zodpovědné faktory jako: délka expozice nebo čas potřebný k vytvoření DNA-aduktů a pro konverzi takových aduktů do detekovatelných mutačních výsledků. Podle obecných předpokladů je pro vznik DNA-aduktů navrhováno 24h, jako dostatečná doba, zatímco pro tvorbu aduktů indukujících trvalé změny v sekvenci bázi, je potřeba několik týdnů [Davis a kol., 1996]. Na základě těchto poznatků je zdůrazňováno riziko pravidelné konzumace dobře zpracovaného masa. Redukce podílu a frekvence konzumace těchto jídel, je považováno za protekční opatření proti mutagenезi spojenou s HAA.

Dodatečně k jejím mutagenním účinkům *in vitro* byly u hlodavců prokázány karcinogenní účinky těchto látek [Kato a kol., 1989]. Konstantní podávání HAA dospělým potkanům a myším, způsobilo u jednoho nebo obou druhů, u všech testovaných sloučenin: Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, MeA $\alpha$ C, A $\alpha$ C, 4-MeIQ a 8-MeIQx s výjimkou PhIP, vznik hepatokarcinomů. U PhIP bylo prokázáno, že při jeho dlouhodobém podávání potkanům, způsobuje vznik karcinomu prsních žláz a tlustého střeva [Ito a kol., 1991]. Stejně karcinogenní účinky u potkanů měly i IQ a MeIQ [Tanaka a kol., 1985]. Dalšími cílovými místy IQ a MeIQ u potkanů je tlusté střevo nebo kůže.

Bylo prokázáno, že u potkanů a opic, IQ a PhIP, tvoří DNA adukty v játrech, bílých krvinkách a mnoha extrahepatálními tkáních včetně srdce, tlustého střeva, varlat a mozku [Snyderwine a kol., 1993]. Studie na kojících potkanech, kterým bylo podáno IQ,

8-MeIQx nebo PhIP, ukázaly přítomnost těchto látek v prsních žlázách (A. Ghoshal, Ph.D., E.G.S., unpublished data, 1993). Přítomnost těchto látek byla nalezena i v žaludku kojených štěňat. Toto zjištění způsobilo znepokojení nad expozicí karcinogenů do mléka u novorozeňat. Podle studií na lidských prsních epiteliálních buňkách bylo zjištěno, že tyto buňky metabolicky aktivují HAA [Pfau a kol., 1992]. Na základě role DNA aduktů v karcinogenezi je považováno, že za iniciaci nádoru prsu může být zodpovědná in vivo HAA adukce na prsní DNA.

## 4. Biotransformace

Tělo přichází do styku s nejrůznějšími cizorodými látkami (xenobiotiky), které jsou potenciálně škodlivé. Jsou tři možné způsoby interakce organismu s těmito látkami:

- nepodléhají biotransformaci a jsou vyloučeny v původní formě (při průchodu tělem, mohou způsobit poškození různých částí organismu: sliznic, oběhové soustavy, vnitřních orgánů aj.)
- jsou detoxikovány různými chemickými reakcemi (je pozměněna jejich původní forma) a následně jsou z organismu eliminovány
- dochází k jejich akumulaci v organismu (tělo je vystaveno jejich dlouhodobému účinku, což může způsobit např. chronické otravy)

Nejvhodnějším způsobem je pro organismus pozměnění xenobiotik (biotransformace) na netoxické produkty a jejich následná eliminace. Existuje několik způsobů odstranění metabolizovaných xenobiotik. Nejčastějším postupem je eliminace močí, kterou je eliminována většina hydrofilních látek [Fukasawa a kol., 2007]. Metabolity mohou být také vylučovány ve stolici, potu, slzách nebo vydechovaném vzduchu.

Hlavním místem biotransformací jsou játra, kde je lokalizována většina potřebných enzymů k těmto dějům. V játrech dochází k transformaci lipofilních látek na látky polárnější, které mohou být vyloučeny ledvinami [Fukasawa a kol., 2007].

Biotransformaci můžeme rozdělit na dvě fáze. V první fázi dochází zejména k oxidaci, redukci nebo hydrolýze xenobiotik – tyto reakce vedou ke zvýšení polarity molekuly. V druhé fázi dochází ke konjugaci endogenních hydrofilních látek s polární skupinou xenobiotika, což dále zvýší jeho rozpustnost ve vodě. Mezi reakce druhé fáze patří mimo jiné: glukuronidace, sulfonace, acetylace, reakce s glutationem a aminokyselinami [Carriere a kol., 2001]. Tyto biotransformační fáze jsou následovány transmembránovým exportem cizorodých látek a produktů druhé fáze z buňky (snížení koncentrace těchto látek uvnitř buňky). K nejdůležitějším zástupcům třetího stádia interakce organismu s xenobiotiky je transport, kterého se účastní např. P-glykoprotein nebo organické anionty přenášející polypeptidy (OATP) [Kubešová, 2010; Božina, a kol., 2009].

## 4.1. I. fáze

Tato fáze probíhá v endoplazmatickém retikulu a dochází během ní k zavedení nebo zpřístupnění polárních skupin (např. -COOH, -OH, -NH<sub>2</sub>). Mezi nejčastější reakce této fáze patří zejména tyto: epoxidace, aromatická a alifatická hydroxylace, dealkylace, N-oxidace a oxidační deaminace [Vrzal a kol., 2004; Kubešová, 2010]. Během první fáze dochází také k redukčním: redukční dehalogenaci, redukci nitroskupiny a azoskupiny atd. [Vrzal a kol., 2004]. Tyto reakce jsou katalyzované řadou enzymů jako např. cytochromy P450, flavinové monooxygenasy, alkoholdehydrogenasy, aldehyddehydrogenasy, karbonylreduktasy, peroxidasy, xanthinoxidasy, karboxylesterasy a další [Knejzlik a kol., 2000]. Nejdůležitějším enzymem této fáze je cytochrom P450 (CYP), proto bude detailněji popsán v následující kapitole.

### 4.1.1. Cytochrom P450

Cytochrom P450 (EC 1.14.14.1) má významnou úlohu v biotransformaci xenobiotik a účastní se oxidace přibližně 75% léčiv [Zuber a kol., 2002]. Při této biotransformaci nedochází pouze k detoxikaci cizorodých látek, ale může dojít i k jejich aktivaci, což způsobí jejich karcinogenní nebo toxické účinky.

Fyziologickými substráty cytochromu P450 (CYP) jsou: steroidy, mastné kyseliny, prostaglandiny nebo biogenní aminy, z xenobiotik pak: léky, rostlinné jedy a toxické chemikálie z prostředí [Božina, Bradamante, Lovric, 2009].

Tento enzym byl poprvé popsán Garfinklem a Klingenebergem v roce 1958 jako pigment v jaterních mikrozomech potkana [Garfinkel, 1958; Klingenberg, 1958]. Písmeno P v jeho názvu označuje pigment a označení 450 je odvozeno od absorpčního maxima jeho redukované formy v komplexu s oxidem uhelnatým [Omura and Sato, 1964].

Největší zastoupení tohoto enzymu je v membráně endoplazmatického retikula v játrech, nachází se ale i v dalších orgánech jako např. ve střevech, ledvinách, mozku, plicích, lymfocytech nebo placentě [Božina, Bradamante, Lovric, 2009].

Cytochrom P450 je spolu s NADPH: cytochrom P450 reduktázou a membránovými fosfolipidy součástí mikrosomální monooxygenasy se smíšenou funkcí (MFO z ang. Mixed function oxidases) [Křížková, 2010].

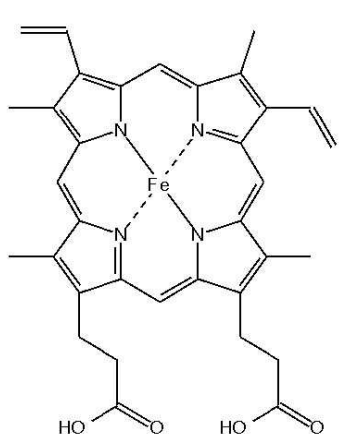
### **4.1.1.1. Nomenklatura**

Nomenklatura cytochromů je založena na zařazení jednotlivých CYP do rodin a podrodin podle homologie v primární struktuře. Pokud mají enzymy více jak 40%-ní shodu v aminokyselinové sekvenci, jsou zařazeny do stejné rodiny. Tato rodina je označována arabskou číslicí (např. CYP1). Velkým písmenem jsou označovány cytochromy patřící do stejné podrodiny (např. CYP1A). Tyto enzymy musí mít shodnou primární strukturu minimálně z 55%. Jednotlivé formy enzymu jsou značené druhou arabskou číslicí (např. CYP1A1) [Nelson, 1996].

V současnosti je známo více než 2500 sekvencí CYP, z toho 18 rodin a 43 podrodin připadá na člověka [<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>]. Z velkého počtu známých forem CYP je za většinu jeho aktivity zodpovědných pouze pět: CYP3A4/5 (nejčetnější), CYP2D6, CYP2C8, CYP1A1/2 A CYP2C19 [Fukasawa, 2007].

### **4.1.1.2. Funkce**

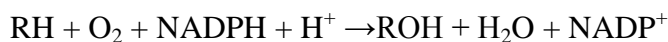
CYP je hemoproteinem b (jeho struktura viz obr. 2), v jehož porfyrinovém kruhu je čtyřmi ligandy vázán železitý kationt (viz obrázek 2). Pátým ligandem je thiolátový aniont z cysteinového zbytku, který je vázán v aktivním centru enzymu. Posledním ligandem hemu je atom kyslíku pocházející z vody [Kubešová, 2010; Stiborová a kol., 1999].



## Obr. 2: struktura hemu b

*Přejato od Křížková*

Jak již bylo řečeno (viz kapitola Cytochrom P450), je pro CYP typická katalýza oxidačních reakcí. Dalším substrátem této reakce vedle organické sloučeniny je molekulární kyslík (jako zdroj mohou být použity i peroxidy a peroxokyseliny), donorem elektronů pak NADPH. Celou reakci můžeme vyjádřit následující rovnicí:



- Reakce začíná přenosem elektronů z NADPH na NADPH: P450 reduktasu
- Dále dochází k redukci cytochromu P450
- V posledním kroku je redukováným CYP aktivována molekula kyslíku, z které je jeden atom začleněn do molekuly substrátu a druhý tvoří molekulu vody

Jak již bylo uvedeno (viz kapitola Cytochrom P450), při reakcích vedoucích ke zvýšení polarity xenobiotik nemusí dojít pouze k detoxikaci látek a jejich vyloučení z organismu, ale také k jejich aktivaci. Takto aktivované metabolity se mohou vázat především na nukleové kyseliny, proteiny, čímž způsobí jejich modifikaci a změnu nebo ztrátu fyziologické funkce [Stiborová a kol., 1999].

Nejdůležitější isoformy zodpovědné za biotransformaci chemikálií a zvláště metabolickou aktivaci prekarcinogenů jsou: CYP1A, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2E1 a CYP3A4 [Božina, Bradamante, Lovric, 2009]. Další možností jak CYP může negativně ovlivnit regulaci procesu nádorového bujení je biosyntéza a odbourávání látek potencujících



karcinogenezi nebo naopak látek ničících nádorové buňky. Na tomto procesu se podílejí zejména cytochromy P450 1A1, 1A2, 3A4 a 2C, které se účastní metabolismu exogenních prokarcinogenů, steroidních látek a protinádorových léčiv [Stiborová a kol., 1999].

## 4.2. II. fáze

Jak již bylo zmíněno v úvodu této kapitoly, ve druhé fázi dochází ke konjugačním reakcím, které mají za úkol další zvýšení polaritu látky pro její snadnější eliminaci z organismu. Této fázi většinou předchází fáze první, ve které se na xenobiotikum navážou polární skupiny (případně dojde k odhalení polárních skupin xenobiotika), které jsou schopny interakce s endogenními polárními sloučeninami druhé fáze. V případě, že taková skupina již existuje nevstupují xenobiotika do fáze první, ale přechází přímo do fáze druhé. V případě, že je látka dostatečně hydrofilní už po první fázi, nastane opačný případ, kdy látka neprochází druhou fází, ale je přímo eliminována z organismu.

Stejně jako v první fázi biotransformace nemusí dojít pouze k detoxikaci xenobiotika, ale může se stát, že se jeho toxicita zvětší nebo dokonce je tato původně netoxická látka aktivována. Pokud dojde ke spojení netoxického metabolitu první fáze s endogenní funkční skupinou konjugační fáze, může dojít k jeho aktivaci a nabytí karcinogenních nebo genotoxických vlastností. Příkladem takové aktivace je konjugace aromatických amínů s N-acetyltransferasou [Grant, 1992], heterocyklických amínů se sulfotransferasou nebo s UDP-glukuronosyltransferasou [Yamazoe, 1999].

Podle Benedettiho a kol., 2007 patří mezi hlavní reakce druhé fáze:

- Acetylace, v které dochází ke konjugaci s acetylovou skupinou N-acetyltransferasy (NAT). Jako příklad xenobiotik podléhajících této reakci lze uvést: isoniazid (antituberkulotikum) nebo kyselinu p-aminobenzoovou.
- Methylace, za kterou jsou zodpovědné S-, N- a O-methyltransferasy. Při této reakci dochází k transportu methylové skupiny z S-adenosyl-L-metioninu na nukleofil obsahující atom S, N nebo O.

- Glukuronidace, kterou katalizuje UDP-glukoronyltransferasa. Těto reakci podléhají různé endogenní substráty jako např. bilirubin, steroidní hormony nebo žlučové kyseliny nebo exogenní látky, mezi jinými chemické karcinogeny, léky nebo látky znečišťující životní prostředí [ Ritter, 2000]
- Sulfatace různých endogenních i exogenních látek, kterou katalizuje sulfottransferasa (SULT). Donorem sulfátu je 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS).
- Konjugace s aminokyselinami, hlavně glycinem a glutaminem (v menší míře s taurinem)
- Konjugace s glutationem, za kterou je zodpovědná glutation S-transferasa (GST). Tato reakce metabolizuje karcinogeny, endogenní a exogenní toxiny.

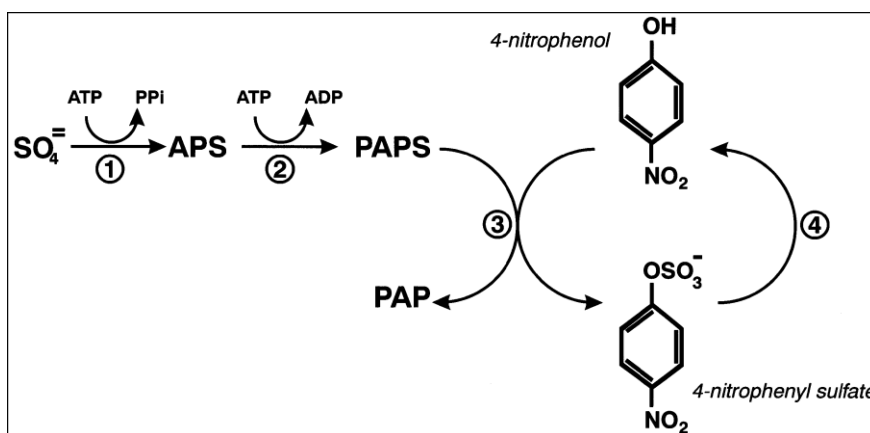
Dále budou podrobněji popsány sulfottransferasa a acetyltransferasa, které jsou enzymy nejčastěji zodpovědnými za konečnou aktivaci HAA [Shut a Snyderwine, 1999].

### 4.2.1. Sulfottransferasa

Sulfatace hraje klíčovou roli v metabolismu xenobiotik, syntéze steroidů a usnadňuje inaktivaci a eliminaci endogenních látek jako např. hormonů štítné žlázy, steroidů nebo katecholů [Falany, 2003]. Těto reakce se účastní dva enzymové systémy: sulfottransferasa (SULT), která katalyzuje sulfataci a sulfatasa, která katalyzuje hydrolýzu organosulfátu (utvořených působením SULT). Kromě samotných enzymů, je pro správnou funkci sulfátového systému, klíčová zásoba substrátu, dostačující množství aktivovaného sulfátového donoru PAPS a rovnováha mezi sulfatací a hydrolýzou (takto) vzniklého koniugátu, která záleží na relativních aktivitách a lokalizaci obou enzymů (umístění obou enzymů je rozdílné, sulfottransferasa se nachází v cytosolu, kdežto arylsulfatasa je přítomná v lyzosomech nebo v endoplazmatickém retikulu).

Mezi faktory ovlivňující zásobu substrátu patří metabolizace těchto substrátů jinými enzymy jako např. UDP-glukuronosyltransferasou, methyltransferasou, N-acetyltransferasou a jinými. Neméně důležitým činitelem regulujícím množství substrátu

je fakt, že sulfátové konjugáty jsou polární molekuly a nejsou schopny samy překročit biologickou membránu.



**Obr. 3: Sulfátový systém (přejato a upraveno od Coughtrie, 1998)**

Utváření a hydrolyza sulfátového konjugátu katalyzována *SULT* a *ARS* (na příkladu 4-nitrofenolu). (1) *ATP sulfurylasy*, (2) *APS kinasy*, (3) *sulfotransferasy*, (4) *arylsulfatasy*  
*PAP* – adenosin 3'5'-bisfosfát; *APS* – adenosin 5'-phosphosulfát;  
*ADP* – adenosin 5'-difosfát.

Jak bylo uvedeno výše, mezi klíčové prvky správné funkce sulfátového systému patří dostatečné množství donoru sulfátu. Tímto donorem je pro eukaryotní *SULT* 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfát nebo 3'-fosfoadenylsulfát (*PAPS*). Tato molekula je tvořená z *ATP* a anorganického sulfátu, za katalýzy *ATP sulfurylasy* a *APS kinázy*. Pro syntézu jedné molekuly *PAPS* je zapotřebí dvou molekul *ATP*, což činí ze sulfatace pro buňku energetický náročný proces [Coughtrie, 1998].

Jak již bylo zmíněno, za sulfataci molekul je zodpovědná sulfotransferasa. Lidská rodina sulfotransferas (*SULT*) zahrnuje pět členů, které se liší substrátovou specifitou a primární sekvencí [Coughtrie, 1996]. Na základě aminokyselinové sekvence a preference k substrátu můžeme lidské sulfotransferasy dále rozdělit do dvou rodin: fenolové sulfotransferasy a hydroxysteroidní sulfotransferasy. Do první rodiny patří: *P-PST*, *SULT 1A2*, *M-PST* a *EST* a do druhé pak *HST*.

### 4.2.1.1. Biologická funkce sulfatace

Sulfatace patří mezi důležité reakce druhé fáze metabolismu xenobiotik. Tato reakce chrání proti toxickému nebo potenciálně toxickému působení četných xenobiotik a jejich metabolitů [Coufhtrie, 1998]. Konjugáty sulfátu vykazují sníženou biologickou aktivitu v porovnání s původními sloučeninami [Mulder, 1990]. Existuje mnoho případů, kdy sulfátové konjugáty jsou biologicky aktivnější než volné sloučeniny. Nejzajímavějším případem bioaktivace sulfatací je aktivace potravních environmentálních mutagenů a karcinogenů. Příkladem sloučenin, kde sulfatace hraje rozhodující roli v jejich bioaktivaci jsou polycyklické aromatické uhlovodíky nebo aromatické aminy, včetně heterocyklických aminů, které se nachází v tepelně zpracovaném mase [Coufhtrie, 1998].

Většina SULT se nachází v gastrointestinálním traktu [Chen a kol., 2003]. Tato skutečnost spolu s faktem, že sulfatace hraje důležitou roli v aktivaci potravních prekarcinogenů vede k předpokladu tvorby vysoce reaktivních, mutagenních esterů kyseliny sírové uvnitř gastrointestinálního traktu. Tento fakt může být důležitým mechanismem např. pro rakovinu tlustého střeva, kde dochází k sulfataci (aktivaci) potravních aromatických aminů [Coufhtrie, 1998].

### 4.2.1.2. Indukce

Podle studií na potkaních střevech a játrech byla zjištěna indukce exprese SULT1A1 všemi trans retinovými kyselinami. Studie na hepatáliálních lidských buňkách, s použitím rostlinných fenolických kyselin jako např. kyseliny gallové rovněž prokázaly inducibilitu této exprese [Maiti a kol. 2005; Yeh a kol. 2005]. Citováno podle Bian.

Inducibilita byla pozorována i u lidského SULT1A3 v střevních a hepataliálních buňkách. Jako inducibilní látky tohoto enzymu byly prokázány metotraxát a  $\beta$ -naftoflavon [Chen a ko., 2005; Miyano a kol. 2005] citováno podle Bian.

Podle studií Biana a kol., je lidský gen SULT1A3 indukovatelný také glukokortikoidy.

Při podávání dexametazonu došlo ke značnému zvýšení aktivity u kontrolní skupiny SULT. Menší indukce byla docílena podáváním prednizolonu [Bian a kol., 2007].

### 4.2.1.3. Inhibice

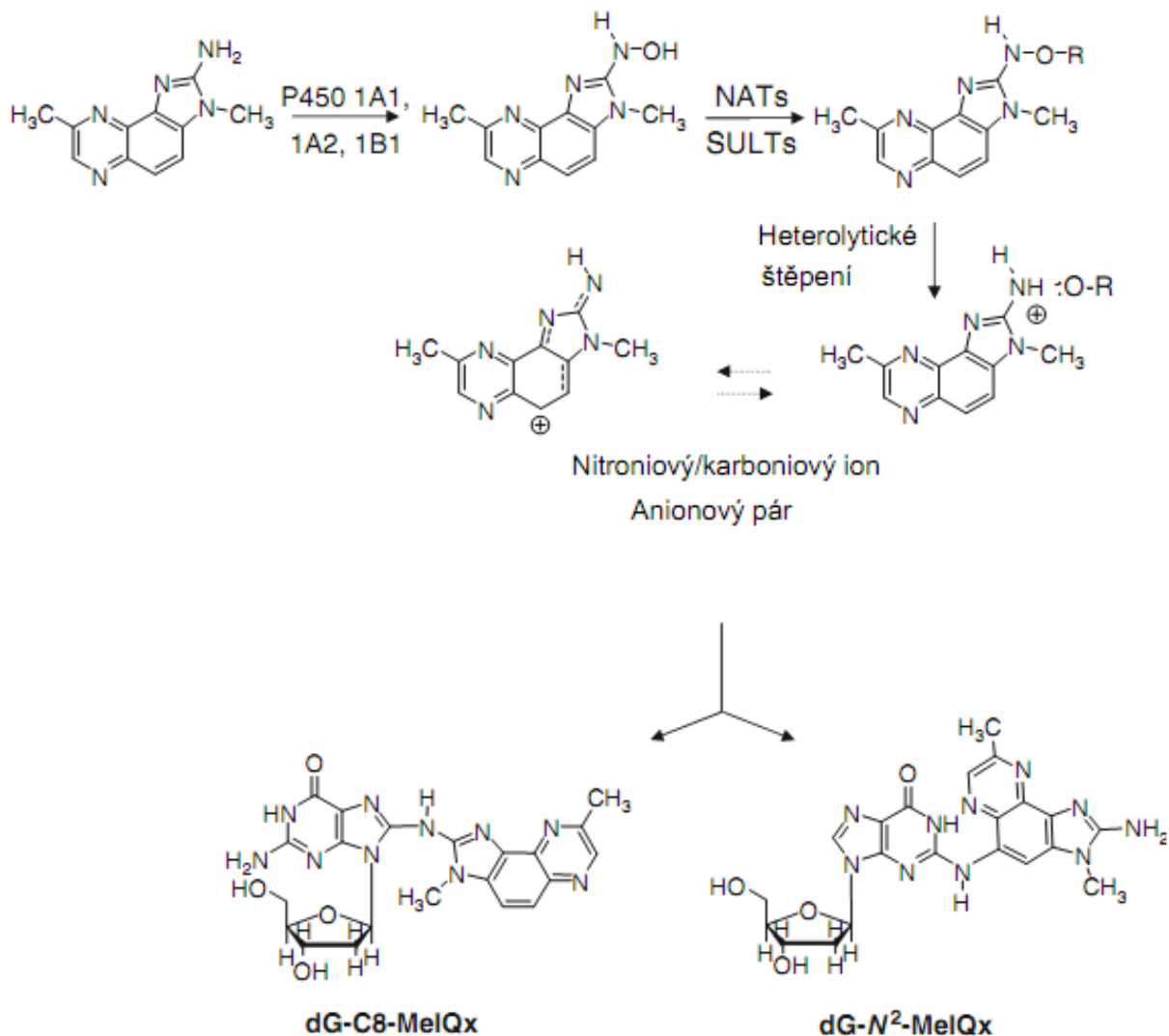
Zajímavou otázkou je potenciaální schopnost jiných potravních sloučenin inhibovat aktivaci SULT takových prokarcinogenů. V posledních letech se této schopnosti sloučenin (chránit proti chemicky indukované rakovině) věnuje velká pozornost [Stavric, 1994]. Mezi nejvíce studované potravní sloučeniny, jako potenciální rakovinné chemopreventivní látky patří fenolické sloučeniny, jako např. quercetin [Stavric, 1994] a hlavní složky takových sloučenin jako je např. zelený čaj [Wargowich, 1997]. Ačkoliv epidemiologická data neposkytují vždy jednoznačné důkazy o přímém protinádorovém účinku zeleného čaje, nepochybně odrážejí komplexní přírodní interakční faktory ovlivňující individuální citlivost [Coufhtrie, 1998].

Byla zhodnocena schopnost tří nealkoholových nápojů (černého, zeleného čaje a kávy) inhibovat aktivitu lidské fenolové sulfotransferasy (jako zdroj M-PST a P-PST byl použit cytozol z krevních destiček). Černý a zelený čaj a zvláště káva se ukázaly silnými inhibitory P-PST a M-PST. Přibližně 10 000 násobně zředěný šálek silné filtrované kávy inhiboval 50% aktivity P-PST z krevních destiček. Oba nápoje káva i čaj obsahují přibližně 700 sloučenin. Po přezkoumání několika z nich, byla identifikována kyselina kávová jako silný a selektivní inhibitor P-PST. Tato skutečnost dokázala, že fenolová sulfotransferasa P-PST (zapojená v aktivaci potravních prokarcinogenů) je silně inhibována běžnými nápoji jako čaj nebo káva [Jones a kol., 1995].

### 4.2.1.4. Aktivace

Za hlavní enzym spojený s aktivací AIA (aminoimidazo-azaareny; hlavní podtřída heterocyklických aminů HAA) se považuje jaterní cytochrom P450, který je zodpovědný za N-hydroxylaci. Vzniklé N-hydroxylaminy jsou schopny přímé reakce s DNA, ale za konečné karcinogenní látky jsou považovány acetátové nebo sulfátové estery N-hydroxy-HAA. Tyto estery jsou většinou tvořeny N-acetyltransferasou (NAT) nebo sulfotransferasou (SULT) [Shut a Snyderwine, 1999] (viz obr. 3). U potkanů

premedikovaných PhIP, byly v tlustém střevu nalezeny adukty PhIP-DNA, navzdory zjevnému nedostatku aktivace v první fázi [Kaderlik a kol., 1994]. Estery N-hydroxy-AIA utvořené během druhé fáze jsou nestálé metabolity, které reagují s nuklofilními místy DNA. Esterová část plní roli odcházející skupiny, která dává vzestup předpokládaným elektrofilním iontům aryl dusíkových intermediátů, mnoho let považovaných za účastníky tvoření arylaminoých DNA aduktů. V mnohem menším rozsahu mohou být aryl dusíkové ionty vytvořené přímo z N-hydroxylaminové skupiny. Tato skutečnost vysvětluje vytvoření DNA aduktů při absenci esterifikace jako např. u N-hydroxy-IQ. Aryl dusíkový iont je obecně považován za konečnou karcinogenní formu AIA zodpovědnou za tvorbu AIA-DNA aduktů [Kadlubar a Beland, 1985; Snyderwine a kol., 1988]. Reaktivita těchto aryl dusíkových iontů a jejich uhlíkových iontů rezonančních forem s jednotlivými nukleofilními místy DNA dává vzniknout specifickým DNA aduktům, které byly nalezeny na pozici C8 a N<sup>2</sup> guaninu [Turesky a kol., 1992].



**Obr. 3: Bioaktivace MeIQx a utvoření nitreniového a karboniového iontu (přejato a upraveno od Penning, 2011)**

*R* -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -COCH<sub>3</sub>; MeIQx – 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline

Jiným místem vzniku DNA aduktů, je mezi N<sup>2</sup> exocyklickou aminovou skupinou deoxyguanosinu (dG) a C5 heterocyklického kruhu IQ a MeIQx. Tato skutečnost signalizuje delokalizaci náboje nitreniového iontu heteroatomu HAA [Turesky a Vouros, 2004]. Pro detekci HAA aduktů u experimentálních zvířat byly použity metody <sup>32</sup>P-postlabeling [Shut a Snyderwine, 1999] a kapalná chromatografie/hmotnostní spektrofotometrie [Turesky a Vouros, 2004]. Je obecně předpokládáno, že tato poškození DNA jsou zodpovědná za mutagenní účinky HAA u lidských a bakteriálních buněk.

Obecně se předpokládá, že modifikace HAA-purinových bází indukují konformační změny DNA. Tyto změny jsou považovány za důležité determinanty nabytí biologické aktivity u aduktů a jejich sklonu k indukci posunové mutace záměny páru bází během translace [Broyde a kol., 2008]. Schopnost lidské (nebo bakteriální DNA) polymerasy bezchybně prodlužovat primery za templátem G-IQ aduktu byla shledána za vysoce závislou na struktuře aduktů a na místě adukce uvnitř sekvence [Choi a kol., 2006; Stover a kol. 2006].

## 4.2.2. N-acetyltransferasa

N-acetyltransferasa (NAT; EC 2.3.1.5) byla poprvé identifikována v roce 1962, jako důležitá složka biotransformace kyseliny p-aminobenzoové a sulfanilamidu [Muenzen a kol., 1926]. Jako kofaktor tohoto enzymu byl objeven koenzym A [Lipman a Kaplan, 1945]. Bylo zjištěno, že se tento kofaktor účastní přenosu uhlíkové skupiny obsahující acetat [Nathan a kol., 1948].

U lidí jsou dva dobře charakterizované enzymy NAT1 a NAT2. Tyto enzymy jsou monomerní proteiny s 290 aminokyselinovou délkou, které sdílí 86% sekvenční identitu a mají překryv substrátové specifity. Hlavním místem exprese NAT2 jsou játra a tenké střevo. Navzdory této podobnosti obou enzymů, ukazují tyto enzymy významné rozdíly v substrátové selektivitě, např. NAT1 ukazuje mnohem vyšší afinitu k PAS (kyselina p-aminosalicylová) než k SMZ (sulfamethazin), zatímco NAT2 ukazuje opačnou selektivitu (vyšší afinitu k SMZ než k PAS) [Grant a kol., 1991]. Podle obecných předpokladů, jsou za tyto rozdíly v substrátové specifitě zodpovědné rozdíly v aminokyselinové sekvenci mezi těmito dvěma enzymy.

### 4.2.2.1. Funkce

N-acetylace je hlavní cesta biotransformace pro aromatické aminy (R-NH<sub>2</sub>) a hydraziny (R-NH-NH<sub>2</sub>) [Evans, 1992]. Navíc je hlavní reakcí L-cysteinových konjugátů vzniklých při metabolismu glutationových konjugátů, z kterých vznikne merkapturová kyselina.



NAT je také zodpovědná za katalýzu O-acetylace alkoholu, včetně N-hydroxidů, které vznikly při aktivaci aromatických aminů [Penning, 2011].

Jak již bylo zmíněno výše, je N-acetyltransferasa jedním z enzymů zodpovědných za metabolickou aktivaci HAA. U lidí byly určeny dvě N-acetyltransferasy, NAT1 a NAT2.

Expres NAT1 je zejména v extrahepatální tkáni, zatímco největší exprese NAT2 je v játrech a střevním epitelu [Hickman a kol., 1998; Windmill a kol., 2000]. NAT metabolizují mnohé léky obsahující aminovou a hydrazinovou funkční skupinu [Hein a kol., 2000]. U experimentálních zvířat a lidí je N-acetylace hlavní detoxikační dráhou metabolismu arylaminu. Navíc NAT katalyzuje intramolekulární N,O-acetylový přenos N-hydroxy-N-acetyl-AA k tvorbě reaktivního N-acetoxy intermediátu, který se váže k DNA [Hein, 2000; Kadlubar a Beland, 1985].

Bylo prokázáno, že NAT2 a NAT1 jsou polymorfní enzymy, které rozdělují jednotlivé látky na rychlé a pomalé acetylační fenotypy [Weber a Hein, 1985; Vatsis a Weber, 1993]. Genetický polymorfismus těchto enzymů ovlivňuje rovnováhu mezi detoxikací a metabolickou aktivací environmentálních arylaminových karcinogenů a může působit na riziko vzniku jistých lidských nádorových onemocnění jako např. nádoru tlustého střeva nebo močového měchýře. Nedávné studie navíc prokázaly, že NAT1 aktivita v lidském tlustém střevu a močovém měchýři je důležitým determinantem rizika nádorového onemocnění a in situ metabolické aktivace arylaminů [Bell a kol., 1995; Badawi a kol., 1995].

N-acetoxy deriváty N-hydroxy-IQ a N-hydroxy-MeIQx jsou vysoce nestabilní [Turesky, 1994], oproti tomu N-acetoxy-PhIP je dostatečně stabilní a byl izolován HPLC [Frandsen a kol., 1992]. O-acetylace mnoha N-hydroxy-HAA je ve větším rozsahu katalyzována lidskou NAT2 (106), ačkoliv N-hydroxy-PhIP a N-hydroxy-2-AαC jsou především bioaktivovány NAT1 [Minchin a kol., 1992; King a kol., 2000]. Rychlý i pomalý fenotyp acetylace N-hydroxy-HAA je prezentován v lidských jaterních vzorcích. O-acetylace N-hydroxy-HAA se také vyskytuje v lidském tlustém střevu (domnělou cílovou tkáni HAA). Ačkoli rychlý polymorfismus O-acetylace není zřetelně rozeznatelný v tlustém střevu [Turesky a kol., 1991], což může být způsobeno relativní nízkou expresí NAT2 proteinů v tlustém střevu [Hickman a kol., 1998]. V této tkáni může být uskutečněna bioaktivace N-hydroxy-HAA ve větší míře NAT1. NAT1 také přispívá k bioaktivaci několik N-hydroxy-HAA v lidské prsní tkáni, kde je nízká aktivita NAT2 [Sadrieh a kol., 1996]. NAT1 je vyjádřeno v relativně vysoké hladině v extrahepatální

tkáni [Hickman a kol., 1998; Windmill a kol., 2000] a může přispívat k bioaktivaci N-hydroxy-HAA v domnělých cílových tkáních jako např. v tlustém střevu, prostatě nebo prsních žlázách [Williams a Phillips, 2000; Williams a kol., 2001]. PhIP bylo identifikováno v mléce zdravých žen, které jedí dobře zpracované maso [DeBruin a kol., 2001] a nedávné studie udávají detekci PhIP-DNA aduktů v lidské prsní tkáni [Zhu a kol., 2003]. Bylo oznámeno, že množství konzumentů dobře zpracovaného masa, ženy s rychlým genotypem NAT2, mají vyšší hladinu PhIP-DNA aduktů než ty, které mají pomalý NAT2 genotyp. Tyto studie navrhuje, že N-acetoxy-PhIP tvořený NAT2 v játrech může být dostatečně stabilní k transportu krevním řečištěm a reakci s DNA v prsní tkáni. V některých studiích je NAT2 rychlý acetylační typ (NAT2\*4 allela) spojován se zvýšením rizika rakoviny tlustého střeva [Hein, 2000]. Navíc byl pozorován pozitivní interaktivní efekt u jedinců, kteří často konzumují grilované maso a kteří mají rychlé acetylátory a CYP1A2 N-oxidátory, což podporuje údajnou roli HAA v etiologii rakoviny tlustého střeva [Le Marchand a kol., 2001; Ishibe a kol., 2002].

#### **4.2.2.2 Inhibice**

Podle studií CHenga a kol., které byly provedeny na lidských buňkách tlustého střeva z adenokarcinomu, je NAT inhibován ketoprofenem. Dalším inhibitorem NAT jsou komponenty kávy jako např. 7,12-dimethylbenz[a]anthracen [Huber a Parzefall, 2005].

Kukongvirizapana a kol. provedl výzkum inhibice NAT na lidských jaterních buňkách a buňkách rakoviny žlučovodu. Tyto studie prokázaly, že dobrým inhibitorem NAT1 i NAT2 je quercetin. Dále byla zkoumána kyselina kávová a kyselina galová, které vykazovaly inhibici NAT1, ale ne NAT2. Oproti tomu kurkumin inhiboval NAT2 a ne NAT1. Jako silný inhibitor NAT1 se ukázal aloe emodin, který inhiboval tento enzym mimo jiné v nádorových buňkách tlustého střeva, prostaty, jater, močového měchýře, leukemie [Lin a kol. zjistili, 2005].

## 5. Závěr

Člověk je každý den vystavován působení různých xenobiotik, které mohou mít nepříznivý vliv na jeho zdraví. S expozicí četných xenobiotik je spojován vznik mnohých nádorových onemocnění. Jedním z nejčastějších nádorových onemocnění v ČR jsou karcinomy tlustého střeva, ale i jiných částí trávicího traktu. Na vznik tohoto onemocnění má kromě jiných faktorů (jako např. genetické predispozice) velkou vliv přijímaná potrava a karcinogeny v ní obsažené. Mezi nejčastěji vyskytující se látky v potravě s karcinogenním účinkem patří heterocyklické aminy. Tyto látky se hlavně nachází v tepelně zpracovaném mase jako je: grilovaný steak, smažené hovězí nebo smažená ryba.

Pro karcinogenní účinek těchto látek je nutná jejich předešlá aktivace. Tuto aktivaci zajišťují cytochromy P450 (CYP), které jsou zodpovědné za N-hydroxylaci těchto látek. Nejvýznamnějšími CYP podílejícími se na aktivaci prokarcinogenů jsou 1A1 a 1A2. Takto aktivované látky mají slabou afinitu k DNA a proto jsou dále aktivovány na reaktivnější estery. Za esteryfikaci těchto látek jsou zodpovědné hlavně enzymy sulfotransferasa (SULT) a N-acetyltransferasa (NAT). Tyto sulfátové nebo acetátové estery jsou považovány za konečné karcinogenní produkty. Hlavním místem exprese těchto enzymů je trávicí trakt, obzvláště játra a střeva. Ovlivněním těchto enzymů můžeme významně snížit riziko vzniku karcinomů. Inhibitory těchto enzymů jsou mimo jiné četné látky obsažené v potravě. Mezi nejznámější patří quercetin, který je obsažen v ovoci (např. citrusových plodech), zelenině (např. cibuli). Dalšími inhibitory sulfotransferasy a N-acetyltransferasy patří složky kávy a čaje jako je kyselina kávová. Jinou možností jak snížit riziko vzniku karcinomů je změnit způsob úpravy potravin bohatých na HAA.

# Použitá literatura

Badawi, A. F., Hirvonen, A., Bell, D. A., Lang, N. P., and Kadlubar, F. F.: *Cancer Res.* 55, 5230-5237 (1995)

Bell, D. A., Stephens, E. A., Castranio, T., Umbach, D. M., Watson, M., Deakin, M., Elder, J., Hendrickse, C., Duncan, H., and Strange, R. C. *Cancer Res.*: 55, 3537-3542 (1995)

Benedetti, M.S., Whomsley, R., Canning, M.: *Drug discovery Today*, 12, (2007)

Božina, N., Bradamante, V., Lovrič, M.: *Arh Hig Rada Toksikol*, 60, 217-242 (2009)

Broyde, S., Wang, L.H., Zhang, L., Rechkoblit, O., Geacintov, N.E., Patel, D.J.: *Chemical Research in Toxicology*, 21, 45-52 (2008)

Carriere, V., Chambaz, J., Rousset, M.: *Toxicology in Vitro*, 15, 373-378 (2001)

Commoner, B.; Vithayathil, A. J.; Dolara, P.; Nair, S.; Madyastha, P.; Cuca, G. C., *Science*, 201, 913-916 (1978)

Davis, C. D., Dacquel, E. J., Schut, H. A. J., Thorgeirsson, S. S., Snyderwine, E. G., *Mutat. Res.*, 356, 287 –296 (1996)

Davis, C.D., Schut, H.A.J., Snyderwine, E.G.: *Carcinogenesis*, 14, 2091-2096 (1993)

DeBruin, L. S., Martos, P. A., Josephy, P. D.: *Chem. Res. Toxicol.*, 14,

Dresbach, S.H., Rossi, A.: *Ohio State University Extension Fact Sheet* (1998)

Felton JS, Knize MC, Wood C, Wuebbles GJ, Healy SK, Stuermer DH, a kol.: *Carcinogenesis*, 5, 95-102 (1984)

Felton JS, Knize MG, Shen NH, Andresen BD, Bjeldanes LF, Hatch FT. *Environ Health Perspect*, 67, 17-24 (1986)

Fukasawa, T., Suzuki, A., Otani, K.: *J. Clin. Pharm. Therapeutics*, 32, 333-341 (2007)

Garfinkel, D.: *Arch Biochem Biophys*, 77, 493-509 (1958)

Grant, D.M., Blum, M., Beer, M., Meyer, U.A.: *MOLECULAR PHARMACOLOGY*, 39, 184-191 (1991)

Grant, M.D., Josephy, P.D., Lord, H.L., Morrison, L.D.: *Cancer research*, 52, 3961-3964 (1992)

Guengerich, F.P, McCormick, W.A., Wheeler, J.B.: *Chemical research in toxicology*, 16, 1493-1499 (2003)

Hao Sheng Bian a, Sherry Yan Yan Ngo a, Weiqi Tan a, Chang Hua Wong a, Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 51-88 (2005)

Hayes, J.D., McLellan, L.I.: *Free radical research*, 31, 273-300 (1999)

Hayes, J.D., Pulford, D.J.: *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 445-600 (1995)

Hein, D. W., Doll, M. A., Fretland, A. J., Leff, M. A.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers*, 9, 29-42 (1998)

Hein, D. W., *Toxicol. Lett.*: 112 -113, 349-356 (2000)

Hickman, D., Pope, J., Patil, S. D. F. G., Smelt, V.: *Gut*, 42, 402-409 (1998)

Huber, W. W.; Parzefall, W., Modification of N-acetyltransferases and glutathione S-transferases by coffee components: Possible relevance for cancer risk. In *Glutathione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases*, Sies, (Packer, L., Ed). Elsevier Academic Press Inc: San Diego, 401, str. 307-341(2005)

Chen, X. R.; Baker, S. M.; Chen, G. P., *J. Appl. Toxicol.*,25, 354-360 2005

Cheng, K. C.; Li, Y. C.; Yu, C. S.; Yu, F. S.; Lee, J. H.; Lin, M. L.; Yang, J. S.; Chung, J. G., *Anticancer Res.* 26, 1105-1111 (2006)

Indulski, J.A., Lutz, W.: *Int Arch Occup Environ Health*, 73, 71-85 (2000)

Ingelman-Sundberg, M.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 369, 89-104 (2004)

Ishibe, N., Sinha, R., Hein, D. W., Kulldorff, M.: *Pharmacogenetics*,12, 145–150 (2002)

Ito N, Hasegawa R, Sano N, Tamano S, Esumi H, Takayama S.: *Carcinogenesis* 12, 1503-6 (1991)

Jagerstad, M., Skog, K., Arvidsson, P., Solyakov, A., *Eur. Food Res. Technol.*, 207, 419 –427 (1998)

Jones, A.L., Roberts, R.C., Colvin, D.W., Rubin, G.L. Coughtrie, M.W: *European Journal of Clinical Pharmacology*, 49, 109-114 (1995)

Kaderlik, K.R., Minchin, R.F., Mulder, G.J., Ilett, K.F., Daugaardjenson, M., Teitel, Ch., Kadlubar, F.F.: *Carcinogenesis*, 15, 1703-1709 (1994)

Kadlubar, F. F., Beland, F. A., Chemical properties of ultimate carcinogenic metabolites of arylamines and arylamides, Polycyclic Hydrocarbon and Carcinogenesis, (Harvey, R. G. ed.) American Chemical Society, Washington, DC 1985, str. 332 –370

Kadlubar, F.E., Beland, F.A.: American Chemical Society Symposium Series, 283, 341-370 (1985)

Kadlubar, F.F., Beland, F.A. ACS SYMPOSIUM SERIES, 283, 341-370 (1985)

Kasai, H.; Yamaizumi, Z.; Wakabayashi, K.; Nagao, M.; Sugimura, T.; Yokoyama, S.; Miyazawa, T.; Spingarn, N. E.; Weisburger, J. H.; Nishimura, S., *Proc. Jpn. Acad. Ser. B-Phys. Biol. Sci.*, 56, 278-283 (1980)

Kato T, Migita H, Ohgaki H, Sato S, Takayma S, Sugimura S.: *Carcinogenesis*, 10, 601-3 (1989)

Kato, R., Yamazoe, Y.: *Jpn.J.Cancer Res.*, 78, 297-311 (1987)

King, R. S., Teitel, C. H., Kadlubar, F. F.: *Carcinogenesis*, 21, 1347 –1354 (2000)

Klener, P., Abrahámová, J., Fait, V., Mališ, J., Matějovský, Z., Petruželka, L., Žaloudík, J.: *Prevence nádorových onemocnění*, v knize *Klinická onkologie*, nakladatelství Karolínium, Praha, str. 107-116 (2002)

Klingenberg, M.: *Arch Biochem Biophys*, 75, 376-386 (1958)

Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T.: *Chem. Listy*, 94, 913-918 (2000)

Křížková, J.: *Effects of chemopreventive compounds on cytochrome P450s*, Kandidátská dizertační práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 9-10 (2010)

Kubešová, K.: *Vliv klinicky využívaných psychofarmak, benzodiazepinů, na transkripční aktivitu xenoreceptorů v lidských nádorových liniích*, Kandidátská diplomová práce PřF UP Olomouc, katedra biochemie, str. 27-30 (2010)

Kukongviriyapan, V.; Phromsopa, N.; Tassaneeyakul, W.; Kukongviriyapan, U.; Sripa, B.; Hahnvajjanawong, V.; Bhudhisawasdi, V., *Xenobiotica*, 36, 15-28 (2006)

Kuribayashi, M.; Asamoto, M.; Suzuki, S.; Hokaiwado, N.; Ogawa, K.; Shirai, T., *Cancer Lett.*, 232, 289-299 (2006)

Le Marchand, L., Hankin, J. H., Wilkens, L. R., Pierce, L.M.:*Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10, 1259 –1266 (2001)

Levi, F., Lucchini, F., Negri, E., Boyle, P., La Vecchia, C.: *J. Cancer*, 110, 155-169 (2004)

Lin, S. Y.; Yang, J. H.; Hsia, T. C.; Lee, J. H.; Chiu, T. H.; Wei, Y. H.; Chung, J. G., *Melanoma Res.*,15, 489-494 (2005)

Maiti, S.; Chen, X. R.; Chen, G. P., *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 96, 44-53 (2005)

Minchin, R. F., Reeves, P. T., Teitel, C. H., McManus, M. E.:*Biochem. Biophys. Res. Commun.*:185, 839 –844 (1992)

Miyano, J.; Yamamoto, S.; Hanioka, N.; Narimatsu, S.; Ishikawa, T.; Ogura, K.; Watabe, T.; Nishimura, M.; Ueda, N.; Naito, S., *Biochem. Pharmacol.*, 69, 941-950 (2005)

Nagao, M.; Honda, M.; Seino, Y.; Yahagi, T.; Sugimura, T., *Cancer Lett.*, 2, 221-226 (1977)

Ohgaki, H.: Takayama, S., Sugimura, T., *Mutation Research*, 259, 399-4 (1991)

Omura and Sato, 1964 citováno podle Křířková, J.: Effects of chemopreventive compounds on cytochrome P450s, Kandidátská dizertační práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 9-10 (2010)



- Klener, P., Abrahámová, J., Fait, V., Mališ, J., Matějovský, Z., Petruželka, L., Žaloudík, J.: Prevence nádorových onemocnění, v knize Klinická onkologie, nakladatelství Karolínium, Praha, str. 107-116 (2002)
- Penning, T.M.: Chemical carcinogenesis, New York (2011)
- Pfau W, O'Hare MJ, Grover PL, Phillips DH.: *Carcinogenesis*, 13, 907-9 (1992)
- Rademacher P.: *Chemie Unserer Zeit* 3, 79 (1975)
- Sadrieh, N., Davis, C. D., Snyderwine, E. G.: *Cancer Res.*, 56, 2683 –2687 (1996)
- Shut, H.A.J., Snyderwine, E.G.: *Carcinogenesis*, 20, 353-368 (1999)
- Skog, K., Solyakov, A., Jagerstad, M., *Food Chem.* 68, 299–308 (2000)
- Snyderwine, E.G., Roller, P.P., Adamson, R.H., Sato, S., Thorgeirsson, S.S.: *Carcinogenesis*, 9, 1061-1065 (1988)
- Snyderwine, E.G.: *Cancer*, 74, 1070-1077 (1994)
- Snyderwine, EG, Nouse K, Schut HAJ: *Food Chem Toxicol*, 31, 415-23 (1993)
- Sporn, B.M, Suh, N.: *Carcinogenesis*, 21, 525 – 530 (2000)
- Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: *Chem. Listy*, 93, 229-237 (1999)
- Stratil, P., Kubáň, V.: *Chem. Listy* 98, 379–387 (2004)
- Sugimura T, Nagao M, Kawachi T, Honda M, Yahagi T, Seino Y, a kol. Mutagens-carcinogens in food, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods, v knize *Origins in human cancer*, book C., Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1977, 1561-76

Tanaka T, Barnes WS, Williams GM, Weisburger JH.: *Jpn J Cancer Res*, 76, 570-6 (1985)

Turesky, R. J., DNA adducts of heterocyclic aromatic amines, arylazides and 4-nitroquinoline 1-oxide, v knize, DNA Adducts: Identification and Biological Significance, (Hemminki, K., ed.) International Agency for Research on Cancer, Lyon 1994, str. 217–228

Turesky, R. J., Lang, N. P., Butler, M. A., Teitel, C. H., Kadlubar, F. Carcinogenesis, 12, 1839–1845 (1991)

Turesky, R.J., Rossi, S.C., Welti, D.H., Lay, J.O. Jr., Kadlubar, F.F.: Chem.Res.Toxicol, 5, 479-490 (1992)

Turesky, R.J., Vouros, P.: Journal of Chromatography B, 802, 155-166 (2004)

Urs A. Boelsterli b,c, Theresa May Chin Tan: Life Sciences, 81, 1659–1667 (2007)

Vatsis, K. P. a Weber, W. W.:Arch. Biochem. Biophys. 301, 71-76 (1993)

Vrzal a kol., 2004 citováno podle Kubešová (2010)

Wattenberg, L.W.: Preventive medicine 25, 44–45 (1996)

Weber, W. W., and Hein, D. W. :Pharmacol. Rev.,37, 25-79 (1985)

Williams, J. A., Phillips, D. H: Cancer Res., 60, 4667–4677 (2000)

Windmill, K. F., Gaedigk, A., Hall, P. M., Samaratunga, H.:Toxicol. Sci., 54, 19–29 (2000)

Yamazoe, Y., Nagata, N., Yoshinari, K., Fujita, K., Shiraga, T., Iwasaki, K.: *Cancer Letters*, 143, 103-107 (1999)

Zhu, J., Chang, P., Bondy, M. L., Sahin, A. A.: *Biomarkers Prev.*, 12, 830 –

Zuber R., Anzenbacherová E., Anzenbacher P. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 6,189-98 (2002)

Český statistický úřad: <http://www.czso.cz>

International Agency for Research on Cancer: <http://www.iarc.fr/>

World Health Organization: <http://www.euro.who.int>

„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.“

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
-------------------------------	----------	-----------------	----------